

UNIVERZITET U BEOGRADU  
POLJOPRIVREDNI FAKULTET

Ana G. Doroški

ISPITIVANJE KVALITETA I BIOLOŠKOG  
POTENCIJALA BUKOVAČE (*Pleurotus ostreatus*) I  
ANALIZA MOGUĆNOSTI GAJENJA NA  
CELULOZONOM OTPADU PREHRAMBENE  
INDUSTRIJE

doktorska disertacija

Beograd, 2024

UNIVERSITY OF BELGRADE  
FACULTY OF AGRICULTURE

Ana G. Doroški

EXAMINATION OF THE QUALITY AND  
BIOLOGICAL POTENTIAL OF THE OYSTER  
MUSHROOM (*Pleurotus ostreatus*) AND  
ANALYSIS OF THE POSSIBILITY FOR  
GROWING ON CELLULOSE FOOD INDUSTRY  
WASTE

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2024

**MENTOR 1:**

**dr Ilija Đekić, redovni profesor**

Univerzitet u Beogradu

Poljoprivredni fakultet

**MENTOR 2:**

**dr Anita Klaus, redovni profesor**

Univerzitet u Beogradu

Poljoprivredni fakultet

**ČLANOVI KOMISIJE:**

**1. dr Nikola Tomić, redovni profesor**

Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Beogradu

**2. dr Maja Kozarski, redovni profesor**

Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Beogradu

**3. dr Biljana Nikolić, redovni profesor**

Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

**4. dr Biljana Rabrenović, redovni profesor**

Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Beogradu

**5. dr Jovana Vunduk, viši naučni saradnik**

Institut za opštu i fizičku hemiju, Beograd

Datum odbrane:\_\_\_\_\_

*Neizmernu zahvalnost želim da izrazim svom mentoru, prof. dr Iliji Đekiću na nesebičnim savetima, angažovanju i pomoći tokom izrade disertacije, kao i ukazanom vremenu i strpljenju.*

*Želim da se zahvalim svom mentoru prof. dr Aniti Klaus na angažovanju i sugestijama tokom izvođenja eksperimentalnog dela istraživanja.*

*Veliku zahvalnost dugujem prof. dr Biljani Nikolić i dr Stefani Cvetković za pomoć u realizaciji dela eksperimenata na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu.*

*Zahvaljujem se dr Jovani Vunduk za savete tokom pisanja rada i nesebičnu pomoć tokom izvođenja eksperimenata.*

*Veliku zahvalnost dugujem i kolegama sa Katedre za hemiju i biohemiju, prof. dr Maji Kozarski za angažovanje tokom izvođenja hemijskih analiza, kao i prof. dr Mirjani Pešić i dr Danijelu Milinčiću za mogućnost proširenja istraživanja vezanih za temu doktorske disertacije.*

*Veliko hvala kolegama sa Katedre za tehnološku mikrobiologiju za razgovor, dobronamerne savete i pomoć.*

*Beskrajno hvala mojoj porodici i prijateljima koji su me bodrili i verovali u mene tokom celokupnih studija. Hvala mom vereniku Marku na strpljenju, podršci i ljubavi.*

*Svoju doktorsku disertaciju posvećujem i najveću zahvalnost dugujem svojoj Mami koja je ceo život verovala u mene, podržavala me u višem obrazovanju kao i u životu, i mom Tati koji je verovao da ću uspeti, a sada me sigurno odozgo gleda sa osmehom.*

# Ispitivanje kvaliteta i biološkog potencijala bukovače (*Pleurotus ostreatus*) i analiza mogućnosti gajenja na celuloznom otpadu prehrambene industrije

## REZIME

*P. ostreatus* gajena na otpadima iz prehrambene industrije: komini grožđa, ljusci soje i suncokreta, pokazala je izuzetne karakteristike u pogledu određenih kvalitativnih parametara. Postavljena su dva matematička modela kako bi ocenili ukupni indeks kvaliteta (TQI): kvalitativnih parametara svežih plodonosnih tela i parametara produktivnosti supstrata na kojima su gljive gajene. U pogledu ukupnog kvaliteta parametara produktivnosti, uzorci sa dodatkom sojine ljuske ostvarili su najbolje rezultate, dok su uzorci gajeni na supstratu sa većim sadržajem komine grožđa pokazali najbolja hemijska svojstva. Prvi put su analizirana citotoksična i genotoksična svojstva, a rezultati pokazuju da je maksimalni rok trajanja *P. ostreatus* koji omogućava očuvanje ukupnog kvaliteta sedam dana.

Senzorne i fizičke karakteristike organske bukovače pripremljene metodama *sous-vide* i kuvanjem su analizirane radi procene efekata različitih temperatura i vremenskih režima. Radi promovisanja nutritivne koristi organske bukovače i poboljšanja ukusa, dodati su origano i majčina dušica, a gljive su izložene *sous-vide* tretmanima na 60°C tokom 20' i 30'. Senzorna evaluacija uključila je testiranje intenziteta začina, prihvatljivosti i prepoznatljivosti uz korišćenje analize glavnih komponenti. Čisti ekstrakti soka *sous-vide* koji sadrže začine i gljive prvi put su analizirani na antimikrobnu aktivnost. Dok su ocene prihvatljivosti i intenziteta promene boje bile više za one sa višim sadržajem majčine dušice, antimikrobna svojstva su pokazali uzorci sa maksimalnim udelom origana. Ovim istraživanjem dokazano je poboljšanje senzornih svojstava gljiva primenom praktičnog kulinarskog tretmana i dodavanjem odabranih začina, umnožavajući njihove zdravstvene koristi očuvanjem korisnih jedinjenja.

**Ključne reči:** *Pleurotus ostreatus*; prehrambeni otpad; supstrat; komina grožđa; ljuska soje; ljuska suncokreta; ukupni indeks kvaliteta; senzorno ispitivanje; *sous-vide*; začini;

**Naučna oblast:** Tehnološko inženjerstvo

**Uža naučna oblast:** Upravljanje bezbednošću i kvalitetom hrane

**UDK broj:** 635.82:676.014(043.3)

# **Examination of the quality and biological potential of the oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) and analysis of the possibility for growing on cellulose food industry waste**

## **ABSTRACT**

*P. ostreatus* cultivated on the food industry wastes: grape pomace, soybean and sunflower seed husk, exhibited outstanding characteristics in terms of certain qualitative parameters. Two mathematical indices were established to assess the total quality index (TQI): the qualitative parameters of fresh fruiting bodies and the productivity parameters of the substrates on which the fungi were cultivated. In terms of the overall quality of productivity parameters, samples with addition of soybean husk achieved the best results, while samples cultivated on a substrate with higher grape pomace content exhibited the best chemical properties. For the first time, emphasis was placed on examining cytotoxic and genotoxic properties. The results show that the maximum shelf life of *P. ostreatus* that allows overall quality to be maintained is seven days.

The sensory and physical properties of organic oyster mushrooms prepared by the *sous-vide* and cooking culinary method were analyzed to evaluate the effects of different temperature and time regimes. To promote organic oyster mushroom's nutritional benefits and improve its taste, oregano and thyme were added and mushrooms were exposed to *sous-vide* treatments at 60°C for 20' and 30'. Sensory evaluation was focused on testing spice intensity, likeability, and recognizability with principal component analysis employed. *Sous-vide* pure juice extracts were analyzed for the first time for antibacterial activity. While the likeability scores and color changes were higher for those with higher thyme content, the antibacterial results were the most prominent when the highest amount of oregano was added. The research highlights the sensory improvement of mushrooms using the convenient cooking treatment and adding selected spices, altogether multiplying their health benefits by preserving beneficial compounds.

**Key words:** *Pleurotus ostreatus*; food waste; substrate; grape pomace; soybean husk; sunflower seed husk; total quality index; sensory evaluation; *sous-vide*; spices;

**Scientific field:** Technological engineering

**Scientific subfield:** Food safety and quality management

**UDC number:** 635.82:676.014(043.3)

## SADRŽAJ:

LISTA SKRAĆENICA.....	I
LISTA TABELA.....	IV
LISTA SLIKA.....	VI
1. Uvod.....	1
2. Pregled literature.....	3
2.1. Odpadi iz prehrambene proizvodnje, otpadi od žitarica i otpadi od voća i orašastih plodova korišćeni za gajenje gljive <i>P. ostreatus</i> : pregled.....	4
2.2. Potencijal prehrambenog otpada .....	7
2.3. Istraživanja koja obuhvataju supstrate za proizvodnju <i>P. ostreatus</i> : proizvodnja supstrata.....	7
2.4. Hemijske analize lignoceluloznih supstrata koji potiču od prehrambenog otpada .....	8
2.5. Sastav supstrata od prehrambenih otpada korišćenih za gajenje gljiva .....	9
2.6. Produktivnost rasta <i>P.ostreatus</i> na supstratima sa različitim otpadima od hrane.....	10
2.7. Hemijske analize plodonosnih tela <i>P. ostreatus</i> gajenih na supstratima od prehrambenog otpada ..	11
3. Ciljevi istraživanja doktorske disertacije.....	13
4. Materijal i metode.....	14
4.1. Gajenje bukovače na različitim celuloznim otpadima iz prehrambene industrije .....	14
4.1.1. Prehrambeni otpadi korišćeni za gajenje <i>P. ostreatus</i> .....	14
4.1.2. Priprema čiste i matične kulture gljive <i>P. ostreatus</i> .....	14
4.1.3. Priprema supstrata za gajenje gljive <i>P. ostreatus</i> .....	14
4.1.4. Formiranje primordijuma i branje plodonosnih tela <i>P. ostreatus</i> .....	15
4.1.5. Procena pogodnosti supstrata za gajenje bukovače – analiza produktivnosti i hemijska analiza supstrata i plodonosnih tela .....	20
4.1.5.1. Evaluacija produktivnosti supstrata korišćenih za gajenje gljive <i>P. ostreatus</i> .....	20
4.1.5.2. Elementalna analiza plodonosnih tela i supstrata.....	20
4.1.5.3. Određivanje ukupnih rastvorljivih i nerastvorljivih vlakana .....	20
4.1.6. Analiza svežih plodonosnih tela bukovače gajene na prehrambenom otpadu.....	20
4.1.6.1. Priprema plodonosnih tela za analize.....	20
4.1.6.2. Analiza profila teksture .....	21
4.1.6.3. Analiza promene boje.....	21
4.1.6.3. Analiza propustljivosti ćelijske membrane.....	21
4.1.6.4. Mikrobiološka analiza plodonosnih tela gljive <i>P. ostreatus</i> .....	22
4.1.7. Ukupan indeks kvaliteta - TQI .....	22
4.1.8. Analiza ekstrakata plodonosnih tela bukovače gajene na prehrambenom otpadu.....	23
4.1.8.1. Priprema sirovih vodenih ekstrakata .....	23
4.1.8.2. Hemijske analize sirovih vodenih ekstrakata.....	23

4.1.8.2.1. Ukupan sadržaj fenolnih jedinjenja .....	23
4.1.8.2.2. Ukupan sadržaj polisaharida .....	23
4.1.8.2.3. Ukupan sadržaj proteina .....	23
4.1.8.2.4. Određivanje antioksidativne aktivnosti – sposobnost neutralizacije DPPH slobodnih radikala .....	24
4.1.8.2.5. Određivanje antioksidativne aktivnosti – sposobnost neutralizacije ABTS slobodnih radikala .....	24
4.1.8.2.6. FT-IR spektroskopija .....	24
4.1.8.3. Analiza rizika: Citotoksični potencijal ekstrakata gljive <i>P. ostreatus</i> .....	24
4.1.8.4. Analiza rizika: Genotoksični potencijal ekstrakata gljive <i>P. ostreatus</i> .....	25
4.2. Analiza parametara kvaliteta bukovače nabavljene iz standardne proizvodnje sa dodatkom začinskog bilja podvrgnute različitim kulinarskim metodama .....	26
4.2.1. Poreklo gljiva korišćenih za istraživanje .....	26
4.2.2. Priprema gljiva za eksperiment .....	26
4.2.3. Primjenjene kulinarske metode i faze eksperimenta .....	26
4.2.3.1. Preliminarna faza istraživanja.....	26
4.2.3.2. Glavna faza istraživanja.....	27
4.2.4. Postupak senzorne evaluacije .....	28
4.2.5. Analiza promene boje kulinarski obrađenih gljiva .....	29
4.2.6. Analiza profila teksture kulinarski obrađenih gljiva.....	29
4.2.7. Priprema vodenih ekstrakata organske gljive <i>P. ostreatus</i> i odabranog začinskog bilja .....	29
4.2.8. Priprema ekstrakta čistog soka organske gljive <i>P. ostreatus</i> sa dodatkom odabranog začinskog bilja obrađene kulinarskom metodom <i>Sous-vide</i> .....	30
4.2.9. Mikrodilucioni test .....	30
4.2.10. Metoda šahovske table (Checkerboard assay) .....	30
4.3. Statistička analiza podataka.....	31
5. Rezultati i diskusija .....	32
5.1. Hemijski sastav supstrata korišćenih za gajenje gljive <i>P. ostreatus</i> .....	32
5.2. Rezultati analize svežih gljiva .....	33
5.2.1. Rezultati produktivnosti gljiva .....	33
5.2.2. Rezultati analize teksture gljiva .....	36
5.2.3. Rezultati analize boje gljiva.....	39
5.2.4. Propustljivost ćelijske membrane gljiva .....	39
5.2.5. Rezultati mikrobiološke analize gljiva .....	40
5.2.6. TQI indeks – pokazatelj ukupnog kvaliteta gljive <i>P.ostreatus</i> .....	42
5.3. Rezultati analiza sirovih vodenih ekstrakata gljive <i>P. ostreatus</i> .....	44
5.3.1. Hemijski sastav sirovih vodenih ekstrakata: ukupni polifenoli, polisaharidi i proteini .....	44



5.3.2. Rezultati hemijske analize sirovih vodenih ekstrakata: određivanje antioksidativne aktivnosti – sposobnost neutralizacije ABTS i DPPH slobodnih radikala .....	48
5.3.3. Rezultati analize rizika: Citotoksični i genotoksični potencijal sirovih vodenih ekstrakata .....	49
5.4. Rezultati FT-IR spektroskopije .....	55
5.5. Rezultati analize parametara kvaliteta bukovače nabavljene iz standardne proizvodnje sa dodatkom začinskog bilja podvrgnute različitim kulinarskim metodama .....	58
5.5.1. Rezultati preliminarnog senzornog ispitivanja .....	58
5.5.2. Rezultati glavne faze senzornog ispitivanja bukovače: tretman kuvanjem i metodom <i>sous-vide</i> .....	58
5.5.2.1. Senzorni profil bukovače pripremljene različitim kulinarskim metodama .....	58
5.5.2.2. Karakteristike boje organske bukovače.....	60
5.5.2.3. Teksturna svojstva organske bukovače.....	63
5.5.3. Rezultati glavne faze senzornog ispitivanja bukovače sa dodatkom začinskog bilja: tretman metodom <i>sous-vide</i> .....	63
5.5.3.1. Senzorni profil bukovače sa dodatkom začinskog bilja pripremljene metodom <i>sous-vide</i> ...	63
5.5.3.2. PCA analiza – Analiza glavnih komponenata .....	65
5.5.3.3. Karakteristike boje organske bukovače sa dodatkom začinskog bilja .....	66
5.5.4. Antimikrobna svojstva začinskog bilja i ekstrakata bukovače .....	70
5.5.5. Antimikrobna svojstva <i>sous-vide</i> soka bukovače sa dodatkom začina.....	72
6. Zaključak.....	73
7. LITERATURA.....	74
PRILOZI .....	91
Prilog 1 – Upitnik senzorne analize organskih bukovača pripremljenih pomoću tri kulinarske metode: (1) blanširanje u vreloj vodi na 88°C tokom 2 minuta (kontrola), (2) kuvanje na 80°C tokom 60 minuta - samo bukovača i bukovača sa dodatkom začinskog bilja i (3) <i>sous-vide</i> (60°C tokom 22 minuta) - samo bukovača i bukovača sa dodatkom začinskog bilja .....	91
Prilog 2 – Upitnik intenziteta senzornih svojstava bukovače podvrgnute kulinarskoj metodi <i>sous-vide</i> na različitim temperaturama, koji uključuje skalu stepena i smera razlika u odnosu na kontrolni proizvod..	93
Prilog 3 - Upitnik intenziteta senzornih svojstava bukovače podvrgnute kulinarskoj metodi kuvanje sa različitim vremenskim trajanjem, koji uključuje skalu stepena i smera razlika u odnosu na kontrolni proizvod .....	96
Prilog 4 – Upitnik intenziteta senzornih i teksturnih svojstava bukovače sa dodatkom začinskog bilja, koji uključuje skalu intenziteta odabranih senzornih atributa, kao i skalu dopadljivosti proizvoda .....	99
BIOGRAFIJA KANDIDATA.....	101
Izjava o autorstvu .....	102
Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada .....	103
Izjava o korišćenju .....	104

## LISTA SKRAĆENICA

a\* - udeo crvene boje (Redness)

ABTS – 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina) (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid))

ADF - analiza kiselog detergentskog vlakna (analysis of acid detergent fiber)

ADL – sadržaj lignina (Acid detergent lignin)

ANOVA - Statistička metoda analize varijanse (Analysis of variance)

ATCC – Američka organizacija za distribuciju standardnih referentnih mikroorganizama (American Type Culture Collection)

b\* - udeo žute boje (Yellowness)

BI - indeks braon boje (Browning Index)

BE – biološka efikasnost (biological efficiency)

BHA – beta hidoksilana kiselina (beta hydroxy acid)

BSA - goveđi serumski albumin (bovine serum albumine)

CVS - kompjuterski vizuelni sistem (Computer Vision System)

CFU – jedinica mere broja živih kolonija (colony forming unit)

DMSO – dimetil sulfoksid

DPPH• - 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil slobodni radikal (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl free radical)

DW - suva masa (dry weight)

EC<sub>50</sub> - efikasna koncentracija ekstrakta gljive potrebna da pokaže 50% svoje antioksidativne sposobnosti

EL – curenje elektrolita (electrolytic leakage)

FAO – Organizacija za hranu i poljoprivredu Ujedinjenih Nacija (Food and Agriculture Organization of the United Nations)

FAOSTAT - Organizacija za hranu i poljoprivredu Ujedinjenih Nacija: Statistika (Food and Agriculture Organization of the United Nations: Statistics)

FICI – Fractional inhibitory concentration index

FRAP - sposobnost redukcije feri jona (ferric reducing antioxidant power)

FTIR - Infracrvena spektroskopija sa Fourierovom transformacijom (Fourier Transform Infrared spectroscopy)

FW - sveža masa (fresh weight)

GAE - ekvivalent galne kiseline (gallic acid equivalent)

GLU – glukoza (D-glucose)

HCT116 - ćelije kolorektalnog karcinoma (human colorectal carcinoma cell line)

IC<sub>25</sub> - inhibitorna koncentracija ekstrakta gljive potrebna da pokaže 25% svoje antimikrobne sposobnosti

ili

IC<sub>10</sub> - inhibitorna koncentracija ekstrakta gljive potrebna da pokaže 10% svoje antimikrobne sposobnosti

ISO - Međunarodna organizacija za standardizaciju (International Organization for Standardization)

L\* - svetloća (Lightness)

LMP – Agaroza sa niskom tačkom topljenja (Low melting point agarose)

MAP – pakovanje sa modifikovanom atmosferom (Modified atmosphere packaging)

MIRCA – Minimalna količina informacija za objavljivanje rezultata Comet metode (Minimum Information for Reporting on the Comet Assay)

MIC – minimalna inhibitorna koncentracija (Minimum inhibitory concentration)

MRSA - *Staphylococcus aureus* otporan na meticilin (Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*)

MTT – 3-(4,5-difeniltiazol-2-il)-2,5 difenil tetrazolium bromid (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5 diphenyl tetrazolium bromide)

MRC-5 - ćelijski soj 5 Saveta za medinska istraživanja (Medical Research Council cell strain 5); linija diploidne ćelijske kulture koja se sastoji od fibroblasta, razvijenih iz plućnog tkiva fetusa

NDF - analiza neutralnog detergentskog vlakna (analysis of neutral detergent fiber)

NMP – Agaroza sa normalnom tačkom topljenja (Normal melting point agarose)

NP - Azot-protein (Nitrogen – protein)

PCC – ukupan broj psihrotrofnih mikroorganizama (psychrotrophic colony count)

PCA – analiza glavnih komponenata (Principal component analysis)

PC 1 – prva glavna komponenta

PC 2 – druga glavna komponenta

pH – mera aktivnosti vodonikovih jona u rastvoru

QI – Indeks kvaliteta (Quality index)

SBN – ljuska soje (soybean husk)

SEO – Industrija semenki i jestivih ulja (The seed and edible oil industry)

SFW – ljuska suncokreta (sunflower seed husk)

SI – selektivni indeks (selectivity index)

TCC - ukupan broj mezofilnih mikroorganizama (total colony count)

TEP – ukupna količina proteina (total extracted protein)

TI - intenzitet repa, procenat DNK u repu kometa (tail intensity)

TQI – Ukupan indeks kvaliteta (Total quality index)

TPA - Metoda analize instrumentalnog profila (Texture Profile Analysis)

TPC – ukupan sadržaj polifenola (total phenolic content)

TPS – ukupna količina polisaharida (total polysaccharide content)

TPOMW – dvofazni otpad od maslinovog ulja (two-phase olive mill waste)

Trolox – Analog Vitamina E rastvorljiv u vodi ( $\pm$ )-6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilchroman-2-karboksilna kiselina (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid)

WI - Indeks bele boje (Whiteness Index)

WS – pšenična slama (wheat straw)

YM - kvasci i plesni (yeasts and molds)

$\Delta E$  - ukupna razlika boje (Total color difference)

4NQO – kinolin (4-Nitroquinoline 1-oxide)

100P - 100% komina grožđa (pomace)

80P20S - 80% komina grožđa: 20% pšenična slama

50P50S - 50% komina grožđa: 50% pšenična slama

20P80S - 20% komina grožđa: 80% pšenična slama

100S – kontrolni uzorak 100% pšenična slama

100TH – 100% Majčina dušica

75TH25OR – 75% Majčina dušica: 25% Origano

50TH50OR – 50% Majčina dušica: 50% Origano

25TH75OR – 25% Majčina dušica: 75% Origano

100OR – 100% Origano

## LISTA TABELA

**Tabela 1.** Sastav supstratnih smeša korišćenih za gajenje gljive *P.ostreatus*

**Tabela 2.** Kulinarske metode sa odgovarajućim režimima temperature i vremena primenjene samo na gljive u prvom delu glavnog eksperimentalnog stadijuma

**Tabela 3.** Kulinarske metode sa odgovarajućim režimima temperature, vremena i dodatim začinima primenjene u drugom delu glavnog eksperimentalnog stadijuma

**Tabela 4.** Elementalna analiza uzoraka gljive *P. ostreatus* gajenih na komini grožđa, kontrolnog uzorka i komine grožđa kao supstrata

**Tabela 5.** Suva materija, NDF, ADF, lignin, hemicelulozni i celulozni sastav supstrata od pšenične slame, sojine i suncokretove ljsuske pre i posle plodonošenja

**Tabela 6.** Sastav supstrata korišćenog za inokulaciju micelijuma i uticaj komine grožđa kao supstrata na produktivnost gljive *P. ostreatus*

**Tabela 7.** Sastav supstrata korišćenog za inokulaciju micelijuma i uticaj ljsuske soje i suncokreta kao supstrata na produktivnost gljive *P. ostreatus*

**Tabela 8.** Uticaj komine grožđa kao supstrata na karakteristike teksture i boje gljive *P. ostreatus*

**Tabela 9.** Uticaj ljsuske soje i suncokreta kao supstrata na karakteristike teksture i boje gljive *P. ostreatus*

**Tabela 10.** Uticaj komine grožđa kao supstrata na curenje elektrolita iz tkiva plodonosnog tela gljive *P. ostreatus*

**Tabela 11.** Uticaj ljsuske soje i suncokreta kao supstrata na curenje elektrolita iz tkiva plodonosnog tela gljive *P. ostreatus*

**Tabela 12.** Uticaj komine grožđa kao supstrata na mikrobiološke karakteristike plodonosnog tela *P. ostreatus*

**Tabela 13.** Uticaj ljsuske soje i suncokreta kao supstrata na mikrobiološke karakteristike plodonosnog tela *P. ostreatus*

**Tabela 14.** Ukupna količina fenolnih jedinjenja, ekstrahovanih proteina i polisaharida u vodenim ekstraktima *P. ostreatus* gajenih na komini grožđa

**Tabela 15.** Citotoksičnost ekstrakata gljive *P. ostreatus* gajene na komini grožđa

**Tabela 16.** Preliminarna senzorna evaluacija bukovače pripremljene sa tri odabrana začina (majčina dušica, crni biber i origano)

**Tabela 17.** Efekti vremena kuvanja na karakteristike boje gljiva (šešir, ivica šešira i himenijum)

**Tabela 18.** Efekti temperature kulinarskog tretmana *sous-vide* na karakteristike boje gljiva (šešir, ivica šešira i himenijum)

**Tabela 19.** Efekti kulinarske metode, temperature i vremena na teksturne karakteristike gljiva

**Tabela 20.** Korelaciona zavisnost između originalnih promenljivih (ispitivanih senzornih karakteristika) i ekstrahovanih glavnih komponenata kao rezultat analize glavnih komponenata primenjene na rezultate deskriptivne senzorne analize uzoraka bukovače pripremljenih *sous-vide* kulinarskom metodom sa različitim kombinacijama i količinama dodatih začina i dva vremenska režima

**Tabela 21.** Efekti kombinacije i količine dodatih začina, kao i vremena tretmana na karakteristike boje gljiva (šešir, ivica šešira i himenijum)

**Tabela 22.** MIC vrednosti (Minimalna inhibiciona koncentracija) sirovih ekstrakata origana, crnog bibera, majčine dušice i organske bukovače određene su u mikrodilucijskom testu

**Tabela 23.** Tip interakcije antimikrobne aktivnosti između začina i gljive *P.ostreatus* u metodi šahovske table (eng. checkerboard assay)

**Tabela 24.** MIC vrednosti ekstrakata čistog soka gljive *P.ostreatus* sa začinima određene u mikrodilucionom testu

## LISTA SLIKA

**Slika 1.** Sankey dijagram najčešće upotrebljenih otpada iz prehrambene proizvodnje, otpada od žitarica i otpada od voća i orašastih plodova za proizvodnju gljive *P. ostreatus*

**Slika 2.** Pregled ključnih reči na engleskom jeziku korišćenih u studijama posvećenim upotrebi supstrata od otpada hrane za proizvodnju gljive *P. ostreatus*: generisan programom VOSviewer

**Slika 3.** Prikaz inokulacije micelijuma, proizvodnje čiste i matične kulture gljive *P. ostreatus*: 1) proizvodnja čiste kulture; 2) i 3) priprema matične kulture; 4) prikaz inkubacione komore (25°C); 5) rast micelijuma

**Slika 4.** Prikaz pripreme supstrata korišćenih za proizvodnju gljive *P.ostreatus*: 1) Slama – kontrola; 2) Ljuska suncokreta; 3) Komina grožđa; 4) Ljuska soje; 5) Inkubaciona komora: 25°C, relativna vlažnost 85%

**Slika 5.** Prikaz proizvodnog tunela u kojima se odvijala fruktifikacija gljive *P.ostreatus*: 1) proizvodni tunel; 2) prikaz normalnog osvetljenja u proizvodnom tunelu; 3) pojava primordijuma

**Slika 6.** Prikaz procesa fruktifikacije i izgleda plodonosnih tela *P. ostreatus* tokom rasta i neposredno pre branja

**Slika 7.** TQI indeks – indeks ukupnog kvaliteta kvalitativnih parametara svežih plodonosnih tela *P.ostreatus*, koji obuhvata sledeće: analiza profila teksture (tvrdoća, kohezivnost i elastičnost), karakteristike boje (ukupna razlika boje, indeks braon boje i indeks žute boje), curenje elektrolita i mikrobiološke karakteristike (ukupan broj mikroorganizama, *Enterobacteriaceae*, psihrotrofni mikroorganizmi, ukupan broj kvasaca i plesni).

**Slika 8.** TQI indeks – indeks ukupnog kvaliteta parametara produktivnosti supstrata na kojima je gajena gljiva *P.ostreatus*, koji obuhvata sledeće: brzina rasta micelijuma u džakovima sa supstratom (mm/dan), vreme završetka rasta micelijuma (dani), vreme potrebno za formiranje primordiuma (dani), vreme potrebno za sazrevanje plodonosnih tela (dani), ukupan prinos gljiva (g) i biološka efikasnost supstrata (BE).

**Slika 9.** Antioksidativna svojstva bukovače gajene na supstratnim mešavinama sa kominom grožđa: sposobnost neutralizacije ABTS i DPPH slobodnih radikala

**Slika 10.** Hemijska analiza gljive *P. ostreatus* gajenih na ljusci soje i suncokreta: a) ukupan sadržaj polifenola; b) ukupan sadržaj polisaharida; c) ukupan sadržaj proteina; d) sposobnost neutralizacije ABTS slobodnih radikala; e) sposobnost neutralizacije DPPH slobodnih radikala.

**Slika 11.** Preživljavanje ćelija tretiranih ekstraktima *P. ostreatus* gajenih na komini grožđa kombinaciji sa pšeničnom slamom nultog dana skladištenja: A) MRC-5 ćelijska linija; B) HCT 116 ćelijska linija. Prag od 80% preživljavanja se smatra indikacijom niskog citotoksičnog efekta.

**Slika 12.** Preživljavanje MRC-5 ćelija tretiranih ekstraktima *P. ostreatus* gajenih na sojinoj i suncokretovoj ljusci u kombinaciji sa pšeničnom slamom: A) dan 0; B) dan 14. Prag od 80% preživljavanja se smatra indikacijom niskog citotoksičnog efekta.

**Slika 13.** Preživljavanje HCT 116 ćelija tretiranih ekstraktima *P. ostreatus* gajenih na sojinoj i suncokretovoj ljusci u kombinaciji sa pšeničnom slamom: A) dan 0; B) dan 14. Prag od 80% preživljavanja se smatra indikacijom niskog citotoksičnog efekta.

**Slika 14.** Genotoksičnost ekstraktata gljiva (nulti dan skladištenja) prema A) fetalnim fibroblastima pluća MRC-5 (ECACC 84101801) i B) ćelijama kolorektalnog kancera HCT116 (ATCC CCL-247).

**Slika 15.** FTIR spektri plodonosnih tela gljive *P. ostreatus* gajene na različitim supstratima: A) slama (100%) – 100S; B) otpad od grožđa (100%) – 100P; C) 80% otpad od grožđa, 20% slama – 80P20S; D) 50% otpad od grožđa, 50% slama – 50P50S; E) 80% slama i 20% otpad od grožđa – 80S20P.

**Slika 16.** Senzorni profil gljiva tretiranih različitim kulinarskim metodama, temperaturama i vremenima: (a) kuvanje na 80°C tokom 30' i 60', u poređenju sa 45' za kontrolu; (b) *sous-vide* tokom 10' na 60°C i 80°C, u poređenju sa 70°C za kontrolu. Srednje vrednosti sa različitim malim slovima znače da su statistički značajno različite ( $p < 0,05$ ).

**Slika 17.** Slike i kolor čipovi gljiva tretiranih različitim kulinarskim metodama, temperaturama i vremenom (šešir, ivica i himenijum). (a) kuvanje na 80°C tokom 30', 40', 45' (kontrola), 50' i 60' (b) *sous-vide* na 50°C, 60°C, 70°C (kontrola), 80°C i 90°C tokom 10'.

**Slika 18.** Intenzitet arome začina u poređenju sa uobičajenom začinjenosti hrane i dopadljivost organske bukovače sa dodatkom začina a) *sous-vide* 60° 20'; b) *sous-vide* 60° 30'

**Slika 19.** Rezultati deskriptivne senzorne analize uzoraka bukovače pripremljenih *sous-vide* kulinarskom metodom sa različitim kombinacijama i količinama dodatih začina i dva vremenska režima, nakon primene analize glavnih komponenata (PCA) na srednje vrednosti standardizovanih ocena intenziteta osam senzornih karakteristika.

**Slika 20.** Dendrogram hijerarhijske klaster analize uzoraka bukovače pripremljenih *sous-vide* kulinarskom metodom sa različitim kombinacijama i količinama dodatih začina i dva vremenska režima, nakon primene analize glavnih komponenata (PCA).

**Slika 21.** Slike i kolor čipovi sa aromatičnim začinima u odnosu na različita vremena *sous-vide* tretmana (šešir, ivica i himenijum). 100TH—100% majčina dušica; 75TH25OR—75% majčina dušica: 25% origano; 50TH50OR—50% majčina dušica: 50% origano; 25TH75OR—25% majčina dušica: 75% origano; 100OR—100% origano. Kontrolni uzorci: *Sous-vide* režim, bez dodatka začina, 60°C 20' i 60°C 30'.



## 1. Uvod

*Pleurotus ostreatus* (Jacq. ex Fr.) P. Kummer (1871) (Bukovača) je jedna od najzastupljenijih vrsta gljiva na svetskom prehrambenom tržištu. Smatra se funkcionalnom hranom, koja se koristi za ishranu širom sveta kao delikates, s obzirom na njen prijatan ukus i nutritivni kvalitet (Xu i sar., 2011; Kalač, 2013). *P. ostreatus* je druga vrsta jestivih gljiva po obimu industrijske proizvodnje na svetskom tržištu, i jedna od najčešće konzumiranih gljiva u Kini (Belletini i sar., 2019). Bioaktivna jedinjenja i sekundarni metaboliti *P. ostreatus* sa svojim antioksidativnim, antiinflamatornim i antimikrobnim svojstvima, privlače pažnju kako nauke tako i javnosti (Doroški i sar., 2021; Xu i sar., 2011). Ova jedinjenja poboljšavaju odbrambene mehanizme i smanjuju oksidativna oštećenja ćelija (Kozarski i sar., 2011). Osim toga, *P. ostreatus* pokazuje širok spektar bioloških aktivnosti, kao što su hipoglikemijsko svojstvo sa posebno značajnim preventivnim uticajem na Dijabetes melitus, kao i na poremećaj holesterola i lipida (Meetoo i sar., 2007; Nesto, 2008).

Iako savremeno doba nosi brojne prednosti ne treba zaboraviti na prateće probleme među kojima je i zagađenje životne sredine. Savremene tehnologije uspevaju samo da smanje zagađenje bez uspeha u njegovom eliminisanju. Otpad od hrane, koji potiče iz primarne poljoprivredne proizvodnje, domaćinstava, distribucije hrane ili prehrambene proizvodnje, ima značajan udeo u ukupnom otpadu (Djekic i sar., 2018). Dok se velika pažnja posvećuje izgledu i veličini deponija, mikrobiološka kontaminacija i pretnja klimatskim promenama, kao i sveukupno stvaranje globalnih ekoloških problema, nose još veći rizik. Strategija izolacije otpadnih materijala velikog vrednosnog potencijala predstavlja održivu strategiju upravljanja otpadom od hrane. Naime, ovaj koncept uključuje reciklažu otpada izolacijom sirovog otpada od hrane koji će biti uključen u novi proizvodni proces, čime se dobijaju proizvodi sa visokom dodatom vrednošću uz generisanje ciklusa sa minimalnom količinom otpada (engl. “near zero-waste”) (Djekic i sar., 2019b; Morone i sar., 2017).

*P. ostreatus* pripada grupi gljiva “bele truleži”, koja poseduje sposobnost da razgradi celulozu, hemicelulozu i lignin sekrecijom enzima – lakaze i peroksidaze (Tsujiyama i Ueno, 2013). Mnogi prehrambeni i poljoprivredni otpadi bogati su lignoceluloznim jedinjenjima, što ih čini visokokvalitetnim supstratima za gajenje jestivih gljiva, kao zamena za uobičajeno korišćenu pšeničnu slamu (Belletini i sar., 2019). Ova činjenica ukazuje na to da je *P. ostreatus* visokokvalitetna namirnica koja potiče od otpada niske ekonomske vrednosti (Grimm i Wösten, 2018).

Najnoviji pregled upotrebe različitih vrsta otpada od hrane za kultivaciju *P. ostreatus* (Doroški i sar., 2022) naglašava potrebu za daljim istraživanjima u optimizaciji veze otpada od hrane i kultivacije gljive *P. ostreatus*. Objavljena istraživanja obuhvataju vrstu *Pleurotus* spp. kultivisane na različitim prehrambenim otpadima, kao što su komina od grožđa (Doroški i sar., 2021), otpad crnog luka (Pereira i sar., 2017), otpad od maslinovog ulja (Avni i sar., 2017), kafa (Carrasco-Cabrera i sar., 2019), itd. Sojino zrno je korišćeno u obliku brašna kao dodatak istrošenom supstratu gljiva ispoljavajući efekat u novom ciklusu gajenja (Economou i sar., 2017), dok je ljuska suncokreta korišćena u mešavini sa pšeničnom slamom kao supstrat za gajenje *P. ostreatus* (Myronycheva i sar., 2017). Takođe, vrsta i hemijski sastav otpada koji se koristi kao supstrat za gajenje jestivih gljiva utiče na nutritivni profil i produktivnost proizvedene gljive (Rashad i sar., 2019; Shashirekha i sar., 2005).

Na kraju lanca proizvodnje jestivih gljiva, krajnji potrošači su, osim nutritivne vrednosti, zainteresovani i za njihov kvalitet. Da bi se kvalitet ocenio, često se koristi indeks ukupnog kvaliteta (TQI) kao metodološki pristup. On se definiše kvantifikacijom različitih kombinacija odabranih parametara, kao što su parametri profila teksture, promene boje, mikrobiološki kvalitet, senzorni profil, itd. Ovaj matematički pristup zahteva evaluaciju odabranih parametara, sa određenim ograničenjima, kao što su odsustvo jedinstvenog sistema bodovanja sposobnog da objasni ukupan kvalitet i nemogućnost davanja prednosti određenim parametrima na osnovu

njihove važnosti. Stoga je razvijen jedinstveni indeks kvaliteta kao zajednička ukupna vrednost parametara (Djekic i sar., 2017). Ova metoda već se koristi za ispitivanje ultrazvučno tretiranih sokova od borovnice i brusnice (Režek Jambrak i sar., 2018), suvih jabuka (Djekic i sar., 2018b), gljiva *Agaricus bisporus* (Djekic i sar., 2017), i gljiva *Pleurotus sapidus* pakovanih u tri različita MAP pakovanja (Wan-Mohtar i sar., 2019).

Prema Aisala i sar., (2018), manji broj istraživanja u pogledu senzornih svojstava jestivih gljiva je iznenađujući s obzirom na veliko interesovanje za konzumaciju gljiva uopšte. S obzirom da su preferencije potrošača prema gljivama raznolike, oni koji ne vole njihov ukus ne bi mogli imati koristi od njihovih zdravstvenih benefita sa postojećim metodama pripreme hrane. Zato je potrebno podsticanje dodatnog ispitivanja koje potencijalno može otkriti alternative metode pripreme za privlačenje novih potrošača i proširenje prakse zdrave ishrane.

*Sous-vide* je novija kulinarska metoda koja se široko koristi u industriji hrane i takozvanoj „prefinjenoj kuhinji“ – (*haute cuisine, Fr.*). Njegova prednost u odnosu na druge zastupljene kulinarske metode, koje privlače pažnju u svetu gastronomije, uključuje smanjenje temperaturne varijacije u toplotnoj obradi i eliminisanje mogućnosti isparavanja i gubitka aromatičnih jedinjenja ili njihovo oslobađanje u medijum u kome se odvija temperaturna obrada (Aisala i sar., 2020). Naime, ova metoda ušla je u interesni fokus naučnika zbog uticaja na produžen rok trajanja hrane uz minimalnu temperaturnu obradu (Shellekens, 1996). S hemijskog aspekta, najzastupljenije aromatične komponente gljiva su kombinacija tri jedinjenja, 1-okten-3-ol, 3-oktenon i metional. Pored toga, bilo koji način obrade (kuvanje, konzervisanje, sušenje) stvara nove isparljive supstance, kao rezultat različitih hemijskih reakcija. Od velikog značaja je i količina reaktivnih jedinjenja koja su već prisutna u sirovim gljivama (Misharina i sar., 2009). Mnogi istraživači su se fokusirali na deskriptivnu senzornu analizu jestivih gljiva i povezanost deskriptora sa njihovim isparljivim aromatičnim jedinjenjima (Aisala i sar., 2018; Politowicz i sar., 2018; Rotola-Pukkila i sar., 2019). Istraživanje Li i sar., (2011) pokazalo je uticaj metoda kuvanja na profil ukusa supe od jestivih gljiva, u pogledu nivoa slobodnih aminokiselina, odvijanja Maillard-ove reakcije i prisustva aromatičnih aktivnih jedinjenja. Naime, toplotna obrada je uticala na gubitak neisparljivih materija u hemijskim reakcijama i izdvajanje isparljivih jedinjenja tokom procesa kuvanja. Na osnovu činjenice da mnogi ljudi ne vole ukus gljiva (Aisala i sar., 2018), začini mogu potencijalno poboljšati ukus i povećati prihvatljivost, osim korisnih i antimikrobnih svojstava kojima začini doprinose (Boskovic i sar., 2015; Radünz i sar., 2021; Salehi i sar., 2019). Crni biber (*Piper nigrum, L.*) je široko zastupljen u svetskoj kuhinji i njegovi sekundarni metaboliti pokazuju benefitarne efekat na zdravlje ljudi (Salehi i sar., 2019). Zatim, začini kao što su majčina dušica (*Timus vulgaris, L.*) i origano (*Origanum vulgare, L.*) pokazuju antioksidativne i antimikrobne efekte zahvaljujući svojim glavnim sastojcima timolu i karvakrolu, a takođe imaju i potencijalne zdravstvene koristi, poput aplikacije putem tradicionalne medicine za lečenje bolesti: dijabetes – *diabetes mellitus* (tip II dijabetesa) i kontrole hroničnih bolesti, smanjenjem nivoa reaktivnih vrsta kiseonika (Radünz i sar., 2021). Antimikrobna svojstva eteričnog ulja origana i bosiljka detaljno su istražena na nekoliko patogenih sojeva: *Salmonella enteritidis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* i *MRSA* (*Staphylococcus aureus* otporan na meticilin) (Boskovic i sar., 2015), što dodatno povećava značaj začinskog bilja kao kulinarskih dodataka.

## 2. Pregled literature

Različite vrste jestivih gljiva se širom sveta konzumiraju kao tradicionalna i funkcionalna hrana (Xu i sar., 2011), a isto tako i kao specijaliteti, s obzirom na specifičan ukus i teksturu koju poseduju (Kalač, 2013). Osim toga, javni i naučni interes raste zbog sekundarnih metabolita i bioaktivnih komponenata prisutnih u jestivim gljivama, koje imaju antioksidativna, antimikrobna, antitumorna, antiviralna i imunomodulatorna svojstva (Xu i sar., 2011; Corrêa i sar., 2016;).

Na osnovu podataka sa sajta FAOSTAT (Engl. Food and Agriculture Organization of the United Nations: Statistics), ukupna svetska proizvodnja jestivih gljiva i tartufa u 2022. godini bila je 48,3 miliona tona, sa ukupnom količinom od 1,36 miliona tona samo u Evropi. Vodeći proizvođač, Kina, proizvela je 45,4 miliona tona jestivih gljiva 2022. godine (FAO, 2024). Jestive gljive koje se najviše proizvode na svetskom nivou su *A. bisporus* (šampinjon), *Lentinula edodes* (šitake) i *P. ostreatus* (bukovača) (Kalač, 2013).

Prema literaturi (Kalač, 2013), jestive gljive se mogu podeliti u tri kategorije, na osnovu njihovog načina ishrane. Prva grupa obuhvata mikorizne ili simbiotske vrste, koje formiraju uzajamno koristan odnos sa domaćinom, korenom drveta. Druga grupa, saprotropske vrste ili saprofiti, crpe nutrijente iz mrtvog organskog materijala. Gljive ove grupe se mogu komercijalno gajiti. Treća grupa, parazitske vrste, žive u nesimbiotskoj vezi sa drugim vrstama.

Što se tiče naučne klasifikacije vrsta *Pleurotus*, one pripadaju *Kraljevstvu Gljiva*, *Diviziji Basidiomycota*, *Klasi Agaricomycetes*, *Redu Agaricales*, *Familiji Pleurotaceae* i *Rodu Pleurotus*, što je definisao Nemački mikolog Paul Kummer, 1871. godine (El-Ramady i sar., 2022).

Jedna od najčešće konzumiranih jestivih vrsta gljiva, *P. ostreatus*, pripada grupi gljiva “bele truleži” (engl. “white rot fungi”), koja proizvodi lignocelulozne enzime – lakaze i peroksidaze, što im omogućava i razgradnju lignina, pored celuloze. Stoga, ova vrsta se može gajiti na raznovrsnim agro-industrijskim, prehrambenim i celuloznim otpadima, kao zameni za uobičajeni supstrat koji se koristi u industrijskoj proizvodnji (Tsujiyama i Ueno, 2013; Bellettini i sar., 2019). Ovo potvrđuje činjenicu da bukovača, među raznovrsnim gljivama bele truleži, predstavlja visoko kvalitetnu hranu koja se gaji na otpadu niskog kvaliteta i ekonomske vrednosti (Grimm i Wösten, 2018).

Pored svog delikatnog ukusa i teksture, rod *Pleurotus* spp. je nutritivno bogata namirnica sa visokim sadržajem proteina i dijetnih vlakana (Rodriguez Estrada i Pecchia, 2017; El-Ramady i sar., 2022). Mnoge studije se fokusiraju na jednostavnost gajenja bukovače, što je postalo privlačno u komercijalnoj i naučnoj praksi (Rodriguez Estrada i Pecchia, 2017). U studiji Rodriguez Estrada i Pecchia (2017) obraća se pažnja na detaljan proces gajenja gljive *P. ostreatus*, uključujući proizvodnju matične kulture, supstrata, kao i na alternativne metode kultivacije, način branja i opasnosti od pojave bolesti u toku plodonošenja i prorastanja micelijuma kroz supstrat. Biodegradacija i enzimska aktivnost *Pleurotus* spp. je tema studije koju su objavili Sekan i sar. (2019), koja ističe zeleni potencijal ove gljive. Aspektu održivosti dodaje vrednost i studija Araújo i sar. (2021), koja se bavi proizvodnjom enzima i prorastanjem micelijuma vrste *Pleurotus* spp., koja je podstaknuta i unapređena zelenim osvetljenjem.

Aspekt iskoristivosti prehrambenog otpada koji su opisali Morone i sar., (2017) je definisan kao održiva strategija upravljanja prehrambenim otpadom sa glavnim ciljem izolovanja vrednog otpadnog materijala. U suštini, izolacija bilo kog otpadnog materijala poteklog iz prehrambene industrije radi upotrebe kao sirovog materijala u novom alternativnom procesu proizvodnje visoko vrednih proizvoda, generiše proizvodni ciklus sa minimalnom količinom otpada (engl. “near zero-waste”) i formira efektivan ciklus cirkularne ekonomije. Korisni aspekti recikliranja prehrambenog otpada su raznoliki i uključuju rešavanje problema zagađenja životne sredine (Djekic i sar., 2019a, b), kao i socijalnih (van Herpen i van der Lans, 2019) i ekonomskih (Philippidis i sar., 2019) globalnih problema.

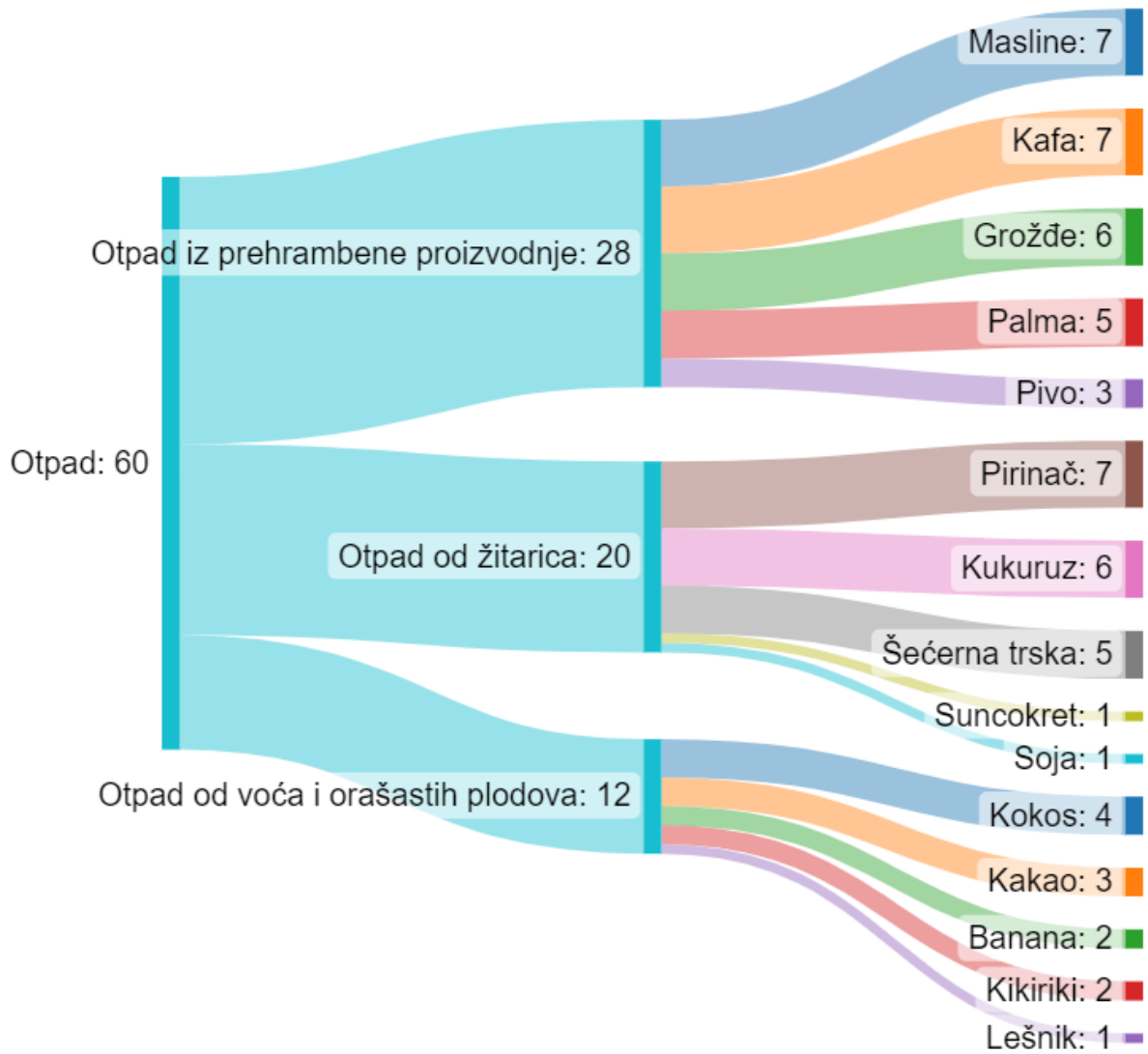
Djekic i sar. (2018) definisali su podsisteme lanaca snabdevanja hranom značajne za stvaranje otpada. Naime, sa stanovišta procene proizvodnog ciklusa, postoje: poljoprivredna primarna proizvodnja ili farme; prerada ili proizvodnja hrane; prodaja ili aktivnosti vezane za distribuciju hrane i pripremu i konzumiranje hrane u kućnim uslovima. Uopšteno, osim korišćenja otpada kao resursa za novi proces proizvodnje, vrlo koristan aspekt recikliranja otpada od hrane je eliminacija zagađenja životne sredine kroz lanac ishrane (Djekic i sar., 2018).

## **2.1. Otpadi iz prehrambene proizvodnje, otpadi od žitarica i otpadi od voća i orašastih plodova korišćeni za gajenje gljive *P. ostreatus*: pregled**

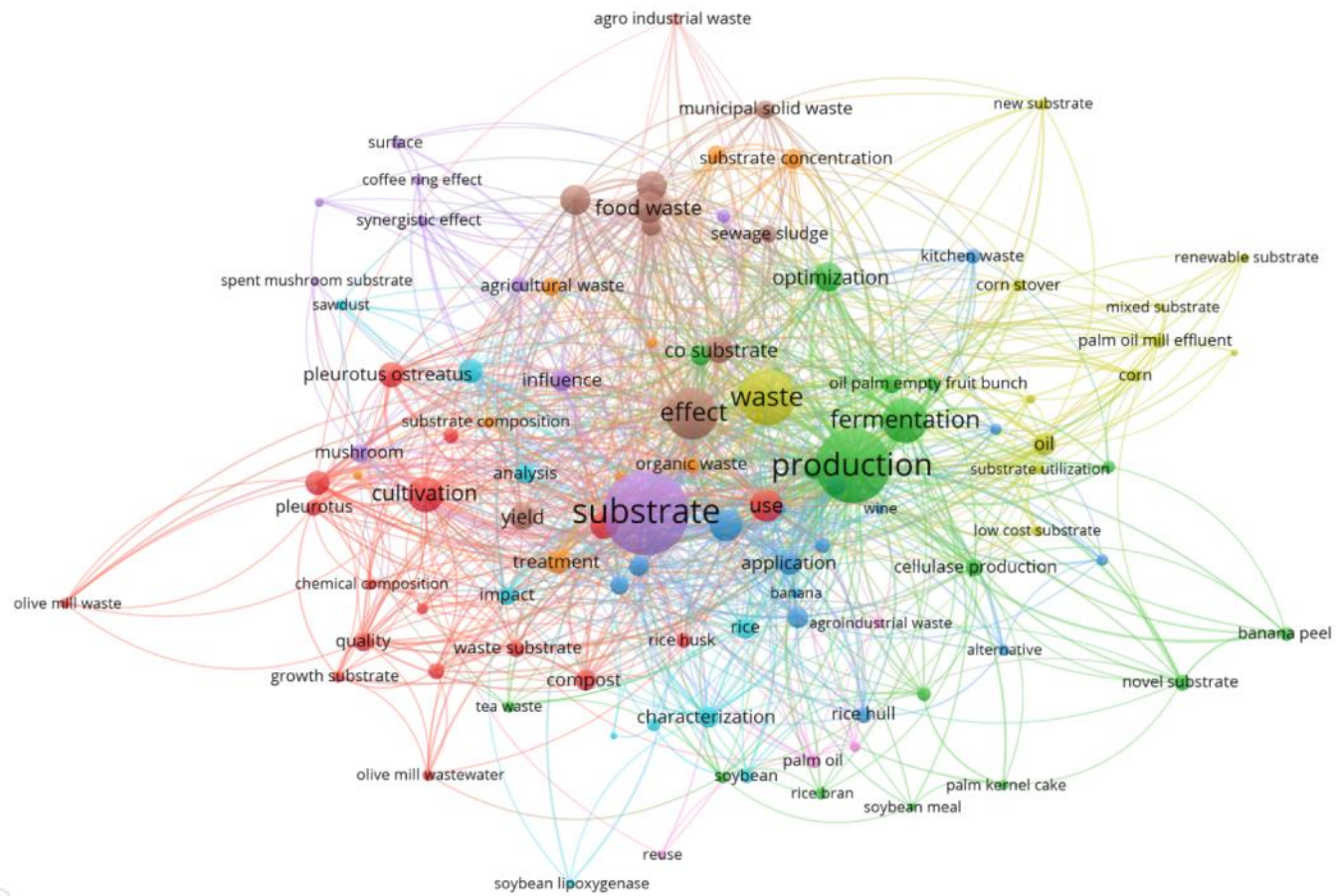
Kako bi se približila najnovija istraživanja i značaj korišćenja otpada od hrane za proizvodnju gljive *P. ostreatus* u periodu od 2017-2022. godine, otpadi od hrane su kategorisani u tri grupe, na osnovu industrijskog porekla: otpadi iz prehrambene proizvodnje, otpadi od žitarica i otpadi od voća i orašastih plodova. Trideset šest odabranih naučnih radova koji se bave prehrambenim otpadom korišćenim za gajenje bukovače i podeljeni prema prethodno navedenoj kategorizaciji, predstavljeni su na Slici 1. Pregled ključnih reči korišćenih u studijama koje pokrivaju upotrebu otpada od hrane za gajenje bukovače, formiran je upotrebom VOSviewer programa uživo i predstavljen na Slici 2. Pregled literature je izveden korišćenjem glavnih karakteristika vezanih za gajenje gljive *P. ostreatus*. Sledeći kriterijumi pretrage su primenjeni kroz Web of Science pretraživač: raspon godina (2017-2022); tip članka (istraživački); ključne reči koje su korišćene na engleskom jeziku („*Pleurotus ostreatus*“, „gajenje“, „otpad od hrane“, „supstrat“). Lista prvih pedeset radova očitanih na Web of Science pretraživaču sužena je na osnovu pomenutih kriterijuma.

Dobijeni podaci, predstavljeni na slikama 1. i 2., definišu najnoviju evaluaciju i važnost korišćenja prehrambenih otpada za gajenje gljive *P. ostreatus* u poslednjih pet godina. Konkretno, Slika 1. Sankey dijagramom prikazuje najčešće korišćene otpade podeljene u tri kategorije koje su prethodno navedene i njihovu frekvenciju pojave u naučnim radovima objavljenim u periodu od 2017-2022. Najčešći otpadi pripadaju kategoriji otpada iz procesa prerade hrane, gde su najviše zastupljeni otpad od maslinovog ulja i kafe. U kategoriji otpada od žitarica, najčešći je otpad od pirinča, zatim kukuruza i šećerne trske. Otpad od voća i orašastih plodova je najmanje prisutan, ali ipak sa značajnim doprinosom.

Pregled ključnih reči korišćenih u studijama koje se tiču supstrata od prehrambenog otpada za gajenje gljive *P. ostreatus* generisan je programom VOSviewer online i prikazan na Slici 2. On ima za cilj da predstavi frekvenciju ponavljanja ključnih reči kroz naučne radove pronađene pomoću navedenih kriterijuma istraživanja. Površina svake tačke koja pripada navedenom grafikonu predstavlja vrednost frekvencije. Dakle, vizuelno najviše pokrivena površina pripada sledećim ključnim rečima: "supstrat", "proizvodnja", "otpad", "efekat", "fermentacija", "gajenje", "otpad hrane", dok ključne reči kao što su "otpadna voda od masline", "ulje palme", "soja", "kora banane", "pirinčano brašno" itd., takođe zauzimaju značajno mesto u opsegu istraživanja.



**Slika 1.** Sankey dijagram najčešće upotrebljenih otpada iz prehrambene proizvodnje, otpada od žitarica i otpada od voća i orašastih plodova za proizvodnju gljive *P. ostreatus*



**Slika 2.** Pregled ključnih reči na engleskom jeziku korišćenih u studijama posvećenim upotrebi supstrata od otpada hrane za proizvodnju gljive *P. ostreatus*: generisan programom VOSviewer

## 2.2. Potencijal prehrambenog otpada

Akumulacija organskog otpada uglavnom potiče iz različitih procesa u prehrambenoj industriji. Otpadi se razlikuju po sastavu, sadržaju vode i pH vrednosti, noseći rizik bakterijske kontaminacije i negativnih ekoloških uticaja (Pfaltzgraff i sar., 2013; Ravindran i Jaiswal, 2016). Valorizacija otpada hrane i primena novih tehnologija za eliminaciju otpada proizvodnjom proizvoda sa dodatnom vrednošću putem biokonverzijskog procesa, jedini je način za rukovanje ovim problemom. Na taj način, otpad od hrane može da postane obnovljiva energija sa visokim sadržajem celuloze i lignina (Ravindran i Jaiswal, 2016). Različite tehnologije se razvijaju kako bi rešile problem generisanja otpada, npr. pretvaranje otpada od kore jabuke u etanol i sirćetnu kiselinu enzimskom hidrolizom celuloze (Parmar i Rupasinghe, 2013). Otpad od listova banane je vredan izvor sirovog materijala, pogodan za proizvodnju mikro/nanovlakana lignoceluloznog tipa (Tarrés i sar., 2017).

Osim toga, otpad hrane može da se biokonvertuje u različite druge proizvode, kao što su: biogoriva, industrijski enzimi, nutraceutici ili čak biodegradabilni plastični materijali. Ova tehnologija otkriva organski otpad kao "rezervoar drugih proizvoda sa dodatnom vrednošću" i opravdava novi koncept "bioekonomije" kroz konverziju organskih resursa u efikasne bioproizvode i energiju (Ravindran i Jaiswal, 2016).

Otpad iz lanca snabdevanja hranom je podeljen na pre- i post- potrošački otpad, a sve potiče iz različitih faza lanca snabdevanja hranom: proizvodnja hrane, prerada, distribucija i potrošnja (Pfaltzgraff i sar., 2013). Otpad iz poljoprivredne i prehrambene proizvodnje je i najznačajniji za proces kultivacije gljiva.

Glavne prednosti pulpe od kafe kao alternativnog supstrata za gajenje *Pleurotus* spp. jeste što je to hranljivi supstrat za rast gljiva, dostupan kao otpadni proizvod bez troškova, može se dehidrirati i čuvati dugo bez uticaja na prinose gljiva, ili, sa druge strane, dostupan je kao svež materijal tokom sezone proizvodnje kafe. Osim toga, pulpa od kafe koju razgrađuju gljive može se smatrati vrednim post-proizvodom koji se koristi kao organsko đubrivo ili vermikompost (Carrasco-Cabrera i sar., 2019).

Dok raste na čvrstom otpadu od maslina, *P. ostreatus* koristi sastojke rastvorljive u mastima, što menja degradaciju strukturnih ugljenih hidrata i može uticati na koncentraciju glukana u gljivama. Otpad od maslina je takođe bogat izvor azota, minerala i drugih hranljivih materija. Budući da je otpad od maslina proglašen opasnim otpadom, njegova značajna prednost kao supstrata za gajenje gljiva jeste degradacija i iskorišćenje prilikom proizvodnje farmakološki aktivnih jedinjenja (Avni i sar., 2017). Parametri kao što su brzina rasta plodonosnih tela i brzina rasta micelijuma, pokazali su da kompostirani otpad od maslina prednjači u odnosu na netretirani i kontrolni uzorak. Testovi fitotoksičnosti pokazali su efikasnost tretmana kompostiranja. Tretman kompostiranja može obezbediti prisustvo određenih pokretačkih jedinjenja, koja mogu stimulisati razgradnju lignina kod gljiva bele truleži (Bumpus i sar., 1985). Tako je kompostirani otpad od maslina pokazao značajno više vrednosti pH (7,5 – 8,0) od onih uobičajeno povoljnih za rast micelijuma, ali je takođe pokazao i visoke prinose i efikasan rast micelijuma uporediv sa netretiranim otpadom od maslina i pšeničnom slamom. Sve veće vrednosti procentualnog udela dvofaznog otpada od maslina u pšeničnoj slami, uprkos uticaju na visoke vrednosti fenolnih jedinjenja, uticale su na ukupnu biotoksičnost supstrata. To se manifestuje kao negativni uticaj na prinos gljiva kada dopuna netretiranog otpada od maslina dostigne 60% zapremine.

## 2.3. Istraživanja koja obuhvataju supstrate za proizvodnju *P. ostreatus*: proizvodnja supstrata

Sposobnost degradacije supstrata od strane *Pleurotus* spp. povezana je sa njihovom sposobnošću da luče specifične enzime, kao što su lakaze, celulaze, hemicelulaze, peroksidaze i ksilanaze, kako bi iskoristili potrebne hranljive materije, bez potrebe za kompostiranjem, što čini komercijalnu proizvodnju relativno pojednostavljenom (Cohen i sar., 2002). Procedure pripreme supstrata uključuju usitnjavanje supstrata na manje segmente (3 cm) i potapanje u destilovanu vodu tokom

24h kako bi se postigao sadržaj vlage od 60%. Zatim se supstrat može sterilisati u polipropilenskim kesama na 121°C, 1,1-1,2 atm tokom 1-2h (Koutrotsios i sar., 2018, 2019; Ferreira da Silva i sar., 2019; Economou i sar., 2020; Sánchez i Montoya, 2020; Doroški i sar., 2021) ili 15 min (Kulkarni i sar., 2020; Omoni i sar., 2022), sterilisati na 90°C tokom 90 min (Sözbir Düzkale, 2021), pasterizovati na 60-80°C u vodi pre procedure inokulacije (Abou Fayssal i sar., 2020; Cayetano-Catarino i sar., 2020), pariti na temperaturi preko 100°C tokom 4h (Adebayo i sar., 2021), ili tretirati aerobnom fermentacijom: 65°C tokom 36h, fermentacijom tokom 12h i vazдушnim hlađenjem tokom 24h (Myronycheva i sar., 2017). Sva ostala istraživanja uključuju pripremu supstrata na isti ili sličan način.

Nakon inokulacije, mere se različiti parametri produktivnosti tokom perioda rasta micelijuma i berbe, kao što su brzina rasta micelijuma, vreme potrebno za završetak rasta micelijuma, vreme potrebno za pojavu primordijuma i berbu, ukupan prinos gljiva i biološka efikasnost (Doroški i sar., 2021), kao i gubitak organske materije, prečnik šešira i drške, kao i dužina drške (Abou Fayssal i sar., 2020).

#### **2.4. Hemijske analize lignoceluloznih supstrata koji potiču od prehrambenog otpada**

*P. ostreatus*, kao gljiva bele truleži, razgrađuje celulozu, hemicelulozu i lignin i koristi ih kao glavni izvor hranljivih materija za rast micelijuma (Grimm i Wösten, 2018). Celuloza, hemiceluloza i lignin su glavni sastojci lignoceluloznog otpada, što ga čini idealnim za gajenje gljiva. Glavni izvor celuloze je ćelijski zid vaskularnih biljaka, a sastoji se od jedinica D-glukoze povezanih preko  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 4)-glukozidnih veza. Celuloza i hemiceluloza spadaju u ugljene hidrate, a njihove veze se mogu razgraditi aktivnošću kiselina ili enzima (Sundarraj i Ranganathan, 2018). Takođe, faktori značajni za rast micelijuma, prinos i efikasnost proizvodnje micelijuma uključuju opseg C/N odnosa, pH vrednost i udeo vlage (Nwanze i sar., 2005).

Prema Chang i Miles (1989), većina gljiva zahteva vlagu supstrata između 50 i 75%, što podržava maksimalni nivo rasta. Izvor ugljenika i azota ima uticaj na proizvodnju micelijalnih egzopolisaharida u submerznoj kultivaciji, što znači da na ćelijski zid gljiva mogu uticati nutritivni signali i okolni stres (Elisashvili i sar., 2009). Prema Choi (2004), azot se transformiše u amonijak tokom procesa fermentacije, što izaziva prekid rasta micelijuma u velikim količinama. Idealne vrednosti azota su između 0,5 i 2% (Naraian i sar., 2009). Komponente bogate azotom, koje se koriste kao dodaci supstratu za gajenje gljiva, dovode do većeg prinosa gljiva i povećanih metaboličkih aktivnosti gljiva prouzrokovanih prisustvom dodatnog azota (Nwanze i sar., 2005; Rodriguez Estrada i Royse, 2007), što protivreči tvrdnji da azot uzrokuje prekid rasta micelijuma (Choi, 2004).

S druge strane, dodavanje materija bogatih azotom može takođe dovesti do većeg rizika od kontaminacije konkurentskim mikroorganizmima (Yildiz i sar., 2002). Supstratna suplementacija doprinosi uspešnoj fermentaciji različitih lignoceluloznih supstrata namenjenih gajenju gljiva (Zervakis i sar., 2013). Što se tiče fizičkih svojstava supstrata, granulometrijski profil i veličina čestica određuju površinu koja je dostupna za rast micelijuma. Manje čestice supstrata doprinose kompresiji supstrata i limitiranoj razmeni gasova i dostupnosti hranljivih molekula za hidrolitičke enzime odgovorne za rast micelijuma, što ograničava rast i prinos gljiva (Gowthaman i sar., 2001).

Pre inkubacije, analiza otpada od maslinovog drveta obično uključuje određivanje pH vrednosti, elektroprovodljivosti, sadržaja ukupne organske materije, vlažnosti i odnosa C/N, pored određivanja sadržaja celuloze, hemiceluloze i lignina. Atomska apsorpciona spektrofotometrija koristi se za analizu mineralnog sadržaja (K, Ca, Mg, Na, Fe i Mn) (Abou Fayssal i sar., 2020). Takođe, Sakellari i sar. (2019) su analizirali elementalni sastav supstrata sa različitim udelima lišća masline, otpadnog ulja maslinovog drveta i koštica grožđa i detektovali sledeće elemente: Al, As, Ba, Cd, Co, Cr, Cs, Cu, Fe, K, Mn, Na, Ni, Pb, Rb, Sr, V i Zn. Supstrati od otpadnog ulja maslinovog drveta zajedno sa košticama grožđa su analizirani radi određivanja ukupnog fenolnog sadržaja, profila fenola, terpena i skvalena (Koutrotsios i sar., 2018). Pored analize glavnih sastojaka, Melanouri i sar. (2022a) uključuju određivanje ukupnog azota i organske materije supstrata u čijem su sastavu koštice grožđa, otpad od kafe i maslinova pulpa. Analiza iskorišćene kafe, kukuruznog i pirinčanog



otpada uključivala je određivanje sadržaja vlažnosti, ukupnog sadržaja C i N i određivanje pH vrednosti (Carrasco-Cabrera i sar., 2019; Zárate-Salazar i sar., 2020).

Adebayo i sar. (2021) obuhvatili su analize celuloze, hemiceluloze, lignina, otpadnih materija od palme i pirinča, dok su Ma i sar. (2020) dodatno analizirali sadržaj hranljivih materija supstrata koji sadrži upotrebene bebi pelene i otpadnu hranu u koju su uključeni kora banane, otpadna kafa i otpad šećerne trske. Odnos C/N i ukupni sadržaj N u supstratima od vlakana kokosa, ljuske kafe i kukuruznog brašna bili su deo analize Sánchez i Montoya (2020). Otpad od piva (iskorišćeni pivski ostatci) je uključen u analizu pH vrednosti, određivanja sadržaja C i N (Omoni i sar., 2022), dok su analize P, odnosa C/N i sadržaja vlage dodatno uključeni u istraživanja Carolina i sar. (2021). Analize otpada šećerne trske uključile su sadržaj celuloze, hemiceluloze, lignina, ukupni N, ukupni C, P, Ca, Mg, Na i K (Narváez i sar., 2021), odnos C/N, S, H, pH i određivanje sadržaja vlage (Zakil i sar., 2019), dok je supstrat od pirinča dodatno obuhvatio ukupni K, P i teške metale (Cr, As, Cd, Hg i Pb) (Huang i sar., 2019). Ukupni N, organska materija, pH i elektroprovodljivost bili su uključeni u analize otpada od soje, maslinovog ulja i vina (Economou i sar., 2020, 2017).

## 2.5. Sastav supstrata od prehrambenih otpada korišćenih za gajenje gljiva

Supstrati od otpada masline pripremljeni u eksperimentu Koutrotsios i sar. (2019) sadržali su otpad maslinovog drveta i dvofazni otpad od maslinovog ulja (TPOMW) pomešan sa pšeničnom slamom u odnosima 25, 50 i 75%, kao i mešavinu oba otpada u odnosima 25 i 50%, dok su Abou Fayssal i sar. (2020) koristili samo otpad maslinovog drveta u kombinaciji sa pšeničnom slamom (1:3, 3:1). Obimna literatura obuhvata pripremu mešavina supstrata od otpada maslinovog ulja i koštica grožđa (industrija vina). Stoga su Koutrotsios i sar. (2018) i Sakellari i sar. (2019) koristili TPOMW, lišće masline, koštice grožđa i pšenicu, kao i njihove kombinacije u odnosima 3:1, 1:1 i 1:3. Otpad od maslinovog ulja i koštice grožđa, zajedno sa pšenicom, korišćeni su kao supstrati i u istraživanjima Tagkouli i sar. (2021) i Tsiantas i sar. (2021) u sledećim kombinacijama: pšenica:koštice grožđa (1:1), listovi masline:TPOMW (3:1) i pšenična slama kao kontrola. Koštice grožđa kao jedini prehrambeni otpad korišćen je u istraživanju Doroški i sar. (2021), u sledećim odnosima sa pšenicom: 100%, 80%:20%, 50%:50%.

Otpad od kafe pripremljen je u mešavini sa kukuruznim brašnom i slamom (Melanouri i sar., 2022a, 2022b), dok su Carrasco-Cabrera i sar. (2019) koristili iskorišćenu kafu u mešavini sa piljevinom. Ling Ma i sar. (2020) istraživali su otpad od kafe i banana u mešavini sa dodatkom iskorišćenih bebi pelena. Takođe, Nguyen i Ranamukhaarachchi (2020) su koristili iskorišćenu kafu u sledećim formulacijama: 100%, u odnosima 50%:50% i 20%:80% u mešavini sa pšeničnom slamom i kartonom. Kafa i ljuska kakaovca u mešavini sa drugim otpadom korišćene su u radu Lowor i Ofori (2018), a otpad od kakaovca i palme korišćen je kao supstrat u sledećim istraživanjima: Mota da Silva i sar. (2020) su mešali otpad od palminog ulja i koru od kakaovca u pet supstrata u različitim odnosima, Fernandes Pereira i sar. (2021) su koristili ljuske od kakaovca i otpad od piva, gde su iskorišćeni pivski ostatci varirali između 10 i 90% (w/w), dok je otpad od kakaovca korišćen kao dodatak težini do 100g. Otpad od palminog ulja, grane i stabljike, korišćen je u drugom istraživanju (Adebayo i sar., 2021) u kombinaciji sa brašnom od pirinča, piljevinom i kukuruznim brašnom: 100% svakog supstrata pojedinačno i u odnosu 50% grane i stabljike u mešavini sa 50% sa piljevine, otpada od pirinča ili pšenice.

Palmina ljuska je korišćena za proizvodnju biogljja, a zatim kao bio-đubrivo za rast bukovače (Nam i sar., 2017). Biougajl je mešan sa pšenicom i piljevinom u tri različite mešavine: biougajl mase između 10 i 30g, pšenica 84 i 86g, a piljevina > 850g. Sa druge strane, različita semena palme u kombinaciji sa ljuskom Brazilskog oraha i borovom piljevinom su ispitivane kao supstrat za kultivaciju u studiji de Aguiara i sar. (2021), dok su Zakil i sar. (2019) mešali peteljke voća i vlakna palme u kombinaciji sa otpadom šećerne trske i piljevinom kaučuka, uglavnom u procentima 25%:75% i 50%:50%. Economou i sar. (2020) su koristili drugačiji pristup, upotrebljavajući iskorišćen supstrat gljive obogaćen pšenicom i sojom za novi proces gajenja, kako bi se dobio efekat odnosa C/N za narednu kultivaciju. Sa druge strane, ljuske suncokreta su se koristile za

gajenje bukovače u mešavini sa pšenicom (3:2) (Myronycheva i sar., 2017), dok su čiste i degradirane ljuške badema (5%) pripremljene u mešavini sa polimernim matriksom u istraživanju Sözbir Düzkale (2021).

Ljuska i plodovi kikirikija pomešani u različitim udelima (20%:80%, 50%:50%, 100%) korišćeni su u studiji Zieda i sar. (2019) za dopunu supstrata *P. ostreatus*. Otpad od piva je iskorišćen u različitim studijama na različite načine: nezagađena zemlja je pomešana sa prethodno imobilisanim istrošenim pivarskim zrnom obraslim micelijumom u odnosu 1:5 (Omoni i sar., 2022); sladni ječam (istrošeno pivsko zrno) je korišćen kao suplementacija drugim poljoprivrednim otpadima, a zatim korišćen kao supstrat (Rugolo i sar., 2020); dok su tri kategorije pivskog otpada pomešane sa ljuskom kakao mahuna u različitim odnosima (Carolina i sar., 2021). Submerzna i čvrsta fermentacija je primenjena u sledećim studijama: pseudostem banane i kokosovo vlakno u količini od 20 g dodati su u bočice sa Kirkovim medijumom za kultivaciju (Ferreira da Silva i sar., 2019) gde su smešteni inokulisani diskovi sa micelijumom. Ova studija je obuhvatila određivanje enzimske aktivnosti. S druge strane, pogača kao ostatak proizvodnje kokosovog ulja, zajedno sa pogačom od susamovog ulja, pripremana je u konusnim bocama za inokulaciju micelijuma, kako bi se proizveli proteini slični hidrofobinu (Kulkarni i sar., 2020). Ostaci poljoprivrednih žitarica uključujući otpad pirinča, kukuruza i šećerne trske uglavnom su pripremljeni čisti za inokulaciju gljiva: pirinčana slama i kukuruzna strnjika korišćeni su u studiji Zárate-Salazar i sar. (2020), dok su Akter i sar. (2022) dodatno koristili pirinčanu ljusku i otpad šećerne trske. Huang i sar. (2019) koristili su pirinčanu slamu, dok su Wiafe-Kwagyan i sar. (2022) dodatno koristili mešavine pirinčanih mekinja i ljuski dopunjene različitim procentima CaCO<sub>3</sub>. Kukuruzna slama i otpad šećerne trske su pomešani kako bi se pronašao najbolji supstrat za gajenje (Iwuagwu i sar., 2020), dok je klip kukuruza sam i u mešavini sa slamom od prosa i otpadom od bambusa korišćen u studiji Fufa i sar., (2021).

## **2.6. Produktivnost rasta *P. ostreatus* na supstratima sa različitim otpadima od hrane**

Produktivnost rasta *P. ostreatus* predstavljena je kroz različite parametre. Pre svega, studije uključuju biološku efikasnost iskorišćenja supstrata (biološka efikasnost supstrata, BE) kao najvredniji parametar koji podrazumeva prinos kultivisanih plodonosnih tela po kg suve mase supstrata (Abou Fayssal i sar., 2020; Akter i sar., 2022; Cayetano-Catarino i sar., 2020; de Aguiar i sar., 2021; Doroški i sar., 2021; Economou i sar., 2020; Fufa i sar., 2021; Huang i sar., 2019; Koutrotsios i sar., 2019, 2018; Lowor i Ofori, 2018; Melanouri i sar., 2022a; Myronycheva i sar., 2017; Rugolo i sar., 2020; Silva i sar., 2020; Wiafe-Kwagyan i sar., 2022.; Zakil i sar., 2019; Zárate-Salazar i sar., 2020). Ovaj parametar prati brzinu rasta micelijuma u vrećama (mm/dan)(Akter i sar., 2022; Doroški i sar., 2021; Koutrotsios i sar., 2019; Melanouri i sar., 2022a), ukupan prinos gljiva (g) (Cayetano-Catarino i sar., 2020; de Aguiar i sar., 2021; Doroški i sar., 2021; Fufa i sar., 2021; Iwuagwu i sar., 2020; Koutrotsios i sar., 2019, 2018; Lowor i Ofori, 2018; Ma i sar., 2020; Nam i sar., 2017; Wiafe-Kwagyan i sar., 2022; Zakil i sar., 2019; Zied i sar., 2019), vreme potrebno za završetak rasta micelijuma (dani), vreme potrebno za formiranje primordijuma i berbu (dani) (Akter i sar., 2022; Cayetano-Catarino i sar., 2020; Doroški i sar., 2021; Economou i sar., 2020, 2017; Fufa i sar., 2021; Iwuagwu i sar., 2020; Koutrotsios i sar., 2019; Ma i sar., 2020; Myronycheva i sar., 2017; Nguyen i Ranamukhaarachchi, 2020; Sözbir Düzkale, 2021; Zakil i sar., 2019). S druge strane, neka istraživanja su uključila ekonomski prinos (g/vreći) nakon uklanjanja nejestivih delova gljive i gubitak organske materije (Abou Fayssal i sar., 2020; de Aguiar i sar., 2021; Ma i sar., 2020; Zárate-Salazar i sar., 2020), kao i masu gljiva (g) (Abou Fayssal i sar., 2020; Akter i sar., 2022; Economou i sar., 2020; Koutrotsios i sar., 2018; Myronycheva i sar., 2017), prečnik šešira i drške (cm) i dužinu drške (cm) (Abou Fayssal i sar., 2020; Akter i sar., 2022; Fufa i sar., 2021; Iwuagwu i sar., 2020; Ma i sar., 2020; Melanouri i sar., 2022a; Myronycheva i sar., 2017; Silva i sar., 2020; Wiafe-Kwagyan i sar., 2022; Zárate-Salazar i sar., 2020). Dodatno, parametar produktivnosti definisan kao „odnos BE u toku ciklusa plodonošenja“ je uključen u studiju Koutrotsiosa i sar. (2018) i Cayetano-Catarino i sar. (2020), dok su Ma i sar. (2020) i Zied i sar. (2019) obuhvatili prosečan broj plodonosnih tela i formiranih primordijuma. Ukupna biomasa

svežih gljiva (Zárate-Salazar i sar., 2020), udeo vidljivog micelijuma (Akter i sar., 2022), broj klastera (Silva i sar., 2020; Zied i sar., 2019) i ukupna masa micelijuma (Economou i sar., 2020) bili su retki parametri uključeni u proračun.

## **2.7. Hemijske analize plodonosnih tela *P. ostreatus* gajenih na supstratima od prehrambenog otpada**

Mnoge vrste gljiva proizvode polisaharide sa medicinskom vrednošću, kao što su antikancerogena i imunomodulatorna svojstva. Osim toga, nutritivni sastav gajene jestive gljive u velikoj meri zavisi od supstrata na kojem je odgajena. S obzirom na to, neke studije obuhvataju širok spektar hemijskih analiza svežih i suvih plodonosnih tela i njihovih ekstrakata (Doroški i sar., 2021; Sakellari i sar., 2019). Mada, mnoge studije izostavljaju nutritivnu i hemijsku analizu plodonosnih tela, i uključuju samo njihovu proizvodnu vrednost i morfologiju.

Shodno tome, analiza plodonosnih tela bukovače gajenih na otpadu masline uključila je pepeo, dijetalna vlakna i ukupne lipide, zatim sadržaj azota, proteina, ukupnih ugljenih hidrata i energetske vrednost, kao i ukupan sadržaj fenola i antioksidativnu aktivnost – sposobnost hvatanja slobodnih radikala (DPPH•) i moć redukcije feri jona (FRAP). Pored toga, određeni su  $\alpha$ - i ukupni glukani (Koutrotsios i sar., 2019).

S druge strane, Abou Fayssal i sar. (2020) su u istraživanje uključili sadržaj vlage, ukupne rastvorljive šećere, fruktozu, glukozu i saharozu, kao i mineralni sastav i profil masnih kiselina gljiva. Pojedinačna fenolna jedinjenja i terpeni bili su dodatni deo istraživanja koje su uradili Koutrotsios i sar. (2018), kao i sadržaj skvalena i ergosterola. Elementalni sastav plodonosnih tela gljiva gajenih na supstratima koji sadrže kominu grožđa i otpad maslina deo je istraživanja koje su sprovedi Sakellari i sar. (2019), koji je služio za proračun unosa toksičnih i esencijalnih elemenata kroz konzumaciju, dok je profil isparljivih aromatičnih jedinjenja plodonosnih tela bio cilj istraživanja koje su sprovedi Tagkouli i sar. (2021). U istraživanju Tsiantas i sar. (2021) određen je sadržaj ergotioneina i lovastatina u gljivama koje su gajene na otpadu grožđa i maslina, upoređujući ih sa konvencionalnim supstratima.

Što se tiče supstrata od komine grožđa, Doroški i sar. (2021) primenili su spektrofotometrijske metode za određivanje ukupnih polifenola, polisaharida i proteina, kao i antioksidativne aktivnosti. Dobijene vrednosti se konvertuju u indekse kvaliteta kako bi se procenio ukupan kvalitet svakog pojedinačnog uzorka (Djekic i sar., 2017).

Potrošeni talog kafe kao supstrat za kultivaciju *P. ostreatus* istraživali su Carrasco-Cabrera i sar. (2019), kroz ekstrakciju i kvantifikaciju kofeina i metabolita kofeina u kultivisanim plodonosnim telima u poređenju sa njegovom koncentracijom u istrošenom supstratu. S druge strane, Lovor i Ofori (2018) uradili su opsežnu hemijsku analizu gljiva gajenih na ljusci kakaa i kafe, koja obuhvata sadržaj vlage, sirove proteine, šećere rastvorljive u etanolu, pepeo, sadržaj lipida i ukupnog azota i mineralne hranljive materije.

Nutritivna vrednost plodonosnih tela gajenih na kakao i palminom otpadu (Silva i sar., 2020) obuhvatala je sadržaj suve i mineralne materije, sirove proteine, sadržaj neutralnog i kiselog detergentskog vlakna i lignin. Ugljenik, odnos C/N, azot, ukupni ugljeni hidrati i proračun energetske vrednosti su takođe bili deo analize. Zakil i sar. (2019) i de Agioar i sar. (2021) analizirali su proteine, ukupne lipide, ukupne ugljene hidrate, vlagu, energetske vrednosti i sirova vlakna u okviru svog istraživanja, u vezi sa otpadom šećerne trske i palminog ulja. Što se tiče otpada od orašastih plodova i otpada od piva, nijedna studija nije uključivala bilo kakvu hemijsku analizu proizvedenih plodonosnih tela.

Akter i sar. (2022) analizirali su plodonosna tela gajena na otpadu pirinča, klipa kukuruza i šećerne trske, a istraživanja su uključila ukupan sadržaj šećera, sadržaj proteina, sadržaj pepela i ukupne fenole, koristeći spektrofotometrijske i gravimetrijske metode. Nutritivna vrednost, uključujući

vlagu, pepeo, polisaharide, proteine, vlakna i sadržaj lipida gljiva gajenih na otpadu pirinča, određena je u istraživanju Huang i sar. (2019).

Beta-glukani su strukturni sastojci ćelijskog zida gljiva (Huang i sar., 2015). Za razliku od  $\beta$ -glukana, izveštaji o strukturi  $\alpha$ -glukana su ograničeni, zbog njihove niske koncentracije u gljivama i njihove neizvesne biološke funkcije (Avni i sar., 2017). Prema Reverberi i sar. (2004), otpad od maslina podstiče sintezu  $\beta$ -1,3-glukana kod gljive *P. ostreatus*, što je rezultat odgovora na oksidativni stres. Izvor oksidativnog stresa može biti prisustvo oksidativnih fenolnih jedinjenja ili reaktivnih vrsta kiseonika. Potencijalna prepreka korišćenja enzimskih metoda za određivanje sadržaja glukana u plodovima gljiva jeste pojava ostataka vlakana, poput hitin-glukan kompleksa, nerastvorljive materije koja ograničava difuziju enzima tokom određivanja  $\beta$ -glukana i rezultuje nižim vrednostima sadržaja  $\beta$ -glukana (Huang i sar., 2015).

### 3. Ciljevi istraživanja doktorske disertacije

Ciljevi ovog istraživanja obuhvataju sledeće:

- Ocenu biološke efikasnosti supstrata koji sadrži različite procentualne odnose otpada i slame;
- Ocenu ukupnog kvaliteta bukovače gajene na supstratu koji sadrži različiti procentualni odnos otpada i slame, od dana branja tokom skladišta 7. i 14. dana;
- Utvrđivanje promene u kvalitetu bukovače pri različitom procentualnom odnosu otpada i slame u supstratu, na osnovu različitih parametara kvaliteta, biohemijskog sastava, kao i antioksidativnih svojstava, od dana branja tokom skladišta 7. i 14. dana;
- Ocenu mikrobiološkog kvaliteta bukovače gajene na supstratu koji sadrži različiti procentualni odnos otpada, od dana branja tokom skladišta 7. i 14. dana;
- Ocenu senzornih svojstava bukovače iz standardne proizvodnje pripremljene različitim kulinarskim metodama, sa dodatkom začinskog bilja.

Ovo istraživanje ima za cilj procenu opšteg kvaliteta bukovače gajene na supstratu koji sadrži otpad i slamu, kao i uočavanje razlike u kvalitetu bukovače u odnosu na različiti procentualni sastav supstrata, na osnovu ispitivanih parametara kvaliteta i biohemijskog sastava plodonosnog tela. Na taj način, alternativna proizvodnja bukovače može se predložiti kao pogodnija za primenu u globalnoj proizvodnji na osnovu potencijalnih funkcionalnih svojstava koja gljiva poseduje pri ovakvim uslovima gajenja. Takođe, prati se razlika u senzornim svojstvima bukovače koja nastaje zbog primene različitih kulinarskih metoda na plodonosna tela, a zatim se donosi i zaključak o pogodnosti određenog načina kulinarske obrade koji se može primeniti u opštoj praksi.

Osnovna hipoteza koja se može primeniti u istraživanju je da postoji opravdani razlog primene alternativnih supstrata u gajenju bukovače koji predstavljaju biljni otpad iz neke druge prehrambene industrije. Posebne hipoteze su:

- Pretpostavka je da postoji razlika u kvalitetu, biohemijskim i antioksidativnim svojstvima bukovače gajene na supstratu koji sadrži različiti procentualni odnos otpada i slame;
- Pretpostavka je da postoji uticaj perioda skladištenja na kvalitet, biohemijska i antioksidativna svojstva bukovače gajene na supstratu koji sadrži različiti procentualni odnos otpada i slame;
- Pretpostavka je da postoji razlika u biološkoj efikasnosti supstrata koji sadrži različiti procentualni odnos otpada i slame;
- Moguće je odrediti parametre kvaliteta bukovače iz standardne proizvodnje koja se razlikuje po metodi kulinarske obrade;
- Kulinarske metode obrade bukovače iz standardne proizvodnje utiču na sveukupnu ocenu kvaliteta.

## 4. Materijal i metode

### 4.1. Gajenje bukovače na različitim celuloznim otpadima iz prehrambene industrije

#### 4.1.1. Prehrambeni otpadi korišćeni za gajenje *P. ostreatus*

Otpad koji je korišćen kao supstrat za gajenje jestive gljive *P. ostreatus* obuhvata (1) kominu grožđa, koja ostaje nakon proizvodnje crvenog vina, sakupljenu tokom leta 2018. od sorte grožđa Prokupac, poreklom iz Aleksandrovačke Župe, Srbija, (2) suncokretovu ljusku sakupljenu tokom jeseni 2021. godine u kompaniji Victoria oil, industriji suncokretovog ulja iz Šida, Srbija, i (3) sojinu ljusku prikupljenu tokom jeseni 2021. godine u kompaniji Bioprotein, industriji sojinih proizvoda i ulja iz Obrenovca, Srbija. Otpad je skladišten u hladnom i mračnom skladištu do upotrebe.

#### 4.1.2. Priprema čiste i matične kulture gljive *P. ostreatus*

Za pripremu čiste kulture (Slika 3.), korišćena je metoda inokulacije tkiva gljive (Mondal i sar., 2011) na sladni agar koji se koristi kao hranljiva podloga. Čista kultura je izolovana iz svežeg plodonosnog tela gljive komercijalnog soja HK35 dobijenih od proizvođača Sylvan i zasejana na površinu hranljive podloge. Pre upotrebe, gljive su oprane destilovanom vodom, a tkivo je izolovano pod sterilnim uslovima u laminarnoj komori. Priprema matične kulture (Slika 3.) je obavljena po metodi Mondal i sar. (2011), po kojoj su sterilisana zrna pšenice sa dodatim  $\text{CaCO}_3$  korišćena kao supstrat za proizvodnju matične kulture.  $\text{CaCO}_3$  se u supstrat dodaje radi obezbeđivanja pH vrednosti optimalne za rast micelijuma, kao i zbog postizanja rastresitosti zrna što je neophodno za dobru razmenu gasova, te pravilan rast micelijuma. Naime, u sterilnim uslovima laminarne komore, čista kultura je presejana na površinu zrna žita radi daljeg prorastanja micelijuma. Posude sa poklopcima koji poseduju otvore u kojima se nalazi matična kultura prekrivene su sterilnim filter papirom i smeštene su u prostor za inkubaciju sa konstantnom temperaturom od 25°C, optimalnom za dalje prorastanje micelijuma.

#### 4.1.3. Priprema supstrata za gajenje gljive *P. ostreatus*

Za kultivaciju *P. ostreatus* korišćeno je pet supstrata sa različitim odnosom komine grožđa i slame (Doroški i sar., 2021), kao i sedam supstratnih smeša, uključujući ljusku suncokretovog semena, ljusku soje i pšeničnu slamu (Tabela 1.). U eksperiment je bio uključen i supstrat koji sadrži 100% slame, korišćen kao kontrolni uzorak. Pšenična slama je isečena na manje komade (oko 3 cm dužine), zatim potopljena u vodu kvaliteta vode za piće u trajanju od 24 h. Svi ostali supstrati su tretirani na isti način. Nakon što je voda fizički uklonjena, supstrat je oceden do približno 60% sadržaja vlage. Materijali su mešani prema šablonu navedenom u Tabeli 1. Polipropilenske kese (Microsac, PP75/BEH6/Ks37-53, Nevele, Belgija) sa šest filterskih traka i debljinom folije 75 mm, korišćene su za pakovanje mešavine supstrata u količini od 3 kg i začepljene pamučnim čepovima pre sterilizacije. Pamučni čepovi su korišćeni kao dodatne barijere koje sprečavaju bilo kakav uticaj atmosfere na mešavinu. Kese su sterilisane u autoklavu (ProMiTech PMT PS 3050 – 10022, Beograd, Srbija) 2 h na 121°C pod pritiskom od 1,5 kg cm<sup>-2</sup>, a zatim ohlađene na sobnu temperaturu u toku 24 h. 2% materijala matične kulture koji sadrži micelijum dodato je u svaku kesu supstrata u sterilnim uslovima laminarne komore, a zatim promešano kako bi se materijal matične kulture ravnomerno rasporedio kroz supstrat. Nakon toga, svaka kesa je začepljena, označena i smeštena u prostor za inkubaciju na 25°C i 85% relativne vlažnosti vazduha. Rast micelijuma završava se tokom 15-28 dana, u zavisnosti od supstrata koji je korišćen. Svaka supstratna smeša je pripremljena u triplikatu kada je u pitanju kombinacija sa kominom, odnosno u kvadriplikatu, kada su u pitanju supstratne smeše sa ljuskom soje i suncokreta (Slika 4.).

**Tabela 1.** Sastav supstratnih smeša korišćenih za gajenje gljive *P.ostreatus*

Šifra supstrata	Sastav supstrata
<b>100P</b>	100% komina grožđa
<b>80P20S</b>	80% komina grožđa:20% pšenična slama
<b>50P50S</b>	50% komina grožđa:50% pšenična slama
<b>20P80S</b>	20% komina grožđa:80% pšenična slama
<b>100S*</b>	100% pšenična slama
<b>SBN</b>	100% sojina ljuska
<b>SBN:SFW</b>	50% sojina ljuska: 50% suncokretova ljuska
<b>SFW</b>	100% suncokretova ljuska
<b>SBN:SFW:WS</b>	33,3% sojina ljuska: 33,3% suncokretova ljuska: 33,3% pšenična slama
<b>SBN:WS</b>	50% sojina ljuska: 50% pšenična slama
<b>SFW:WS</b>	50% suncokretova ljuska: 50% pšenična slama
<b>WS**</b>	100% pšenična slama

#### 4.1.4. Formiranje primordijuma i branje plodonosnih tela *P. ostreatus*

Nakon završetka prorastanja micelijuma, kese su postavljene u tunele za plodonošenje kompanije Ekofungi u Padinskoj Skeli, Srbija (Slika 5.). Kese su pripremljene po postupku (Doroški i sar., 2021) i postavljene na police ispod izvora svetlosti. Kontrolisana atmosfera u tunelima za plodonošenje obuhvatala je dnevno-noćnu smenu sa protokom vazduha od 2 m s<sup>-1</sup>, 10 izmena vazduha na sat, normalno svetlo, visoku relativnu vlažnost (85%) i temperaturni opseg između 20 i 25°C, kada je u pitanju kombinacija supstrata sa kominom, odnosno između 10 i 12 °C, kada su u pitanju supstrati sa sojinom i suncokretovom ljuskom.

Što se tiče supstrata koji sadrže kominu, inicijacija primordijuma je primećena nakon 6-12 dana, plodonosna tela bila su spremna za branje između 5-7 dana nakon formiranja primordijuma, dok je kod supstrata sa ljuskom soje i suncokreta inicijacija primordijuma primećena nakon 8-9 dana, a plodonosna tela su ubrana nakon dodatnih 8-9 dana (Slika 6.). Plodonosna tela su ubrana u prvom talasu plodonošenja, izabrana su za analizu na osnovu privlačnog izgleda i odsustva oštećenja. Plodonosna tela su transportovana u laboratoriju u rashlađenom stanju (8-10°C) jedan sat nakon berbe, upakovana i uskladištena na 4°C, odmah analizirana ili sušena do konstantne mase za dalju analizu.

1)



2)



3)



4)



5)

**Slika 3.** Prikaz inokulacije micelijuma, proizvodnje čiste i matične kulture gljive *P. ostreatus*: 1) proizvodnja čiste kulture; 2) i 3) priprema matične kulture; 4) prikaz inkubacione komore (25°C); 5) rast micelijuma





**Slika 4.** Prikaz pripreme supstrata korišćenih za proizvodnju gljive *P.ostreatus*: 1) Slama – kontrola; 2) Ljuska suncokreta; 3) Komina grožđa; 4) Ljuska soje; 5) Inkubaciona komora: 25°C, relativna vlažnost 85%



**Slika 5.** Prikaz proizvodnog tunela u kojima se odvijala fruktifikacija gljive *P.ostreatus*: 1) proizvodni tunel; 2) prikaz normalnog osvetljenja u proizvodnom tunelu; 3) pojava primordijuma



**Slika 6.** Prikaz procesa fruktifikacije i izgleda plodonosnih tela *P. ostreatus* tokom rasta i neposredno pre branja

#### **4.1.5. Procena pogodnosti supstrata za gajenje bukovače – analiza produktivnosti i hemijska analiza supstrata i plodonosnih tela**

##### **4.1.5.1. Evaluacija produktivnosti supstrata korišćenih za gajenje gljive *P. ostreatus***

Parametri uključeni u procenu produktivnosti bili su brzina rasta micelijuma u džakovima sa supstratom (mm/dan), vreme završetka rasta micelijuma (dani), vreme potrebno za formiranje primordijuma (dani), vreme potrebno za sazrevanje plodonosnih tela (dani), ukupan prinos gljiva (g) i biološka efikasnost supstrata (BE). Masa svežih gljiva za svaki tretman zabeležena je na tehničkoj vagi. BE se izračunava prema jednačini koju su definisali Chang i sar. (1981), a označava „prinos sveže gljive po kg suve mase supstrata“ i računa se u procentima:

$$BE[\%] = \frac{FW[g]}{DW[g]} \times 100 \quad (1)$$

gde FW označava svežu masu gljiva, a DW suhu masu supstrata.

##### **4.1.5.2. Elementalna analiza plodonosnih tela i supstrata**

Za elementalnu analizu korišćeni su uzorci gajeni na komini grožđa - suvo sprášeno plodonosno telo gljive i sprášen supstrat komine i slame. Određen je sadržaj ugljenika, azota, vodonika i sumpora koristeći automatski analizator Vario EL III CHNS/O Elementaranalyse, Elementar. Ukupni proteini su izračunati iz vrednosti količine azota (%), koristeći faktor konverzije azota u protein (NP) 4,38 (Mattila i sar., 2002).

##### **4.1.5.3. Određivanje ukupnih rastvorljivih i nerastvorljivih vlakana**

Analize supstrata (ljuska soje, ljuska suncokreta, slama) obuhvatale su gravimetrijsko određivanje ukupnih rastvorljivih i nerastvorljivih vlakana: NDF - analiza neutralnog detergentskog vlakna, ADF - analiza kiselog detergentskog vlakna, ADL – sadržaj lignina, zatim sadržaji hemiceluloze i celuloze, prema metodi Van Soest (1963), modifikovano od strane Mertens (1992). Sadržaj hemiceluloze i celuloze je izračunat prema sledećim jednačinama:

$$\text{Hemiceluloza (\%)} = NDF - ADF \quad (2)$$

$$\text{Celuloza (\%)} = ADF - ADL \quad (3)$$

Uzorci supstrata su uključivali SFW, SBN i WS, sirovi i nakon fruktifikacije gljiva. Uzorci su sušeni u sušari u atmosferi vazduha na 35°C do konstantne mase, usitnjeni u prah i čuvani u suvim i tamnim uslovima pre analize. Rezultati su izraženi kao srednje vrednosti tri puta ponovljenog eksperimenta.

#### **4.1.6. Analiza svežih plodonosnih tela bukovače gajene na prehrambenom otpadu**

##### **4.1.6.1. Priprema plodonosnih tela za analize**

Plodonosna tela ubrana za eksperiment bila su ujednačene veličine i sličnog oblika, pa potencijalna varijacija u kvalitetu nije uzeta u obzir. Gljive sa nedostacima isključene su iz istraživanja kao škart. U istraživanje su uključeni celi karpofori. Nakon berbe, svaki uzorak gljive je čuvan u frižideru do početka eksperimenta.

Pedeset grama plodonosnih tela svakog uzorka je pojedinačno upakovano u kese (poliamid/polietilen/polietilen, 200 mm × 300 mm) 85 µm debljine, a korišćena je mašina za pakovanje HVC-510T/2A, Kina, sa brzinama prenosa od 60 ml O<sub>2</sub>, 12 ml N<sub>2</sub> i 180 ml CO<sub>2</sub> m<sup>-2</sup> dan<sup>-1</sup> atm<sup>-1</sup>, datim deklaracijom. Svaki uzorak je pojedinačno spakovan i skladišten na 4°C tokom 7 i 14 dana. Deo plodonosnih tela u svežem stanju za sve tri vremenske tačke uzorkovanja (0., 7. i 14. dan) je korišćen za analizu profila teksture, analizu profila boje, mikrobiološku analizu i određivanje promene permeabilnosti membrane merenjem curenja elektrolita. Preostale količine sva

tri uzorka (0., 7. i 14. dan) su ostavljene za pripremu ekstrakata gljiva za dalje analize (podnaslov 4.1.8.).

#### 4.1.6.2. Analiza profila teksture

Analiza profila teksture plodonosnih tela gljiva je izvršena korišćenjem uređaja Tektore Pro CTV 1.9 Build 35 (Brookfield Engineering Labs, Inc., SAD). Korišćen je tip sferne sonde. Nakon kalibracije, izvršen je TPA test sa sledećim podešenim parametrima: sila okidanja - 9 g, brzina testa merenja - 2 mm/s i dubina deformacije - 4 mm (Djekic i sar., 2017). Plodonosna tela gljiva dimenzija 50–60 mm u prečniku su podvrgnuta kompresiji. Korišćene su horizontalno postavljene kapice gljiva. Merenja su obavljena na 10 uzoraka plodonosnih tela gljiva za svaki tretman, u ambijentalnim uslovima.

#### 4.1.6.3. Analiza promene boje

Merenje boje plodonosnih tela gljive izvršeno je korišćenjem metode Kompjuterski vizuelni sistem (CVS), koja je prethodno objašnjena (Tomasevic i sar., 2018). CVS se sastojao od drvene komore, sistema osvetljenja sa četiri fluorescentne lampe i digitalne kamere Sony Alpha DSLR-A200 (10,2 MP, CCD senzor) koja se nalazila na udaljenosti od 30 cm od uzorka, dok su podaci sa fotografija obrađeni odgovarajućim softverom. Pre upotrebe, kamera je kalibrisana korišćenjem fotografske pločice sa 24 standardne boje, koja je fotografisana i prilikom obrade fotografija iskorišćena za kalibraciju u specijalnom softveru ColourChecker Passport 1,0,1, X-Rite Inc.. Fotografisanje uzoraka vršeno je postavljanjem tacne sa uzorcima koji su poređani jedan do drugog i označeni odgovarajućom oznakom, kako bi na fotografijama bili prepoznatljivi. Softver koji se koristio za analiziranje fotografije je Adobe Photoshop, korišćenjem RAW slike uz pomoć alata (engl. average color sampler tool), kojim se dobijaju Hunter parametri boje ( $L^*$ ,  $a^*$  i  $b^*$ ) jednog reprezentativnog dela fotografije koji je vizuelno izabran.

Hunter parametri boje ( $L^*$ ,  $a^*$  i  $b^*$ ) korišćeni su kao pokazatelji merenja boje za svaki pojedinačni uzorak plodonosnog tela.  $L_o^*$ ,  $a_o^*$  i  $b_o^*$  predstavljaju eksperimentalne podatke za kontrolni uzorak svežih plodonosnih tela bukovače gajenih na supstratu od 100% slame, dok  $L^*$ ,  $a^*$  i  $b^*$  predstavljaju eksperimentalne podatke za svaki drugi uzorak. Merenje je vršeno u 10 ponavljanja za svaki uzorak.

Ukupna razlika boje ( $\Delta E$ ), indeks braon boje (BI), indeks žute boje (YI) i indeks bele boje (WI) određeni su prema sledećim jednačinama (Pathare i sar., 2013):

$$\Delta E = \sqrt{(a^* - a_o^*)^2 + (b^* - b_o^*)^2 + (L^* - L_o^*)^2} \quad (4)$$

$$BI = \frac{100(x-0.31)}{0.17}, \text{ gde je } x = \frac{(a^* + 1.75 L^*)}{(5.645 L^* + a^* - 3.012 b^*)} \quad (5)$$

$$YI = 142.86 \cdot \frac{b^*}{L^*} \quad (6)$$

$$WI = 100 - \sqrt{(100 - L^*)^2 + (a^*)^2 + (b^*)^2} \quad (7)$$

#### 4.1.6.4. Analiza propustljivosti ćelijske membrane

Indikator propustljivosti ćelijske membrane jeste pokazatelj curenja elektrolita iz tkiva, za šta je korišćena modifikovana metoda od strane Liu i sar. (2010). Sveža plodonosna tela su za analizu sečena u obliku diskova (prečnika 8mm, 6mm debljine, mase 1g po uzorku). Uzorci su potopljeni u destilovanu vodu na temperaturi 25°C. Smeša je mešana korišćenjem šejkera (IKA® KS 4000i control, Kina), na konstantnoj temperaturi tokom 30 min, dok je provodnost rastvora merena uređajem za merenje konduktivnosti (inoLab\_IDS Multi 9430, WTW 82362 Weilheim, Nemačka).

Smeša je zatim zagrejana do ključanja tokom 30 min i opet ohlađena na temperaturu 25°C. Konduktivnost je merena na konstantnoj temperaturi. Merenja su vršena u triplikovima i izražena kao udeo ukupnih elektrolita u tkivu gljive u vidu curenja elektrolita.

#### 4.1.6.5. Mikrobiološka analiza plodonosnih tela gljive *P. ostreatus*

Standardne ISO metode korišćene su za mikrobiološke analize površina plodonosnih tela *P. ostreatus*: ukupan broj aerobnih mezofilnih mikroorganizama (engl. *total colony count*, TCC) (ISO, 2013), *Enterobacteriaceae* (ISO, 2009), ukupan broj psihrotrofnih mikroorganizama (engl. *psychrotrophic colony count*, PCC) (ISO, 2001), ukupan broj kvasaca i plesni (engl. *yeasts and molds*, YM) (ISO, 2008), *Escherichia coli* (ISO, 2018), *Staphylococcus aureus* (ISO, 1999), *Salmonella* spp. (ISO, 2017), *Clostridium* spp. (ISO, 2004a) i *Listeria* spp. (ISO, 2017). Merenja su vršena u triplikovima i izražena u jedinicama log CFU g<sup>-1</sup> sveže mase.

#### 4.1.7. Ukupan indeks kvaliteta - TQI

Ukupan indeks kvaliteta izračunat je za svaki pojedinačni uzorak na osnovu vrednosti osnovnih indeksa kvaliteta, gde su u proračunu osnovnog indeksa kvaliteta učestvovala dve grupe parametara koje karakterišu pojedinačne uzorke: (i) kvalitativni parametri svežih plodonosnih tela bukovače, koji obuhvataju sledeće: analiza profila teksture (tvrdoća, kohezivnost i elastičnost), gde je primenjena jednačina 10., karakteristike boje (ukupna razlika boje, indeks braon boje i indeks žute boje), curenje elektrolita i mikrobiološke karakteristike (TCC, *Enterobacteriaceae*, PCC, YM), gde je primenjena jednačina 8. i (ii) kvalitativni parametri produktivnosti supstrata, koji obuhvataju sledeće: brzina rasta micelijuma u džakovima sa supstratom (mm/dan), vreme završetka rasta micelijuma (dani), vreme potrebno za formiranje primordiuma (dani), vreme potrebno za sazrevanje plodonosnih tela (dani), ukupan prinos gljiva (g) i biološka efikasnost supstrata (BE), gde je primenjena jednačina 10..

Ukupan indeks kvaliteta uzoraka plodonosnih tela bukovače izračunat je prema metodama Finotti i sar. (2007) i Djekic i sar. (2017), koristeći dve jednačine osnovnog indeksa kvaliteta (QI<sub>ij</sub>). Prva formula izračunava indeks kvaliteta sa sledećim pravilom - „što je manja vrednost, bolji je kvalitet“:

$$QI_{ij} = \frac{x_{ij}}{x_{\max[i]}} \quad (i=1, n; j=1, m) \quad (8)$$

gde je x<sub>ij</sub> izmerena vrednost odabranog svojstva kvaliteta pojedinačnog uzorka, a x<sub>max[i]</sub> je maksimalna vrednost među izmerenim vrednostima odabranog svojstva kvaliteta pojedinačnog uzorka (jednačina 9).

$$x_{\max[i]} = \max(x_{ij}), \quad (i=1, n; j=1, m) \quad (9)$$

Druga formula izračunava indeks kvaliteta sa sledećim pravilom - „što je veća vrednost, bolji je kvalitet“:

$$QI_{ij} = \left| \frac{x_{\max[i]} - x_{ij}}{x_{\max[i]} - x_{\min[i]}} \right| \quad (10)$$

gde je x<sub>ij</sub> izmerena vrednost odabranog svojstva kvaliteta pojedinačnog uzorka; x<sub>max[i]</sub> je maksimalna vrednost (jednačina 9), a x<sub>min[i]</sub> je minimalna vrednost (jednačina 10) među izmerenim vrednostima odabranog svojstva kvaliteta pojedinačnog uzorka.

$$x_{\min[i]} = \min(x_{ij}), \quad (i=1, n; j=1, m) \quad (11)$$

Ukupni indeks kvaliteta (TQI) je tada predstavljen svim  $QI_{ij}$  indeksima kao komponentama Euklidove norme vektora:

$$TQI_j = \sqrt{\sum_{j=1}^m (QI_{ij})^2}, (j=1,m) \quad (12)$$

Radi lakšeg tumačenja TQI, usvojeno pravilo je da što je vektor udaljeniji od početka, to je njegov TQI lošiji, a što je vektor bliže početku, to je njegov TQI bolji“ (Horn i Johnson, 1985).

#### **4.1.8. Analiza ekstrakata plodonosnih tela bukovače gajene na prehrambenom otpadu**

##### **4.1.8.1. Priprema sirovih vodenih ekstrakata**

Plodonosna tela gljiva su osušena na vazduhu do konstantne mase na temperaturi od 35 za uzorke gajene na sojnoj i suncokretovoj ljusci, do maksimalnih 55°C za uzorke gajene na komini grožđa. Temperatura od 55°C je izabrana na osnovu rezultata iz literature (Miranda i sar., 2010; Sudha i sar., 2012) koji su se vodili radnom hipotezom da će antioksidativnost i prinos fenolnih jedinjenja biti najbolji. Nakon sušenja, gljive su samlevene u prah i iz njih je pripremljen sirovi vodeni ekstrakt. Prah je potopljen u destilovanoj vodi i dobijena je suspenzija u koncentraciji 80 mg mL<sup>-1</sup> koja je termički tretirana na temperaturi od 85°C tokom 1,5h. Nakon kuvanja, uzorci su ohlađeni i centrifugirani na 11000 x g tokom 10 min. Supernatant je dekantiran i skladišten za dalje analize.

##### **4.1.8.2. Hemijske analize sirovih vodenih ekstrakata**

###### **4.1.8.2.1. Ukupan sadržaj fenolnih jedinjenja**

Ukupan sadržaj fenolnih jedinjenja (TPC) je analiziran upotrebom reakcione metode Folin-Ciocalteu (Singleton i sar., 1999), adaptirane i prethodno objašnjene od strane Djekic i sar. (2017) i Doroški i sar. (2021). Analizirani su sirovi vodeni ekstrakti pripremljeni u koncentracionom opsegu od 0,625 - 40 mg mL<sup>-1</sup>. U svakom bunaru je pomešano 25 µL uzorka ili pripremljenog standarda sa 125 µL Folin-Ciocalteu reagensa, koji je prethodno razblažen destilovanom vodom u odnosu 1:9. Smeši je nakon 10 minuta inkubacije na sobnoj temperaturi dodato 100 µL 7,5% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Dobijena smeša je zatim inkubirana 1,5h u tamnim uslovima. Nakon inkubacije, čitač mikrotitarskih ploča (microplate reader ELx808, BioTek Instruments, Inc., SAD) je upotrebljen za analize u pločama sa 96 bunara, dok je apsorbancija na kojoj su očitani uzorci bila 630 nm. Galna kiselina je korišćena kao standard u rasponu koncentracija 0,03125–2 mg mL<sup>-1</sup>, a vrednosti su izražene u mg ekvivalenta galne kiseline (GAE) g<sup>-1</sup> ekstrakta.

###### **4.1.8.2.2. Ukupan sadržaj polisaharida**

Određivanje sadržaja polisaharida izvršeno je upotrebom metode fenol-sumporne kiseline (Dubois i sar., 1956) sa D-glukozom (GLU) kao standardom u rasponu koncentracija 0,03125–2 mg mL<sup>-1</sup>. Rastvori datih koncentracija su za potrebe metode razblaženi 40 puta, pa je 5 µL uzorka pomešano sa 195 µL destilovane vode. Zatim je po protokolu dodato još 200 µL destilovane vode, 400 µL 5% fenolnog reagensa i zatim 2 mL koncentrovane sumporne kiseline. Smeša je zatim inkubirana na sobnoj temperaturi u toku 30 min, a zatim promešana na Vorteks-u pre merenja absorbance. Analiza je izvršena korišćenjem UV 1800 spektrofotometra (Shimadzu, Japan), dok je apsorbancija uzoraka očitana na 490nm. Vrednosti su kvantifikovane u mg ekvivalenta GLU g<sup>-1</sup> ekstrakta.

###### **4.1.8.2.3. Ukupan sadržaj proteina**

Određivanje sadržaja rastvorljivih proteina u vodenim ekstraktima izvršeno je metodom po Bradfordu (Bradford, 1976), koristeći goveđi serumski albumin (BSA) kao standard u rasponu koncentracija 0,03125–2 mg mL<sup>-1</sup>. Bradford reagens je napravljen 24h pre analize tako što je u normalnom sudu od 200 mL pomešano 100mg CBB G-250 (Coomassie Brilliant blue G 250) sa 50 mL 95% etanola, a zatim je dodato 100 mL 85% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> i dopunjeno do crte destilovanom vodom.

Reagens je inkubiran na sobnoj temperaturi na tamnom mestu u toku 24h. U epruvetama je 100  $\mu\text{L}$  uzorka pomešano sa 5 mL Bradford reagensa. Smeša je inkubirana u toku 20 min pre očitavanja. Apsorbance su očitane korišćenjem UV 1800 spektrofotometra (Shimadzu, Japan) na 595 nm. Koncentracija proteina se izražava kao mg ekvivalenata BSA  $\text{g}^{-1}$  suve mase uzorka.

#### 4.1.8.2.4. *Određivanje antioksidativne aktivnosti – sposobnost neutralizacije DPPH slobodnih radikala*

Potencijal neutralizacije slobodnih radikala DPPH je ispitana prema metodi Ekanayake i sar. (2005). Na mikrotitarskim pločama analizirana je koncentracija ekstrakta u rasponu od 0,625 do 40  $\text{mg mL}^{-1}$ , koristeći čitač mikrotitarskih ploča (microplate reader ELx808, BioTek Instruments, Inc., SAD). 50  $\mu\text{L}$  uzorka se pomeša sa 250  $\mu\text{L}$  DPPH reagensa prethodno rastvorenog u metanolu, a zatim se apsorbance očitava nakon 30 min na 517 nm. Sposobnost neutralizacije slobodnih radikala DPPH izražena je kao vrednost  $\text{EC}_{50}$  ( $\text{mg mL}^{-1}$ ), tj. efektivna koncentracija ekstrakta gljive potrebna da neutrališe 50% DPPH slobodnih radikala.  $\text{EC}_{50}$  vrednost se računa na osnovu formirane standardne krive. Veća antioksidativna sposobnost je povezana sa nižom vrednošću  $\text{EC}_{50}$  (Kozarski i sar., 2011). Kao pozitivna kontrola, korišćeni su katehin i Trolox u rasponu koncentracija od 0,03125–2  $\text{mg mL}^{-1}$ .

#### 4.1.8.2.5. *Određivanje antioksidativne aktivnosti – sposobnost neutralizacije ABTS slobodnih radikala*

Ispitivanje sposobnosti neutralizacije slobodnih radikala ABTS je sprovedeno prema metodi Arnao i sar. (2001). Analizirana je koncentracija ekstrakta u rasponu od 0,625 do 40  $\text{mg/mL}$ , koristeći čitač mikrotitarskih ploča (microplate reader ELx808, BioTek Instruments, Inc., SAD). Rastvor ABTS reagensa pripremljen je mešanjem 5 mL ABTS rastvora i 88  $\mu\text{L}$  rastvora K-persulfata, koji se zatim inkubira na tamnom mestu od 12 do 16h. 20  $\mu\text{L}$  uzorka se u mikrotitarskoj ploči pomeša sa 200  $\mu\text{L}$  ABTS reagensa, inkubira se na tamnom mestu 6 min i zatim se apsorbance očitava na 734 nm. Sposobnost ekstrakta za apsorpciju radikala je testirana *in vitro*, koristeći sposobnost neutralizacije slobodnih radikala ABTS i izražena je kao vrednost  $\text{EC}_{50}$  ( $\text{mg mL}^{-1}$ ). Kao pozitivna kontrola korišćeni su katehin i BHA u rasponu koncentracija od 0,03125–2  $\text{mg mL}^{-1}$ .

#### 4.1.8.2.6. *FT-IR spektroskopija*

Infracrvena spektroskopija sa Fourierovom transformacijom (FT-IR) korišćen je za hemijsku karakterizaciju plodonosnih tela *P. ostreatus* gajenih na različitim supstratima koji sadrže slamu i kominu grožđa. Spektri su snimljeni na instrumentu Nicolet 6700 FT-IR (Thermo Scientific, USA). Spektrofotometar je opremljen DTGS TEC detektorom. Interpretacija spektara vršena je pomoću softvera OMNIC 7.3 Software, ThermoNicolet. Spektri su snimljeni u opsegu 400-4000  $\text{cm}^{-1}$  korišćenjem tehnike oslabljene totalne refleksije (eng. attenuated total reflection, ATR).

#### 4.1.8.3. *Analiza rizika: Citotoksični potencijal ekstrakata gljive P. ostreatus*

MTT test je kolorimetrijska metoda za procenu vijabilnosti i metaboličke aktivnosti ćelija. Ovaj test uključuje redukciju MTT 3-(4,5-dimetil(tiazol-2-il)-3,5-difenil-tetrazolijum-bromid) žute boje ćelijskim koenzimima NAD(P)H i glikolitičkim koenzimima endoplazmatičnog retikuluma u metabolički aktivnim ćelijama do nerastvorljivih ljubičastih kristala formazana (Stockert i sar., 2018). Rastvaranjem stvorenih kristala odgovarajućim rastvaračem (DMSO) postiže se pogodan intenzitet boje koji je prilikom spektrofotometrijskog očitavanja srazmeran broju metabolički aktivnih ćelija.

Da bi se odredila citotoksičnost, urađen je MTT test na fetalnim fibroblastima pluća čoveka (ćelijska linija MRC-5, poreklo: Evropska kolekcija ćelijskih kultura, kataloška oznaka ECACC 84101801) i ćelijama humanog kolorektalnog karcinoma (ćelijska linija HCT 116, poreklo: Američka kolekcija ćeliskih kultura, kataloška oznaka ATCC CCL -247). MTT testu prethodili su procedura oživljavanja i gajenja ćelija, kao i tripsinizacija i procena broja i vijabilnosti ćelija. Ćelije su gajene u DMEM medijumu u uslovima 100% vlažnosti i 5% zasićenosti  $\text{CO}_2$  na  $37^\circ\text{C}$ . Na mikrotitar ploče sa 96 bunara je zasejano  $2 \times 10^4$  ćelija po bunaru. Ploče su zatim inkubirane na  $37^\circ\text{C}$



tokom 24h u prisustvu 5% CO<sub>2</sub>. Kada se formirao monosloj, ćelije su isprane 1xPBS-om nakon što je medijum izvučen, a zatim je dodat svež medijum sa rastvorenim test supstancama odgovarajuće koncentracije i ploče su vraćene na inkubaciju 24h. Nakon inkubacije dodat je rastvor MTT boje koji je sadržao 20 µL rastvora MTT u 200 µL medijuma, a ploče su vraćene na inkubaciju u trajanju od 3h. Zatim je medijum izvučen iz bunara, a stvoreni kristali rastvoreni u DMSO rastvaraču. Rezultati su očitani spektrofotometrijski na 570 nm (Multiscan FC, Thermo Scientific, Šangaj, Kina). Procenti preživljavanja računati su prema formuli 13:

$$P(\%) = 100 \cdot \left( \frac{OD_{570} \text{ test substance}}{OD_{570} \text{ kontrolerastvarača}} \right) \quad (13)$$

Uzorci ekstrakata su testirani u koncentracionom opsegu od 1,25–40 mg mL<sup>-1</sup>, u dva odvojena eksperimenta, koristeći po šest bunara mikrotitarske ploče za svaku tačku tretmana.

Za uzorke dobijene nakon gajenja na komini grožđa, test citotoksičnosti je rađen samo sa ekstraktima poreklom od gljiva skladištenih nultog dana. Za njih su konstruisane krive preživljavanja na osnovu procenata preživljavanja određenih za svaku testiranu koncentraciju u odnosu na kontrolu rastvarača. Krive su korišćene za procenu koncentracija koje inhibiraju 10% i 25% preživljavanja (IC<sub>10</sub> i IC<sub>25</sub>, redom). Da bi procenili selektivnu toksičnost testiranih supstanci prema kancerskim ćelijama, poređene su odgovarajuće vrednosti IC za normalne i kancerske ćelije i izračunati specifični indeksi selektivne citotoksičnosti (SI<sub>10</sub>, SI<sub>25</sub>) prema jednačini, kako je ranije objašnjeno od strane Bezivin i sar. (2003):

$$SI_n = \frac{IC_n(MRC-5)}{IC_n(HCT116)} \quad (14)$$

Indeks n u formuli označava stopu inhibicije preživljavanja za koju je izračunat SI indeks.

Kada je u pitanju određivanje citotoksičnosti uzoraka gajenih na ljusci soje i suncokreta, uključeni su uzorci dobijeni iz plodonosnih tela nultog i četrnaestog dana. Da bi se ocenila citotoksičnost, procenjen je procenat preživljavanja za sve testirane koncentracije u poređenju sa netretiranom kontrolom. Prag za slabu citotoksičnost postavljen je na 80% preživljavanja (Cvetković i sar., 2022), što znači da su sve koncentracije ekstrakata koje su smanjile vijabilnost ćelija za maksimalno 20%, korišćene za dalje ispitivanje genotoksičnosti.

#### 4.1.8.4. Analiza rizika: Genotoksični potencijal ekstrakata gljive *P. ostreatus*

Alkalni komet test (engl. *Single Cell Gel Electrophoresis*, SCGE) je metoda koja detektuje oštećenja DNK molekula pojedinačnih eukariotskih ćelija. Negativno naelektrisani fragmenti DNK imaju sposobnost da putuju kroz gel od katode ka anodi, pri čemu DNK koja nije oštećena ostaje u kompaktnoj formi, a fragmenti sa oštećenjem formiraju strukturu u vidu „komete“ (Singh i sar., 1988).

Test genotoksičnosti rađen je samo sa uzorcima dobijenim gajenjem na ljusci soje i suncokreta. Za ispitivanje genotoksičnosti korišćen je alkalni komet test, sproveden prema preporukama MIRCA (Møller i sar., 2020) i u skladu sa prethodnim istraživanjima (Cvetković i sar., 2022). Ćelije su zasejane u ploče sa 12 bunara, sa gustom od 3 x 10<sup>5</sup> ćelija po udubljenju i inkubirane na 37°C sa 5% CO<sub>2</sub> i 100% vlažnosti kako bi formirale monosloj. Nakon toga, medijum je zamenjen onim koji sadrži testirane ekstrakte u koncentracionom opsegu 2,5 do 20 mg mL<sup>-1</sup> i obezbeđena je 24-satna inkubacija ćelija. 4-nitrohinolin 1-oksid (4NQO) je korišćen u koncentraciji od 2 µg mL<sup>-1</sup> kao pozitivna kontrola.

Prvi korak alkalnog komet testa bio je tripsinizacija ćelija dodavanjem 600 µL 0,1% tripsina. Tripsinizacija je prekinuta dodavanjem 600 µL medijuma, nakon čega je sadržaj centrifugiran 10

min na 1000 x g u ependorf kivetama, a talog resuspendovan u medijumu nakon otklanjanja supernatanta. Na prethodno pripremljene staklene pločice naneto je 80  $\mu\text{L}$  1% NMP (eng. *normal melting point agarose*) i prekriveno pokrovnim staklom da se formira gel. Pločice su pripremane u duplikatu. 30  $\mu\text{L}$  pripremljene ćelijske suspenzije je pomešano sa 1% LMP (eng. *low melting point agarose*) i naneto na pločice, nakon čega su bile spremne za liziranje. Proces liziranja dovodi do oslobađanja DNK uklanjanjem membrana i narušavanjem nukleoplazme i citoplazme, što je izvršeno potapanjem pripremljenih pločica u pufer za lizu ćelija (pH 10) u toku 1h na 4°C. Nakon liziranja, pločice su potopljene u kadice za elektroforezu sa puferom (pH 13), gde je prvo obavljena denaturacija vodoničnih veza u molekulu DNK u toku 20 min na 4°C, a zatim i elektroforeza u mraku u sledećim uslovima: 4°C, 20 min, pri struji od 300 mA i voltaži od 25V. Zatim je sledila neutralizacija u puferu (pH 7,5) u toku 15 min na 4°C.

Za bojenje gelova pre analize korišćeno je 20  $\mu\text{L}$  fluorescentnog interkalirajućeg agensa akridin oranža koncentracije 2  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Rezultati su analizirani pomoću fluorescentnog mikroskopa (Leica, DMLS, Beč, Austrija, pod uvećanjem 400x, barijerni filter 590 nm, ekscitacioni filter 510–560 nm) i softvera Comet IV Computer (Perceptive Instruments, Edmunds, Velika Britanija). Izvršena su dva individualna eksperimenta, svaki sa sto jedara po tretmanu (50 jedara po slajdu). Intenzitet repa (engl. Tail intensity, TI), tj. procenat DNK u repu kometa, izabran je kao mera oštećenja DNK.

## **4.2. Analiza parametara kvaliteta bukovače nabavljene iz standardne proizvodnje sa dodatkom začinskog bilja podvrgnute različitim kulinarskim metodama**

### **4.2.1. Poreklo gljiva korišćenih za istraživanje**

Organske bukovače (*P. ostreatus*) komercijalnog soja HK35 uzgajao je lokalni proizvođač Ekofungi iz Beograda, Srbija. Plodonosna tela su sveže ubrana i transportovana u laboratoriju 1 h nakon berbe, u plastičnim kontejnerima u uslovima hlađenja (8–10°C). Gljive su pripremljene za eksperiment odmah nakon prijema.

### **4.2.2. Priprema gljiva za eksperiment**

Za potrebe preliminarnog istraživanja, plodonosna tela su blanširana u vodi na 88°C tokom 2 minuta i kuvana na 80°C tokom 60 minuta. Temperatura vode je merena digitalnim termometrom i gljive su uronjene u vodu po dostignutoj temperaturi, kada je počelo merenje trajanja tretmana.

*Sous-vide* kulinarska metoda obuhvata kuvanje svežih materijala u termostabilnim vakuumiranim vrećama pod kontrolisanim uslovima temperature i dužine trajanja tretmana. Za pripremu gljiva za kulinarsku pripremu, sva oštećena plodonosna tela ili nepotrebni materijal su uklonjeni, a zdrava plodonosna tela su sortirana i očišćena. Za potrebe *sous-vide* tretmana, po 100 g gljiva je pojedinačno smešteno u plastične vreće (poliamid/polietilen/polietilen, 200 mm  $\times$  300 mm), debljine 85  $\mu\text{m}$ , a zatim su vakumirane u mašini za pakovanje HVC-510 T/2A, primenjujući visok nivo vakuuma sa kapacitetom vakuumske pumpe od 20  $\text{m}^3 \text{h}^{-1}$ , sa brzinama prenosa od 60 ml  $\text{O}_2$ , 12 ml  $\text{N}_2$  i 180 ml  $\text{CO}_2 \text{m}^{-2} \text{dan}^{-1} \text{atm}^{-1}$ , datim deklaracijom. Vakuum vreće sa gljivama su uronjene u *sous-vide* sud kada je temperatura vode dostigla definisanu temperaturu (Poglavlje 4.2.3.1., Tabela 2. i 3.), kada počinje merenje dužine trajanja tretmana. Temperatura vode u središnjem delu *sous-vide* suda merena je svakih 5 min trajanja tretmana. Uzorci su čuvani na sobnoj temperaturi u roku od 2 h od pripreme, kada je pristupljeno senzornoj analizi.

### **4.2.3. Primenjene kulinarske metode i faze eksperimenta**

#### **4.2.3.1. Preliminarna faza istraživanja**

Preliminarna eksperimentalna faza obuhvatala je senzornu analizu organskih bukovača pripremljenih pomoću tri kulinarske metode: (1) blanširanje u vreloj vodi na 88°C tokom 2 minuta (kontrola), (2) kuvanje na 80°C tokom 60 minuta i (3) *sous-vide* (60°C tokom 22 minuta). Metode kuvanja i *sous-vide* izvedene su sa tri izabrana začina (origano, majčina dušica i crni biber). Senzorni panel je činilo devet istraživača koji su učestvovali u preliminarnom istraživanju.

Pripremljeni uzorci bukovače ocenjivani su u pogledu prihvatljivosti ukusa, mirisa i opšteg kvaliteta korišćenjem skale od pet podeoka (1 - potpuno neprihvatljivo, 3 – na granici prihvatljivog, 5 - potpuno prihvatljivo), uz mogućnost davanja polubodova (1,5; 2,5; 3,5 i 4,5). Ocenjivačima je ostavljena mogućnost da evidentiraju uočene nedostatke. Priprema organskih bukovača za dalje senzorno ocenjivanje (Tabela 2.) vršena je u skladu sa metodama koje su koristili Rotola-Pukkila i sar. (2019), gde su gljive *A. bisporus* pripremane *sous-vide* kulinarskom metodom u trajanju od 10 min na sledećim temperaturama: 60, 70, 80 i 90°C.

Dodatna evaluacija uključivala je primenu mikrodilucione metode i određivanje minimalnih inhibitornih koncentracija vodenih ekstrakata začina i ekstrakta čistog soka gljive pripremljene *sous-vide* metodom, prema određenim sojevima patogenih bakterija. Takođe je ispitan tip interakcije ekstrakata primenom metode šahovske table, što je zajedno sa preliminarnim istraživanjem uticalo na odluku o vrsti primenjenih začina i koncentracijama u glavnom eksperimentu. Preliminarnoj fazi ispitivanja prethodio je test trougla, koji nije dao značajne rezultate koji bi uticali na tok istraživanja, pa je ovaj deo rezultata odbačen.

#### 4.2.3.2. Glavna faza istraživanja

Glavni eksperiment sastojao se iz dva dela. U prvom delu, kulinarske metode različitih nivoa termičkog tertmana primenjene su na gljive bez dodatka začina (Tabela 2.). Dve kulinarske metode sa unapred definisanim kombinacijama temperature i vremena termičke obrade izabrane su na osnovu istraživanja Rotola-Pukkila i sar. (2019) i Aisala i sar. (2018).

**Tabela 2.** Kulinarske metode sa odgovarajućim režimima temperature i vremena primenjene samo na gljive u prvom delu glavnog eksperimentalnog stadijuma

Broj uzorka	Kulinarska metoda	Temperatura (°C)	Vreme (')
1			30
2			40
3	Kuvanje	80	45 – kontrola*
4			50
5			60
6		50	
7		60	
8	<i>Sous-vide</i>	70 – kontrola*	10
9		80	
10		90	

(\*) označava kontrolne uzorke korišćene tokom senzorne analize

Drugi deo je sadržao pripremu bukovača korišćenjem kulinarske metode *sous-vide*, sa različitim kombinacijama odabranih začina pomešanih sa gljivama u vakuum vreći (Tabela 3.). Na osnovu preliminarne antimikrobne analize i senzornih karakteristika, odabrani su samo majčina dušica i origano kao dodatak gljivama, dok je prethodna faza uticala na odluku o izboru glavne kulinarske metode korišćene sa dodatkom začina. Ukupan udeo začina je iznosio 40 mg g<sup>-1</sup> (4% w/w), a svi eksperimentalni uzorci su pripremani u količini od 100 g bukovače, dok je količina svakog primenjenog začina (majčine dušice i origana) bila varijabilna, što je prikazano u Tabeli 3.

**Tabela 3.** Kulinarske metode sa odgovarajućim režimima temperature, vremena i dodatim začinima primenjene u drugom delu glavnog eksperimentalnog stadijuma

Broj uzorka	Kulinarska metoda	Temperatura i vreme (°C, ')	Kombinacija i proporcija dodatih začina	Udeo dodatih začina na 100g bukovače	Šifra uzorka
1			100% Majčina dušica	4% majčine dušice	100TH
2			75% Majčina dušica 25% Origano	3% majčine dušice: 1% origana	75TH25OR
3		60°C, 20'	50% Majčina dušica 50% Origano	2% majčine dušice : 2% origana	50TH50OR
4			25% Majčina dušica 75% Origano	1% majčine dušice: 3% origana	25TH75OR
5			100% Origano	4% origana	100OR
6	<i>Sous-vide</i>		/	0% začina	KONTROLA20*
7			100% Majčina dušica	4% majčine dušice	100TH
8			75% Majčina dušica 25% Origano	3% majčine dušice: 1% origana	75TH25OR
9		60°C, 30'	50% Majčina dušica 50% Origano	2% majčine dušice: 2% origana	50TH50OR
10			25% Majčina dušica 75% Origano	1% majčine dušice: 3% origana	25TH75OR
11			100% Origano	4% origana	100OR
12			/	0% začina	KONTROLA30*

(\*) označava kontrolne uzorke korišćene tokom senzorne analize

#### 4.2.4. Postupak senzorne evaluacije

Senzorna analiza je izvršena uz pomoć obučenog panela koji se sastojao od devet istraživača sa Poljoprivrednog i Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Održane su dve obuke, svaka u trajanju od 90 minuta, kako bi se ispitanici upoznali sa korišćenim senzornim metodama. Gljive su poslužene na stalnoj sobnoj temperaturi u plastičnim posudama, u roku od 2 h od pripreme uzoraka, kako bi se izbegao gubitak poželjnih mirisa. Testiranje je obavljeno u senzornoj laboratoriji dizajniranoj u skladu sa standardom ISO 8589:2007 na Poljoprivrednom fakultetu Univerziteta u Beogradu.

Prvi deo glavnog istraživanja obuhvatio je ispitivanje razlika u stepenu izraženosti odabranih senzornih atributa uzoraka gljiva u odnosu na kontrolni proizvod. Ispitivano je sedam senzornih atributa koji se odnose na vizuelne karakteristike (intenzitet boje bukovače), miris (intenzitet mirisa

bukovače), teksturu (intenzitet sočnosti bukovače, intenzitet hrskavosti/klizavosti bukovače, sila sabijanja proizvoda između jezika i nepca) i ukus (intenzitet prepoznatljivog ukusa bukovače), kao i posmatranje atipičnih ukusa (kiselo, slatko, hemija, bljutavo, seno) i ocenu prihvatljivosti proizvoda sa aspekta kvaliteta. Ocenjivači su direktno poredili ispitivane uzorke sa kontrolnim uzorkom. Korišćena je dvosmerna skala sa devet podeljaka, pri čemu je vrednost "kontrolnog uzorka" u svakom pojedinačnom slučaju odgovarala centralnom podeljku (označenom sa ocenom "5"). Ocene 1–4 odnosile su se na manji intenzitet, a ocene 6–9 veći intenzitet ispitivanih svojstava, u odnosu na kontrolni uzorak.

Drugi deo glavne evaluacije je obuhvatio procenu intenziteta odabranih senzornih atributa (miris—bukovača, majčina dušica i origano; hrskavost; tvrdoća; ukus—bukovača, majčina dušica i origano) korišćenjem linearne skale od 15 cm sa opisnim terminalnim vrednostima na krajevima (ništa—intenzivno za miris i ukus; gnjecavo-hrskavo za hrskavost; mekano-tvrdo za tvrdoću), kako je predloženo od strane ASTM (1992). Ocenjivači su koristili ove skale na svoj način upoređujući uzorke međusobno, s obzirom da nisu postojali referentni standardi. Za ocenu mirisa, začini su čuvani u zatvorenim staklenim teglama. Na kraju, koristeći 15 cm skale sa označenim terminalnim vrednostima na oba kraja i obeleženim centralnim podeljkom, panelisti su ocenjivali: (1) da li je intenzitet začina manji/veći u odnosu na njihove navike (vrednost koja odgovara centralnom podeljku), kao i (2) ukupnu dopadljivost gljiva sa začinima („veoma se ne dopada“ - „niti se dopada niti ne dopada“ - „veoma se dopada“).

Sva senzorna testiranja su izvršena u dva ponavljanja. Svakom panelisti je poslužena voda i komadić slanog keksa između testiranja uzoraka, kako bi neutralisali zaostale arome (Aisala i sar., 2018). Panelistima nisu pružene posebne instrukcije da progutaju ili ispljunu pojedinačne zalogaje.

#### **4.2.5. Analiza promene boje kulinarški obrađenih gljiva**

Boja svakog uzorka gljive merena je pomoću Hunter parametara boje ( $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ) i  $L_o^*$ ,  $a_o^*$ ,  $b_o^*$  za kontrolne uzorke, koristeći metodu Kompjuterski vizuelni sistem (CVS) (Tomasevic i sar., 2018). Ukupno 10 merenja svakog uzorka analizirano je i uneto u proračun. Zbog vidljivih razlika u boji različitih segmenata tela gljive, vrednosti boje su merene sa tri različita segmenta tela gljive sa sličnim nijansama (šešir, ivica, himenijum), u 10 ponavljanja. Ukupna razlika u boji ( $\Delta E$ ), indeks braon boje (BI), indeks žute boje (YI) i indeks bele boje (WI) kao ključni parametri, prethodno opisani od strane Pathare i sar. (2013), određeni su na osnovu prethodno definisanih jednačina u okviru poglavlja 4.1.6.3.

#### **4.2.6. Analiza profila teksture kulinarški obrađenih gljiva**

Sve kulinarški obrađene gljive su bile izložene jednom ciklusu kompresije korišćenjem uređaja za merenje teksture CT3 (Brookfield Engineering Labs, Inc., SAD). Parametri ispitivanja su bili definisani na sledeći način: brzina—3,3 mm/s i dubina deformacije—1 mm koristeći sondu i obliku igle prečnika 2 mm (Djekic i sar., 2017). Svaki uzorak gljive je postavljen horizontalno i komprimiran pri sobnim uslovima, merenjem sile kompresije zajedno sa parametrima prijanjanja, u deset ponavljanja analize.

#### **4.2.7. Priprema vodenih ekstrakata organske gljive *P. ostreatus* i odabranog začinskog bilja**

Vodeni ekstrakti su pripremljeni prema metodama Sudha i sar. (2012) i Rotola-Pukkila i sar. (2019). Plodonošna tela organske gljive *P. ostreatus* su usitnjena u prah i pripremljena kao vodeni ekstrakti na 85°C tokom 1 sata nakon što su bili sušeni na vazduhu na 55°C do postizanja stalne mase. Ekstrakti su pripremljeni u koncentraciji od 160 mg mL<sup>-1</sup> destilovane vode. Majčina dušica, crni biber i origano su kupljeni u suvom stanju na lokalnom tržištu od dobro poznatog proizvođača (Premia—privatna marka najvećeg maloprodajnog lanca u Srbiji) i pripremljeni su istom metodom u različitim koncentracijama: 40 mg mL<sup>-1</sup> za majčinu dušicu i 20 mg mL<sup>-1</sup> za sirove vodene ekstrakte origana i crnog bibera. Nakon termičke obrade, ekstrakti su centrifugirani 30 minuta na 11.000 obrtaja u minuti i supernatant je čuvan na 4°C za dalju analizu.

#### 4.2.8. Priprema ekstrakta čistog soka organske gljive *P. ostreatus* sa dodatkom odabranog začinskog bilja obrađene kulinarskom metodom *Sous-vide*

Ekstrakti čistog soka pripremljeni su korišćenjem *sous-vide* metode prema poglavlju 4.2.3.1., uz dodatak začina u istim procentima kao što su navedeni u poglavlju 4.2.3.2. Šest vakumiranih vreća izloženo je *sous-vide* tretmanu tokom 30 minuta na 60°C. Sok koji se odvojio u svakoj vreći je sakupljen u sterilnim uslovima i čuvan na 4°C za dalju analizu.

#### 4.2.9. Mikrodilucioni test

Ispitivanje minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) je sprovedeno u mikrotitarskim pločama sa 96 bunara, kao što su prethodno opisali Nikolić i sar. (2019), sa određenim modifikacijama. Za analizu antimikrobne aktivnosti korišćeni su Gram-pozitivni bakterijski sojevi *Enterococcus faecalis* (ATCC 29219) i *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), kao i Gram-negativne bakterije *Escherichia coli* (ATCC 25922) i *Proteus mirabilis* (ATCC 12453), uz upotrebu vodenih ekstrakata začina i organskih bukovača. Odabrane vrste bakterija potiču iz kolekcije ATCC (American Type Culture Collection, Rockville, Maryland). Vodeni ekstrakti su testirani u koncentracionom opsegu od 0,625 do 10 mg mL<sup>-1</sup> (origano i crni biber), od 1,25 do 20 mg mL<sup>-1</sup> (majčina dušica) i od 2,5 do 80 mg mL<sup>-1</sup> (bukovača). Uz sirove vodene ekstrakte začina i organske bukovače, u mikrodilucionoju metodi je ispitan i sok dobijen *sous-vide* pripremom organske bukovače uz dodatak odabranih začina (majčina dušica i origano, dodati u različitim procentnim udelima). Polazna koncentracija čistog soka pripremljenog *sous-vide* metodom bila je 80 mg g<sup>-1</sup> bukovače. Za ovaj deo eksperimenta korišćeni su sledeći sojevi bakterija: *Proteus mirabilis* (ATCC 12453), *Salmonella enteritidis* (ATCC 13078), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29219), *Escherichia coli* (humani izolat), MRSA—methicillin-rezistentni *Staphylococcus aureus* (humani izolat) i *Enterococcus faecalis* (humani izolat).

Bakterijska suspenzija je podešena na približno 5–6 log CFU mL<sup>-1</sup>. Testiranje antimikrobnog potencijala za sve ispitivane uzorke je sprovedeno u dva nezavisna eksperimenta, svaki rađen u tri ponavljanja. U svaku podešenu bakterijsku suspenziju dodato je 150 µL TTC (2,3,5-trifeniltetrazolijum hlorid, Sigma Chemical Co.) koncentracije 10 mg mL<sup>-1</sup> koji služi kao indikator rasta mikroorganizama u vidu crvene boje. U prvi red bunara dodato je 100 µL testiranog uzorka najviše koncentracije, koja je duplo veća od željene testirane koncentracije. U sve ostale bunare u kojima se testira uzorak dodato je 50 µL TSB (Trypton soja bujon), nakon čega su sledile dilucije kako bi se u svakom redu bunara postigla duplo manja koncentracija testiranog uzorka od početne. U sve bunare sa dodatim uzorcima dodato je 50 µL podešene bakterijske suspenzije. Kao kontrola rasta bakterija korišćena je čista bakterijska suspenzija, dok je kao slepa proba korišćen bujon TSB. Mikrotitarske ploče su smeštene u inkubacionu komoru na 37°C tokom 24 h. Najniže koncentracije dodatih ekstrakata bez vidljivog bakterijskog rasta definisane su kao MIC vrednosti.

#### 4.2.10. Metoda šahovske table (Checkerboard assay)

Checkerboard ispitivanje je sprovedeno u mikrotitarskim pločama sa 96 bunara, prema metodi Nikolić i sar. (2019). Za metodu šahovske table korišćeni su Gram-pozitivni bakterijski sojevi *Enterococcus faecalis* (ATCC 29219) i *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), kao i Gram-negativne bakterije *Escherichia coli* (ATCC 25922) i *Proteus mirabilis* (ATCC 12453), koji su odabrani na osnovu rezultata mikrodilucionog testa. MIC vrednosti dobijene mikrodilucionim testom za određeni bakterijski soj predstavlja početnu vrednost za planiranje metode šahovske table. Koncentracije pripremljenih ekstrakata kretale su se od 4MIC do 1/32MIC.

Bakterijski inokulum je podešen na približno 5–6 log CFU mL<sup>-1</sup>. U svaku podešenu bakterijsku suspenziju dodato je 150 µL TTC (10 mg mL<sup>-1</sup>). Testiranje je sprovedeno u dva nezavisna eksperimenta, u tri ponavljanja. Metoda šahovske table uključuje dve testirane komponente kako bi se odredio njihov interaktivni efekat na ispitivanu bakterijsku kulturu. Mikrotitarska ploča se u ovom slučaju posmatra kao šahovska tabla, gde se dilucije prve komponente – komponente A prave po vertikali (duž kolone), a druge, komponente B, po horizontali (duž redova). Prvi red sadrži 100

$\mu\text{L}$  dva puta veće koncentracije (8MIC) komponente A, dok se u sve bunare u preostalim testiranim redovima ploče dodaje 50  $\mu\text{L}$  TBS, a zatim slede dilucije do krajnjeg razblaženja po redovima (1/32MIC). Zatim u ependorfama pravimo serije dvostrukih razblaženja test supstance B, i to tako da nakon dodavanja u bunariće dobijemo finalne koncentracije za testiranje (4MIC do 1/32MIC). Nakon razblaženja komponente A, u svaku kolonu dodaje se po 50  $\mu\text{L}$  iz odgovarajuće koncentracije komponente B (za svaku kolonu imamo pripremljenu odgovarajuću koncentraciju u ependorf kivetu). U svaki bunar koji učestvuje u analizi dodaje se 100  $\mu\text{L}$  podešene bakterijske suspenzije. Kao kontrola rasta bakterija korišćena je čista bakterijska suspenzija, a kao slepa proba je korišćen TSB. Mikrotitarske ploče su smeštene na inkubaciju na 37°C tokom 24 h.

Indeks fracione inhibicione koncentracije (FICI) je izračunat prema navedenoj jednačini za kombinacije dve antimikrobne supstance, a koristi se za razlikovanje tipa interakcije među njima na sledeći način: sinergijski efekat ( $\text{FICI} \leq 0.5$ ); aditivan efekat ( $0.5 < \text{FICI} \leq 1$ ); indiferentan efekat ( $1 < \text{FICI} \leq 4$ ) i antagonistički efekat ( $\text{FICI} > 4$ ).

$$\text{FICI} = \frac{\text{MIC}_A \text{ u kombinaciji}}{\text{MIC}_A} + \frac{\text{MIC}_B \text{ u kombinaciji}}{\text{MIC}_B} \quad (15)$$

### 4.3. Statistička analiza podataka

Za sve analize, osim MTT i alkalnog komet testa, statistička analiza izvršena je primenom jednofaktorske i dvofaktorske analize varijanse (ANOVA), koristeći SPSS Statistics 23. Faktori korišćeni tokom analize bili su vrsta supstrata za gajenje, kao i trajanje skladištenja. Kako bi se utvrdile statističke razlike između podataka, korišćeni su *Tukey post hoc* testovi, uz statističku značajnost na nivou  $*p < 0,05$ . Podaci dobijeni u MTT testu analizirani su pomoću GraphPad Prism 6.01 softvera (Software, Inc), primenom jednofaktorske ANOVA analize sa Dunnetovim post hoc testom, sa postavljenim nivoom značajnosti na  $*p < 0,05$ . Rezultati alkalnog komet testa analizirani su pomoću Statistica 7.0 softvera (StatSoft, Inc), primenom Kolmogorov-Smirnov testa, kao i Mann-Whitney U testa sa definisanom statističkom značajnošću na sledećim nivoima:  $*p < 0,05$ ;  $**p < 0,01$ ;  $***p < 0,001$ .

Statistička analiza rezultata senzorne evaluacije je izvršena korišćenjem t-testa i/ili jednofaktorske analize varijanse (ANOVA). *Tukey post hoc* testovi korišćeni su za diferencijaciju statističkih razlika između podataka, s postavljenom statističkom značajnošću na nivou  $p < 0,05$ . Opšti pregled senzornog profila izvršen je pomoću analize glavnih komponenti (Principal Component Analysis - PCA), uključujući osam deskriptora iz sirovih podataka. Za statističku analizu podataka korišćeni su SPSS Statistics 23 i Microsoft Excel 2013.

## 5. Rezultati i diskusija

### 5.1. Hemijski sastav supstrata korišćenih za gajenje gljive *P. ostreatus*

Hemijske, senzorne i funkcionalne osobine gljiva direktno su povezane sa supstratom koji se koristi za gajenje (Oyetayo i Ariyo, 2013). Analiziranje *Pleurotus* spp. gajenih na supstratu sa dodatkom otpada od šećerne trske (Ortega i sar., 1992) pokazalo je povećanje sadržaja azota u gljivama povezano sa količinom azota prisutnom u početnom supstratu, uzimajući u obzir da je komercijalni supstrat za gajenje *Pleurotus* spp. - pšenična slama, siromašan azotom, sa opsegom od 0,03% do 0,1% (Machado i sar., 2016), što se potvrđuje rezultatima iz Tabele 4., 0,65% azota u supstratu od pšenične slame. Prema tome, rezultati elementalne analize (Tabela 4.) pokazuju značajan porast vrednosti sadržaja azota u uzorcima sa povećanjem udela otpada grožđa u supstratu. Sadržaj azota ima važnu ulogu u sintezi enzima i mnogih drugih komponenata, kao što su proteini, nukleinske kiseline, purini i pirimidini, a i za sintezu polisaharida, kao što je npr. hitin (Abdullah i sar., 2016; Singh i sar., 2008). Miles i Chang (1997) ukazuju da veoma veliki udeo azota u gljivama čine "ne-proteinske" komponente, prisutne u obliku hitina ćelijskog zida ili u obliku slobodnih aminokiselina i nukleinskih kiselina. Samo 60%–77% azota čini sadržaj proteina, a univerzalni NP faktor 6,26 korišćen za konverziju je previše visok za primenu na gljivama. Ukupni proteini izračunati iz količine azota iznose 14,28 g na 100 g u kontrolnim uzorcima, kako je navedeno u poglavlju Materijali i metode.

**Tabela 4.** Elementalna analiza uzoraka gljive *P. ostreatus* gajenih na komini grožđa, kontrolnog uzorka i komine grožđa kao supstrata

Elementalna analiza	N (%)	C (%)	H (%)	Količina proteina po proračunu (g/100g SM)*
<b>100S*</b>	3,26	39,71	7,08	14,28
<b>100P</b>	6,73	39,54	7,00	29,48
<b>80P20S</b>	4,76	41,11	7,41	20,85
<b>50P50S</b>	3,44	38,71	6,94	15,07
<b>20P80S</b>	2,91	39,35	6,88	12,75
<b>Uzorak komine grožđa</b>	3,52	45,85	6,42	22,00
<b>Uzorak pšenične slame</b>	0,65	42,04	6,26	4,06

\*Azot-protein(NP) konverzioni faktori su: 6,25 za uzorke komine grožđa i pšenične slame; 4,38 za uzorke gljiva.

Uzorcima 100S, 100P, 80P20S, 50P50S i 20P80S predstavljaju plodnosnata tela gljive *P. ostreatus* gajene na mešavinama sa kominom grožđa, dok su uzorci komine grožđa i pšenične slame materijali koji se koriste kao supstrat za inokulaciju gljive.

Osnovni izvori hranljivih materija za rast micelijuma gljiva koje razlažu drvenaste supstrate (uključujući i bukovaču), tj. celuloza, hemiceluloza i lignin, pripadaju ugljenim hidratima sastavljenim od jedinica D-glukoze povezanih  $\beta(1\rightarrow4)$ -glikozidnim vezama. Iste jedinice su takođe glavni sastojci lignoceluloznih otpada. Gljive bele truleži razlažu ove veze koristeći svoje enzime, što lignocelulozne supstrate čini idealnim za njihovu kultivaciju (Grimm i Wösten, 2018; Sundarraj i Ranganathan, 2018).

Analiza osnovnih sastojaka supstrata, pšenične slame (sWS), sojine ljuske (sSBN) i suncokretove ljuske (sSFW) pre inokulacije micelijuma i nakon ciklusa fruktifikacije, korišćena je za određivanje ukupnih rastvorljivih i nerastvorljivih vlakana, uključujući lignin, hemicelulozu i celulozu. Neutralna detergentska vlakna (NDF) sastoje se od hemiceluloze, celuloze, lignina i nerastvorljivog



pepela, dok kisela detergentska vlakna (ADF) sadrže jedan sastojak manje - hemicelulozu (Holtzaple, 2003).

Što se tiče rezultata početnih supstrata, sadržaj NDF, celuloze i hemiceluloze bio je najviši u sWS, dok je sSFW imao najviši sadržaj lignina i ADF. Supstrati nakon fruktifikacije pokazali su različite promene u osnovnim sastojcima: *P. ostreatus* je jednakom merom koristio sve sastojke tokom fruktifikacije na sWS, dok je glavni sastojak koji se koristio u sSBN bio hemiceluloza (Tabela 5.). Ove razlike mogu se objasniti hemijskom strukturom supstrata, koja određuje afinitet enzima gljiva prema supstratu i utiče na sastav supstrata i uslove okoline. Hemiceluloza, kompleksni polisaharid sastavljen od ksilana, ksiloglukana i manana, zahteva kompleksno delovanje endo-enzima kako bi oslobodila različite mono- i disaharide, poput D-ksiloze, glavnog sastojka ksilana (Souza, 2013). Celuloza i lignin su glavni sastojci ljuske suncokreta, praćeni redukujućim šećerima, koji čine gotovo 25% ukupne mase ljuske. Skoro 50% postojećih redukujućih šećera čini ksiloza (Cancalon i Superieure, 1971). Na osnovu ovih činjenica, može se pretpostaviti da su gljive tokom fruktifikacije koristile "lako dostupan šećer", što objašnjava nedostatak promena u lignoceluloznim sastojcima ovog supstrata. Druga strana ove pretpostavke je da je sastav sojinog i suncokretovog supstrata, koji sadrže određenu količinu masnih kiselina, doveo do onemogućavanja pristupa lignoceluloznim sastojcima. Salehi i sar. (2010) ukazuju na interakciju između lignina i oksidacije ulja u drvetu, gde ulje difunduje u fazu lignina, što može biti objašnjenje izostanka ili smanjenja dostupnosti lignoceluloznih sastojaka i dodatnog afiniteta ka visoko dostupnim monosaharidima.

**Tabela 5.** Suva materija, NDF, ADF, lignin, hemicelulozni i celulozni sastav supstrata od pšenične slame, sojine i suncokretove ljuske pre i posle plodonošenja

Šifra supstrata	sWS*	F-sWS	sSBN	F-sSBN	sSFW	F-sSFW
<b>Sadržaj suve materije (%)</b>	93,34	92,59	90,84	90,01	92,5	92,68
<b>NDF (%)</b>	87,61 ± 0,26 <sup>c</sup>	78,53 ± 0,58 <sup>c</sup>	68,31 ± 0,43 <sup>b</sup>	62,99 ± 0,44 <sup>a</sup>	80,89 ± 0,87 <sup>d</sup>	86,18 ± 0,41 <sup>e</sup>
<b>ADF (%)</b>	58,45 ± 0,20 <sup>d</sup>	50,95 ± 0,06 <sup>b</sup>	49,97 ± 0,20 <sup>a</sup>	52,00 ± 0,32 <sup>c</sup>	63,50 ± 0,35 <sup>e</sup>	66,60 ± 0,02 <sup>f</sup>
<b>ADL (%)</b>	9,23 ± 0,20 <sup>d</sup>	6,28 ± 0,06 <sup>c</sup>	2,04 ± 0,09 <sup>a</sup>	5,14 ± 0,45 <sup>b</sup>	22,51 ± 0,03 <sup>e</sup>	24,51 ± 0,20 <sup>f</sup>
<b>Hemiceluloza (%)</b>	29,16 ± 0,06 <sup>c</sup>	27,57 ± 0,51 <sup>d</sup>	18,34 ± 0,64 <sup>b</sup>	10,99 ± 0,12 <sup>a</sup>	17,39 ± 0,52 <sup>b</sup>	19,58 ± 0,39 <sup>c</sup>
<b>Celuloza (%)</b>	49,22 ± 0,00 <sup>c</sup>	46,17 ± 1,37 <sup>b</sup>	47,93 ± 0,30 <sup>bc</sup>	46,86 ± 0,77 <sup>b</sup>	40,98 ± 0,31 <sup>a</sup>	42,09 ± 0,18 <sup>a</sup>

Srednje vrednosti u tri ponavljanja ± standardna devijacija. Srednje vrednosti u istoj koloni sa različitim malim slovima su značajno različite ( $p < 0,05$ ). sWS\* – pšenična slama (kontrola); F-sWS – pšenična slama nakon plodonošenja; sSBN – sojina ljuska; F-sSBN – sojina ljuska nakon plodonošenja; sSFW – suncokretova ljuska; F-sSFW – suncokretova ljuska nakon plodonošenja

## 5.2. Rezultati analize svežih gljiva

### 5.2.1. Rezultati produktivnosti gljiva

Komina grožđa, kao alternativni supstrat za gajenje *P. ostreatus*, pokazuje određeni uticaj na rast gljiva i njihovu biološku efikasnost. Prema Tabeli 6., ukupan prinos gljiva raste sa smanjenjem udela komine u supstratu, sa najvišom vrednošću u kontrolnom uzorku. Primećuje se značajna razlika između kontrolnog uzorka i svih ostalih uzoraka sa sadržajem komine za sve parametre, gde kontrolni uzorak pokazuje najbolje rezultate, kao što su najkraće vreme potrebno za rast micelijuma u danima i u mm po danu, kao i najkraće vreme potrebno za inicijaciju primordijuma, zajedno sa 50P50S. BE (%) raste sa smanjenjem udela komine i dostiže maksimum u kontrolnom uzorku. Sastav komine od grožđa, sa ograničenom razmenom gasova u vreći sa supstratom, ograničava rast micelijuma i formiranje plodonosnih tela. Dodavanjem pšenične slame, rastresitost supstrata se povećava, a time i mogućnost razmene gasova, što pokazuje trend povećanja BE (%) sa povećanjem udela pšenične slame. Ovo može biti opravdano istraživanjem Pereira i sar., (2017). Struktura otpada od luka kao supstrata za gajenje *Pleurotus sajor-caju* uzrokovala je akumulaciju tečnosti na dnu vreće nakon sterilizacije i ograničila razmenu gasova, potrebnu za rast micelijuma i formiranje

plodonosnih tela. Ovo je takođe povećalo rizik od naknadne kontaminacije. Ovaj parametar je važan kako bi se ispitalo dejstvo korišćenog supstrata na vreme potrebno za rast micelijuma i prinos gljiva, što je prethodno publikovano u radu Islam i Riaz (2017).

Kada su u pitanju smeše supstrata koji sadrže ljusku soje i suncokreta, parametri produktivnosti gljiva pokazali su razliku u odnosu na sastav (Tabela 7.). Naime, brzina rasta micelijuma bila je veća u smešama supstrata koji sadrže i pšeničnu slamu (WS), dok su supstrati sa čistim ili mešanim otpadom hrane pokazali sporiji rast micelijuma. Prostor za razmenu gasova bio je ograničen u supstratima sa prehrambenim otpadom, dok je dodatak pšenične slame povećao rastresitost supstrata. Kao što je već zaključeno, razmena gasova u smešama supstrata ključna je za normalan rast micelijuma i formiranje plodonosnih tela. Osim ograničene razmene gasova i rizika od postkontaminacije, alternativne smeše sadrže jednostavne šećere koji dostižu različite stadijume karamelizacije tokom pripreme supstrata, što dovodi do njegovog zgušnjavanja. Iako ova vrsta gljiva prirodno raste na trulom drveću gde kolonizacija traje određeno vreme, konvencionalno gajenje zahteva bržu stopu rasta iz ekonomskih razloga. Brzina rasta micelijuma bila je najveća kod WS, rezultirajući najkraćim vremenom potrebnim za kolonizaciju supstrata. To bi moglo biti rezultat rastresitosti materijala i lako dostupnih jedinjenja koje gljive koriste kao izvor energije. Hemiceluloza je dominantna komponenta lignoceluloznih jedinjenja u WS i izvor je "lako dostupnih šećera". Ovo bi moglo biti povezano sa rezultatima rasta micelijuma i vremenom potrebnim za berbu, gde je WS bio dominantan.

S druge strane, ako se porede smeše koje sadrže različite kombinacije ljuske (SBN i/ili SFW), najkraće vreme potrebno za završetak rasta micelijuma utvrđeno je za kombinaciju SBN:SFW, a zatim za čisti SFW supstrat. Na smešama koje sadrže WS micelijum je najduže prorastao. Ovaj rezultat može se objasniti činjenicom da različite zapremine različitih sastojaka supstrata imaju jednaku masu.

Supstrati koji sadrže SFW su rezultirali najdužim formiranjem primordijuma, sa izuzetkom SBN:SFW, koji je pokazao najbolji rezultat. S druge strane, na smešama sa sojinim otpadom najkasnije je počela berba gljiva, dok je vreme korišćenjem smeše SBN:SFW:WS bilo najkraće. Rezultati dobijeni za kominu grožđa ukazuju na duže vreme potrebno za završetak rasta micelijuma za sve uzorke koji sadrže veću količinu otpada od grožđa u smeši za gajenje, dok je vreme berbe bilo kraće, što je prethodno i publikovano (Doroški i sar., 2021). Struktura supstrata kao što su otpad od grožđa i otpad od luka (Pereira i sar., 2017) rezultuje ograničenjem razmene gasova, što je važno za formiranje micelijuma i plodonosnih tela.

Biološka efikasnost i ukupan prinos gljiva bili su najbolji za čist SBN supstrat, zatim za tri preostala uzorka koji sadrže ljusku soje u mešavini, dok su smeše sa SFW supstratom dale najniži prinos. Ovo istraživanje pokazalo je bolje rezultate prinosa i biološke efikasnosti u odnosu na prethodna istraživanja (Doroški i sar., 2021). Uddin i sar. (2010) su izvestili o boljoj biološkoj efikasnosti zimi (14-25°C) nego leti (25-30°C). Biološki prinos *P. ostreatus* u uslovima zimske sezone (januar i februar) i u najhladnijem opsegu temperature između 14-25°C u tunelu za gajenje pokazao se kao najbolji. S obzirom da su temperature gajenja u prethodnim istraživanjima koja su objavljena (Doroški i sar., 2021) bile između 20-25°C, što je drugačije od uslova u istraživanju vezanom za otpad od soje i suncokreta (10-12°C), razlika u biološkoj efikasnosti može zavisiti od atmosferskih uslova, pored uticaja vrste supstrata. Sveukupno, biološka efikasnost za sve SEO (engl. The Seed And Edible Oil Industry) materijale korišćene u ovom delu eksperimenta bila je ispod 50%, što se smatra minimumom za komercijalnu i profitabilnu proizvodnju (Kumla i sar., 2020). Međutim, rezultati su pokazali da ni kontrolni uzorak, pšenična slama, dala je rezultat BE oko 15%, što se u komercijalnim uslovima smatra odličnim prinosom.

Ipak, ovi materijali ne bi trebalo da se odbace zbog niske biološke efikasnosti. U pogledu smanjenja količine otpada u prehrambenoj industriji i ekoloških i društvenih aspekata korišćenja SEO, čak i niža biološka efikasnost može biti opravdana, posebno kada se kombinuje sa drugim,

komercijalnijim supstratima. Osim toga, konačna namena plodonosnih tela, na primer, kao medicinskih proizvoda za funkcionalnu hranu sa dodatom vrednošću i cenom, mogla bi odrediti konačnu komercijalnu vrednost alternativnih supstrata.

**Tabela 6.** Sastav supstrata korišćenog za inokulaciju micelijuma i uticaj komine grožđa kao supstrata na produktivnost gljive *P. ostreatus*

Šifra supstrata	Ukupan prinos gljiva (g)	Potrebno vreme za branje (dani)	Potrebno vreme za potpun rast micelijuma (dani)	Brzina rasta micelijuma (mm/dan)	Potrebno vreme za formiranje primordijuma (dani)	Biološka efikasnost - BE (%)
<b>100P</b>	83,33 ± 11,02 <sup>a</sup>	5,33 ± 0,58	36,50 ± 1,00 <sup>a</sup>	3,80 ± 0,60 <sup>a</sup>	9,75 ± 4,35	1,78
<b>80P20S</b>	141,00 ± 74,95 <sup>ab</sup>	6,00 ± 1,41	32,00 ± 0,00 <sup>b</sup>	4,70 ± 0,80 <sup>a</sup>	11,50 ± 6,36	3,09
<b>50P50S</b>	379,00 ± 84,97 <sup>bc</sup>	6,50 ± 0,58	31,00 ± 1,15 <sup>b</sup>	7,00 ± 0,50 <sup>b</sup>	5,50 ± 0,58	8,92
<b>20P80S</b>	621,00 ± 115,29 <sup>c</sup>	6,00 ± 1,00	30,00 ± 0,00 <sup>c</sup>	9,30 ± 0,60 <sup>c</sup>	9,00 ± 4,00	15,64
<b>100S</b>	964,00 ± 84,59 <sup>d</sup>	7,00 ± 1,00	20,00 ± 1,00 <sup>d</sup>	15,60 ± 4,80 <sup>d</sup>	6,00 ± 1,00	19,28

Srednje vrednosti u tri ponavljanja ± standardna devijacija. Srednje vrednosti u istoj koloni sa različitim malim slovima i srednje vrednosti u istom redu sa različitim velikim slovima su značajno različite ( $P < 0,05$ ). Legenda: 100P - 100% komina grožđa; 80P20S - 80% komina grožđa: 20% pšenična slama; 50P50S - 50% komina grožđa: 50% pšenična slama; 20P80S - 20% komina grožđa: 80% pšenična slama; 100S - 100% pšenična slama.

**Tabela 7.** Sastav supstrata korišćenog za inokulaciju micelijuma i uticaj ljuske soje i suncokreta kao supstrata na produktivnost gljive *P. ostreatus*

Šifra supstrata	Ukupan prinos gljiva (g)	Potrebno vreme za branje (dani)	Potrebno vreme za potpun rast micelijuma (dani)	Brzina rasta micelijuma (mm/dan)	Potrebno vreme za formiranje primordijuma (dani)	Biološka efikasnost - BE (%)
<b>SBN</b>	1114,75 ± 76,32 <sup>d</sup>	10,25 ± 1,26 <sup>c</sup>	27,75 ± 0,96 <sup>c</sup>	5,42 ± 1,98 <sup>a</sup>	8,00 ± 0,00 <sup>ab</sup>	37,16
<b>SBN : SFW</b>	914,50 ± 125,70 <sup>cd</sup>	9,75 ± 1,71 <sup>bc</sup>	23,25 ± 2,63 <sup>ab</sup>	6,03 ± 2,10 <sup>ab</sup>	7,75 ± 0,50 <sup>ab</sup>	30,48
<b>SFW</b>	531,80 ± 102,07 <sup>ab</sup>	8,60 ± 1,14 <sup>bc</sup>	24,4 ± 2,61 <sup>abc</sup>	6,62 ± 2,09 <sup>bc</sup>	10,00 ± 2,73 <sup>b</sup>	18,19
<b>SBN : SFW : WS</b>	753,00 ± 102,08 <sup>bc</sup>	7,75 ± 0,50 <sup>ab</sup>	25,00 ± 0,00 <sup>bc</sup>	7,11 ± 1,69 <sup>c</sup>	9,25 ± 0,50 <sup>b</sup>	25,10
<b>SBN : WS</b>	730,50 ± 162,65 <sup>abc</sup>	9,75 ± 0,50 <sup>bc</sup>	27,5 ± 1,29 <sup>c</sup>	7,34 ± 2,73 <sup>c</sup>	8,50 ± 1,00 <sup>ab</sup>	24,35
<b>SFW : WS</b>	514,25 ± 94,94 <sup>ab</sup>	9,5 ± 1,00 <sup>bc</sup>	26,00 ± 1,41 <sup>bc</sup>	7,38 ± 1,51 <sup>c</sup>	9,75 ± 0,50 <sup>b</sup>	17,14
<b>WS</b>	500,00 ± 20,00 <sup>a</sup>	5,33 ± 0,58 <sup>a</sup>	20,67 ± 0,58 <sup>a</sup>	8,65 ± 1,50 <sup>d</sup>	6,00 ± 1,00 <sup>a</sup>	16,67

Srednje vrednosti u tri ponavljanja ± standardna devijacija. Srednje vrednosti u istoj koloni sa različitim malim slovima su značajno različite ( $P < 0,05$ ).

Legenda: SBN – sojina ljuska; SFW – suncokretova ljuska; WS – pšenična slama

### 5.2.2. Rezultati analize teksture gljiva

Tvrdoća gljiva opada sa povećanjem broja dana skladištenja, pri čemu uzorci 50P50S i 20P80S pokazuju najveće smanjenje od dana berbe nadalje (Tabela 8.). Ovaj parametar raste sa smanjenjem procenta komine grožđa u smeši supstrata, što znači da smeša sa 20% komine grožđa pokazuje najvišu vrednost. Smanjenje tvrdoće počinje od 7. dana skladištenja za svaki uzorak. Iako razlike u vrednosti parametra tvrdoće u različitim uzorcima nisu statistički značajne ( $p < 0,05$ ), kohezivnost plodonosnih tela pokazuje stalni porast tokom roka skladištenja uzoraka 100P i 20P80S. Povećana vrednost kohezivnosti nije statistički značajna za uzorak 100P, dok 20P80S pokazuje smanjenje od 7. dana. Druga dva uzorka pokazuju maksimalnu vrednost kohezivnosti 7. dana, sa daljim smanjenjem tokom dužeg skladištenja. Oba uzorka pokazuju primetnu razliku. Razlike između vrednosti u različitim uzorcima nisu značajne, osim za vrednosti 14. dana roka skladištenja.

Treći parametar teksture, elastičnost, pokazuje značajne razlike tokom roka skladištenja za uzorke 80P20S i 50P50S, sa suprotnim trendom rasta, dok druga dva uzorka nemaju značajne promene. S druge strane, razlike između uzoraka su primetne. Kontrolni uzorak 100S pokazao je sledeće vrednosti za tvrdoću, kohezivnost i elastičnost:  $316,5 \pm 180,7$ ;  $0,62 \pm 0,06$ ; i  $3,22 \pm 0,15$ , datim redom.

Tvrdoća 1 i 2 predstavljaju maksimalnu silu prvog i drugog ciklusa pritiska (Kotwaliwale i sar., 2007). Parametri tvrdoće 1 i 2 nisu pokazali značajne promene u toku skladištenja od 14. dana, osim kod uzorka SBN:SFW:WS, gde se značajan pad primećuje nakon 7 dana skladištenja (Tabela 9.). Tvrdoća kontrolnog uzorka (WS) bila je značajno niža u poređenju sa drugim uzorcima. Nketia i sar. (2020) publikovali su rezultate analiziranja teksture gljiva konzervisanih u salamuri i ulju, a potom skladištenih tokom 6 meseci. Njihovi rezultati pokazali su da je tekstura svežih gljiva imala izraženu tvrdoću, koja se smanjila tokom procesa konzervisanja i trajanja skladištenja. Villaescusa i Gil (2003) objavili su rezultate teksture *P. ostreatus*, koja se promenila od čvrste do mekane nakon 11. dana skladištenja. *P. ostreatus* gajen na smešama supstrata sa otpadom od grožđa pokazao je manji intenzitet tvrdoće 0. dana skladištenja i veće smanjenje tokom roka trajanja u poređenju sa ovim istraživanjem (Doroški i sar., 2021), osim za kontrolni uzorak.

Razlika u kohezivnosti tokom perioda skladištenja primećuje se kod uzoraka SBN i WS(kontrola). Vrednost kohezivnosti za kontrolni uzorak bila je najviša 0. dana. Parametar elastičnosti nije pokazao značajne razlike, osim za SBN:SFW i SFW sa statistički značajnim promenama (Tabela 9.).

Parametri teksture tokom vremena hladnog skladištenja utiču na promene u propustljivosti membrane, što ima efekat na promenu boje. Promene u teksturi takođe su povezane sa poremećajem centralne vakuole, širenjem međucelijskog prostora i retrakcijom hifa (Zivanovic i sar., 2000). Prema drugim istraživanjima, smanjenje tvrdoće povezano je sa degradacijom polisaharida i proteina, migracijom vode, ali i rastom ćelija (Oz i sar., 2015). Promena parametra kohezivnosti publikovana je od strane Kotwaliwale i sar., (2007). Naime, upijanje vlage u prazan kapilarni prostor dovodi do povećanja kohezivnosti tokom vremena skladištenja.

Prema istraživanju teksturnih svojstava gljiva *A. bisporus* (Djekic i sar., 2017), primećen je isti trend, sa postepenim smanjenjem tvrdoće od 5. dana skladištenja. Rezultati za parametre kohezivnosti su različiti, sa stalnim povećanjem tokom vremena skladištenja. Iste rezultate objavljuju i Jafri i sar. (2013), koji su proučavali parametre kvaliteta gljiva *Pleurotus florida*. Rezultati za parametar elastičnosti takođe su različiti za *P. florida*, sa stalnim smanjenjem tokom trajanja skladištenja.

Glavni pokazatelj gubitka mase i promena u teksturi nakon berbe je visoka stopa disanja svežih proizvoda. Tokom skladištenja nakon berbe, rastvorljivi čvrsti sastojci iz svežih proizvoda podležu kataboličkim reakcijama uz oslobađanje energije, što smanjuje nutritivna svojstva i vek trajanja proizvoda (Ye i sar., 2012).

**Tabela 8.** Uticaj komine grožđa kao supstrata na karakteristike teksture i boje gljive *P. ostreatus*

Uzorci	100P	80P20S	50P50S	20P80S
<b>Karakteristike teksture</b>				
<b>Tvrdoća (N)</b>				
Dan 0	232,00 ± 97,80 <sup>a</sup>	158,50 ± 40,40 <sup>a</sup>	306,10 ± 243,00 <sup>a</sup>	321,00 ± 112,00 <sup>a</sup>
Dan 7	143,90 ± 30,40 <sup>b</sup>	116,30 ± 32,40 <sup>ab</sup>	112,00 ± 47,90 <sup>ab</sup>	161,40 ± 85,00 <sup>b</sup>
Dan 14	97,30 ± 48,70 <sup>b</sup>	78,14 ± 36,70 <sup>b</sup>	73,90 ± 20,40 <sup>b</sup>	104,70 ± 34,10 <sup>b</sup>
<b>Kohezivnost</b>				
Dan 0	0,78 ± 0,24	0,74 ± 0,11 <sup>ab</sup>	0,60 ± 0,20 <sup>a</sup>	0,56 ± 0,18 <sup>a</sup>
Dan 7	0,93 ± 0,55	1,05 ± 0,47 <sup>a</sup>	0,90 ± 0,30 <sup>b</sup>	0,95 ± 0,32 <sup>b</sup>
Dan 14	1,04 ± 0,32 <sup>AB</sup>	0,58 ± 0,26 <sup>b, C</sup>	0,75 ± 0,05 <sup>ab, BC</sup>	1,09 ± 0,30 <sup>b, A</sup>
<b>Elastičnost</b>				
Dan 0	3,30 ± 0,20 <sup>AB</sup>	3,50 ± 0,30 <sup>a, B</sup>	3,20 ± 0,30 <sup>a, AB</sup>	3,00 ± 0,40 <sup>A</sup>
Dan 7	3,30 ± 0,40 <sup>AB</sup>	3,20 ± 0,20 <sup>b, AB</sup>	3,50 ± 0,10 <sup>b, B</sup>	3,10 ± 0,20 <sup>A</sup>
Dan 14	3,20 ± 0,20 <sup>A</sup>	3,50 ± 0,10 <sup>a, B</sup>	3,40 ± 0,20 <sup>ab, AB</sup>	3,20 ± 0,30 <sup>AB</sup>
<b>Karakteristike boje</b>				
<b>Ukupna razlika boje (ΔE)</b>				
Dan 0	19,20 ± 2,70	19,90 ± 3,40	19,60 ± 3,50 <sup>a</sup>	15,60 ± 4,70 <sup>a</sup>
Dan 7	20,20 ± 2,30	20,70 ± 2,20	18,30 ± 4,60 <sup>a</sup>	19,40 ± 1,60 <sup>b</sup>
Dan 14	18,40 ± 2,20 <sup>A</sup>	17,50 ± 3,00 <sup>A</sup>	12,80 ± 4,20 <sup>b, B</sup>	8,80 ± 1,90 <sup>c, C</sup>
<b>Indeks braon boje (BI)</b>				
Dan 0	8,60 ± 1,00 <sup>a</sup>	8,20 ± 3,80	8,40 ± 2,30 <sup>a</sup>	8,10 ± 2,30 <sup>a</sup>
Dan 7	13,70 ± 4,00 <sup>b, AB</sup>	8,30 ± 5,30 <sup>A</sup>	16,80 ± 8,70 <sup>b, B</sup>	11,70 ± 1,30 <sup>b, AB</sup>
Dan 14	19,60 ± 4,50 <sup>c, A</sup>	11,90 ± 3,40 <sup>B</sup>	21,00 ± 5,50 <sup>b, A</sup>	21,80 ± 3,50 <sup>c, A</sup>
<b>Indeks žute boje (YI)</b>				
Dan 0	9,70 ± 1,30 <sup>a</sup>	6,90 ± 2,70 <sup>a</sup>	8,50 ± 2,40 <sup>a</sup>	8,30 ± 2,50 <sup>a</sup>
Dan 7	17,60 ± 4,80 <sup>b, AB</sup>	6,80 ± 1,00 <sup>a, C</sup>	19,50 ± 8,50 <sup>b, B</sup>	13,10 ± 1,40 <sup>b, A</sup>
Dan 14	22,80 ± 4,90 <sup>c, A</sup>	13,50 ± 2,80 <sup>b, B</sup>	20,90 ± 5,40 <sup>b, A</sup>	22,90 ± 3,60 <sup>c, A</sup>

Srednje vrednosti deset ponavljanja ± standardna devijacija. Srednje vrednosti u istoj koloni sa različitim malim slovima i srednje vrednosti u istom redu sa različitim velikim slovima su značajno različite ( $p < 0,05$ ). Legenda: 100P - 100% komina grožđa; 80P20S - 80% komina grožđa; 20% pšenična slama; 50P50S - 50% komina grožđa; 50% pšenična slama; 20P80S - 20% komina grožđa; 80% pšenična slama

Kontrolni uzorak 100S\* - Dan 0: tvrdoća (N) 316,5 ± 180,7, kohezivnost 0,62 ± 0,06 i elastičnost 3,22 ± 0,15  
 Dan 0: indeks braon boje 16,18 ± 1,75 i indeks žute boje 14,78 ± 2,00

**Tabela 9.** Uticaj ljuske soje i suncokreta kao supstrata na karakteristike teksture i boje gljive *P. ostreatus*

Uzorci	SBN	SBN : SFW	SFW	SBN : SFW : WS	SBN : WS	SFW : WS	WS (kontrola)
<b>Karakteristike teksture</b>							
<b>Tvrdoća 1 (N)</b>							
Dan 0	326,00 ± 160,12 <sup>a</sup>	337,32 ± 115,86 <sup>a</sup>	304,80 ± 89,07 <sup>a</sup>	593,71 ± 185,21 <sup>b,A</sup>	325,45 ± 107,09 <sup>a</sup>	371,20 ± 29,85 <sup>a</sup>	225,70 ± 122,12 <sup>a,A</sup>
Dan 7	340,67 ± 141,61 <sup>a</sup>	316,94 ± 92,20 <sup>ab</sup>	334,67 ± 108,92 <sup>a</sup>	410,50 ± 95,25 <sup>a,B</sup>	343,25 ± 82,02 <sup>a</sup>	378,86 ± 116,57 <sup>a</sup>	178,00 ± 51,89 <sup>b,AB</sup>
Dan 14	231,82 ± 135,51 <sup>ab</sup>	272,22 ± 91,20 <sup>ab</sup>	271,92 ± 188,48 <sup>ab</sup>	388,50 ± 136,02 <sup>a,B</sup>	290,10 ± 73,27 <sup>a</sup>	324,57 ± 110,39 <sup>a</sup>	100,12 ± 44,58 <sup>b,B</sup>
<b>Tvrdoća 2 (N)</b>							
Dan 0	307,55 ± 155,22 <sup>a</sup>	318,26 ± 111,14 <sup>a</sup>	278,70 ± 76,37 <sup>a</sup>	557,14 ± 180,37 <sup>b,A</sup>	310,82 ± 111,97 <sup>a</sup>	355,00 ± 30,06 <sup>a</sup>	212,50 ± 118,27 <sup>a,A</sup>
Dan 7	330,50 ± 133,90 <sup>a</sup>	299,37 ± 89,28 <sup>ab</sup>	295,50 ± 73,48 <sup>ab</sup>	376,00 ± 91,48 <sup>a,B</sup>	323,50 ± 75,11 <sup>a</sup>	339,29 ± 105,32 <sup>a</sup>	167,71 ± 49,13 <sup>b,AB</sup>
Dan 14	218,27 ± 129,48 <sup>ab</sup>	259,22 ± 90,54 <sup>ab</sup>	257,31 ± 179,43 <sup>ab</sup>	348,50 ± 119,18 <sup>a,B</sup>	270,50 ± 70,91 <sup>a</sup>	300,00 ± 96,15 <sup>a</sup>	94,87 ± 41,67 <sup>b,B</sup>
<b>Kohezivnost</b>							
Dan 0	0,60 ± 0,20 <sup>a,A</sup>	0,72 ± 0,07 <sup>abc</sup>	0,74 ± 0,09 <sup>bc</sup>	0,63 ± 0,05 <sup>ab</sup>	0,73 ± 0,06 <sup>abc</sup>	0,64 ± 0,06 <sup>abc</sup>	0,77 ± 0,05 <sup>c,AB</sup>
Dan 7	0,80 ± 0,06 <sup>B</sup>	0,73 ± 0,05	0,71 ± 0,07	0,73 ± 0,13	1,02 ± 0,58	0,87 ± 0,41	0,86 ± 0,15 <sup>A</sup>
Dan 14	0,76 ± 0,09 <sup>AB</sup>	0,69 ± 0,08	0,78 ± 0,11	0,72 ± 0,15	0,82 ± 0,26	0,67 ± 0,07	0,72 ± 0,08 <sup>B</sup>
<b>Elastičnost</b>							
Dan 0	3,20 ± 0,46	3,46 ± 0,12 <sup>AB</sup>	3,45 ± 0,13 <sup>AB</sup>	3,47 ± 0,13	3,45 ± 0,25	3,34 ± 0,05	3,47 ± 0,16
Dan 7	3,42 ± 0,55	3,50 ± 0,12 <sup>A</sup>	3,37 ± 0,22 <sup>A</sup>	3,40 ± 0,08	3,32 ± 0,37	3,27 ± 0,17	3,44 ± 0,16
Dan 14	3,40 ± 0,32	3,36 ± 0,21 <sup>B</sup>	3,53 ± 0,14 <sup>B</sup>	3,43 ± 0,26	3,35 ± 0,41	3,29 ± 0,24	3,34 ± 0,19
<b>Karakteristike boje</b>							
<b>Ukupna razlika boje (ΔE)</b>							
Dan 0	31,16 ± 9,13 <sup>c,A</sup>	30,05 ± 3,62 <sup>c,A</sup>	27,46 ± 9,26 <sup>bc,A</sup>	16,63 ± 4,56 <sup>a,A</sup>	19,12 ± 8,42 <sup>ab,A</sup>	28,50 ± 3,79 <sup>c,A</sup>	-
Dan 7	22,25 ± 4,58 <sup>b,B</sup>	25,39 ± 3,29 <sup>bc,B</sup>	13,56 ± 4,11 <sup>a,B</sup>	16,19 ± 3,21 <sup>a,A</sup>	28,14 ± 3,15 <sup>c,B</sup>	24,70 ± 4,04 <sup>bc,A</sup>	-
Dan 14	10,77 ± 2,33 <sup>b,C</sup>	16,46 ± 2,77 <sup>c,C</sup>	16,53 ± 1,84 <sup>c,B</sup>	4,96 ± 1,59 <sup>a,B</sup>	16,88 ± 2,49 <sup>c,A</sup>	19,12 ± 2,95 <sup>c,B</sup>	-
<b>Indeks braon boje (BI)</b>							
Dan 0	21,11 ± 10,71 <sup>ab,A</sup>	45,04 ± 3,90 <sup>e,A</sup>	44,09 ± 12,04 <sup>de,A</sup>	33,03 ± 7,09 <sup>cd,AB</sup>	26,63 ± 11,23 <sup>bc,A</sup>	43,10 ± 7,20 <sup>de,A</sup>	12,89 ± 5,45 <sup>a,A</sup>
Dan 7	44,49 ± 5,50 <sup>cd,B</sup>	55,18 ± 7,78 <sup>ef,B</sup>	31,92 ± 6,41 <sup>b,B</sup>	39,25 ± 5,90 <sup>bc,A</sup>	59,04 ± 5,63 <sup>f,C</sup>	48,26 ± 6,10 <sup>de,A</sup>	16,79 ± 5,00 <sup>a,A</sup>
Dan 14	17,53 ± 7,05 <sup>a,A</sup>	47,73 ± 5,84 <sup>c,A</sup>	50,09 ± 5,27 <sup>cd,A</sup>	29,60 ± 5,38 <sup>b,B</sup>	43,35 ± 5,19 <sup>c,B</sup>	56,12 ± 5,59 <sup>d,B</sup>	26,83 ± 5,58 <sup>b,B</sup>
<b>Indeks žute boje (YI)</b>							
Dan 0	19,15 ± 8,82 <sup>ab,A</sup>	40,65 ± 3,10 <sup>d,A</sup>	39,64 ± 9,21 <sup>d,B</sup>	32,38 ± 5,65 <sup>cd,AB</sup>	24,71 ± 9,02 <sup>bc,A</sup>	38,41 ± 5,67 <sup>d,A</sup>	13,56 ± 5,67 <sup>a,A</sup>
Dan 7	41,82 ± 4,17 <sup>cd,B</sup>	50,12 ± 5,72 <sup>ef,B</sup>	31,67 ± 5,70 <sup>b,A</sup>	37,44 ± 4,68 <sup>bc,A</sup>	51,86 ± 4,11 <sup>f,C</sup>	44,56 ± 4,72 <sup>de,B</sup>	17,87 ± 4,82 <sup>a,A</sup>
Dan 14	18,91 ± 7,17 <sup>a,A</sup>	46,12 ± 4,41 <sup>cd,B</sup>	47,54 ± 4,46 <sup>cd,C</sup>	29,75 ± 4,79 <sup>b,B</sup>	41,34 ± 3,96 <sup>c,B</sup>	51,25 ± 4,86 <sup>d,C</sup>	29,02 ± 5,35 <sup>b,B</sup>
<b>Indeks bele boje (WI)</b>							
Dan 0	49,11 ± 9,41 <sup>a,A</sup>	49,10 ± 3,55 <sup>a,A</sup>	51,67 ± 9,23 <sup>ab,A</sup>	62,50 ± 4,55 <sup>c,A</sup>	60,21 ± 8,50 <sup>bc,A</sup>	50,64 ± 3,79 <sup>a,A</sup>	78,98 ± 5,67 <sup>d,A</sup>
Dan 7	56,29 ± 4,53 <sup>b,A</sup>	53,03 ± 3,28 <sup>ab,B</sup>	64,90 ± 4,13 <sup>c,B</sup>	62,26 ± 3,21 <sup>c,A</sup>	50,35 ± 3,10 <sup>a,B</sup>	53,83 ± 3,92 <sup>ab,AB</sup>	78,31 ± 3,75 <sup>d,AB</sup>

Dan 14	71,29 ± 5,68 <sup>b,B</sup>	57,92 ± 2,75 <sup>a,C</sup>	57,74 ± 1,77 <sup>a,A</sup>	70,41 ± 2,46 <sup>b,B</sup>	58,23 ± 2,57 <sup>a,A</sup>	55,19 ± 2,74 <sup>a,B</sup>	73,61 ± 3,81 <sup>b,B</sup>
--------	--------------------------------	--------------------------------	--------------------------------	--------------------------------	--------------------------------	--------------------------------	--------------------------------

Srednje vrednosti deset ponavljanja ± standardna devijacija. Srednje vrednosti u istom redu sa različitim malim slovima i srednje vrednosti u istoj koloni sa različitim velikim slovima su značajno različite ( $p < 0,05$ ).

SBN – sojina ljuska; SFW – suncokretova ljuska; WS – pšenična slama

### 5.2.3. Rezultati analize boje gljiva

Promene boje plodonosnih tela tokom perioda skladištenja zavise od dužine skladištenja, rasta mikroorganizama, enzimske oksidacije i vrste gljive. Promena boje gljiva može biti različita, od smeđih do žutih nijansi (Ares i sar., 2006; Jolivet i sar., 1998). Prema Liu i sar. (2013), najvažniji faktori u enzimskom tamnjenju gljiva su prisutne fenolne komponente i gubitak integriteta membrane. Ovo je opravdano istim trendom rasta indeksa braon boje i curenja elektrolita tokom trajanja skladištenja, za razliku od opadanja parametra tvrdoće. Ukupna razlika u boji značajna je tokom perioda skladištenja samo za sledeće uzorke: 50P50S i 20P80S. Uzorak 50P50S pokazuje primetnu razliku od 14. dana skladištenja, dok poslednji uzorak, takođe sa najmanjim procentom komine grožđa u supstratnoj smeši, pokazuje razliku od 7. dana skladištenja. Parametar ukupne razlike u boji između uzoraka nije značajna, osim 14. dana skladištenja, gde uzorci 50P50S i 20P80S pokazuju razliku u odnosu na uzorke sa većim sadržajem komine grožđa (Tabela 8.). Kontrolni uzorak 100S pokazao je drastično više vrednosti indeksa braon žute boje za nulti dan skladištenja od drugih analiziranih uzoraka:  $16,18 \pm 1,75$ ;  $14,78 \pm 2,00$ , redom. Povećanje indeksa braon boje tokom vremena skladištenja primećeno je i u prethodnim istraživanjima promena boje za *A. bisporus*, kako je opaženo u studijama Djekic i sar. (2017) i Oz i sar. (2015).

Kada su u pitanju uzorci gajeni na otpadu od soje i suncokreta, ukupna razlika u boji uglavnom je opadala tokom skladištenja, što znači da se boja uzorka približava kontrolnom uzorku tokom njegovog veka trajanja. Najveći indeks razlike u boji primećen je kod uzoraka bez WS u smeši. Indeks braon boje pokazao je najviše vrednosti kod uzoraka koji sadrže SFW u supstratnoj smeši i uglavnom se povećavao tokom perioda skladištenja. Izuzetak su bili uzorci sa SBN, gde je tamnjenje smanjeno 14. dana. Indeks žute boje bio je povezan sa promenama u tamnjenju, dok je indeks bele boje bio najviši kod kontrolnog uzorka, zatim SBN:SFW:WS i SBN:WS. Razlika između vrednosti drugih uzoraka nije bila statistički značajna (Tabela 9.).

### 5.2.4. Propustljivost ćelijske membrane gljiva

Curenje elektrolita (EL) neprekidno se povećava tokom perioda skladištenja, s naglim promenama od sedmog dana (Tabela 10.). Najvišu vrednost na dan berbe ima uzorak 80P20S, s najvećim promenama vidljivim između 7. i 14. dana skladištenja. Ova promena je povezana s činjenicom da tkivo gljive gubi vitalnost tokom dužeg perioda skladištenja, što dovodi do oslabljenja integriteta ćelijske membrane. Ovaj trend može biti uzrok potamnjenja tkiva, kao i promene u teksturi (Zivanovic i sar., 2000). Kontrolni uzorak je pokazao vrednost EL od 21,1 za dan 0. Ista metoda korišćena je i od strane Djekic i sar. (2017) u istraživanju gljive *A. bisporus* pakovane u četiri različita MAP pakovanja (pakovanja sa modifikovanom atmosferom), s istim trendom uočenim tokom trajanja skladištenja.

Kada su u pitanju gljive gajene na smešama koje sadrže otpad soje i suncokreta (Tabela 11.), nakon 14 dana skladištenja primećeno je intenzivno curenje elektrolita za svaki uzorak, pri čemu je kontrolni uzorak pokazao najozbiljnija oštećenja. Ovi rezultati se slažu sa rezultatima parametara tvrdoće, koji su pokazali intenzivan pad 14. dana. Jasno curenje elektrolita prisutno je i u kontrolnom uzorku nakon sedam dana skladištenja, dok su ostali uzorci pokazali manja oštećenja tkiva nakon sedam dana u odnosu na nulti dan skladištenja. Slično biljkama, gljive lišene idealnih uslova za rast (npr. kombinacija ili količina hranljivih materija) rastu sporije, ali su otpornije. Materijali ispitivani u ovom radu imali su specifičnosti, poput lipida (koji nisu prisutni u standardnom supstratu od slame) i gušću strukturu. Sve to se može smatrati stresorima, tako da je struktura ćelija čvršća i otpornija na curenje elektrolita (Branco i sar., 2022). Stoga je curenje

elektrolita odloženo, kao i rast mikroorganizama, jer hranljive materije nisu lako dostupne. U skladu s tim, Heilmann i sar. (2013) zaključili su da površinski stres dovodi do konzerviranja zida ćelije *Candida albicans*, praćenog ojačavanjem zida hitinom, čime se ćelija štiti. U prvom delu istraživanja (Doroški i sar., 2021) primetna su veća oštećenja tkiva *P. ostreatus* pre početka perioda skladištenja (>20%), praćena većim oštećenjem tokom produženog vremena skladištenja. Iako je curenje elektrolita takođe bilo >20% na dan berbe, prethodno istraživanje Djekic i sar. (2017) ukazuje da se blaga oštećenja tkiva *A. bisporus* povećavaju od prvog do dvanaestog dana skladištenja, pri čemu oštećenje postaje ozbiljnije tokom vremena.

**Tabela 10.** Uticaj komine grožđa kao supstrata na curenje elektrolita iz tkiva plodonosnog tela gljive *P. ostreatus*

Uzorci	100P	80P20S	50P50S	20P80S
<b>Curenje elektrolita (%)</b>				
Dan 0	20,91	30,75	26,98	23,80
Dan 7	19,27	33,72	37,58	30,47
Dan 14	39,92	50,94	34,13	38,04

Legenda: 100P - 100% komina grožđa; 80P20S - 80% komina grožđa; 20% pšenična slama; 50P50S - 50% komina grožđa; 50% pšenična slama; 20P80S - 20% komina grožđa; 80% pšenična slama

Kontrolni uzorak 100S\* - Dan 0: EL 21,1

**Tabela 11.** Uticaj ljuske soje i suncokreta kao supstrata na curenje elektrolita iz tkiva plodonosnog tela gljive *P. ostreatus*

Uzorci	SBN	SBN : SFW	SFW	SBN : SFW : WS	SBN : WS	SFW : WS	WS*
<b>Curenje elektrolita (%)</b>							
Dan 0	17,48 ± 5,34 <sup>A</sup>	15,05 ± 1,07 <sup>A</sup>	18,24 ± 2,02 <sup>A</sup>	16,14 ± 0,85 <sup>A</sup>	16,83 ± 2,23 <sup>A</sup>	19,55 ± 0,24 <sup>B</sup>	18,04 ± 2,45 <sup>A</sup>
Dan 7	16,26 ± 1,79 <sup>a,A</sup>	15,97 ± 0,88 <sup>a,A</sup>	16,83 ± 2,29 <sup>a,A</sup>	15,22 ± 0,80 <sup>a,A</sup>	15,10 ± 0,51 <sup>a,A</sup>	16,53 ± 0,74 <sup>a,A</sup>	33,45 ± 4,37 <sup>b,A</sup>
Dan 14	27,31 ± 1,25 <sup>ab,B</sup>	35,79 ± 2,51 <sup>bc,B</sup>	28,12 ± 3,26 <sup>ab,B</sup>	23,26 ± 3,21 <sup>a,B</sup>	41,12 ± 2,18 <sup>bc,B</sup>	23,76 ± 0,70 <sup>a,C</sup>	53,14 ± 9,46 <sup>d,B</sup>

Srednje vrednosti u tri ponavljanja ± standardna devijacija. Srednje vrednosti u istoj koloni sa različitim malim slovima i srednje vrednosti u istom redu sa različitim velikim slovima su značajno različite ( $P < 0,05$ ). SBN – sojina ljuska; SFW – suncokretova ljuska; WS – pšenična slama

### 5.2.5. Rezultati mikrobiološke analize gljiva

Broj mikroorganizama na svežim plodonosnim telima *P. ostreatus* izražen je u log CFU g<sup>-1</sup> (Tabela 12.). Iako se primećuje značajna razlika kako u vezi sa vremenom skladištenja, tako i u vezi sa vrstom supstrata, nije primetna nikakva pravilnost. Interesantno je da su brojevi bakterija za većinu supstrata fluktuirali tokom vremena. Brojevi mikroorganizama za kontrolni uzorak, uključujući TCC, *Enterobacteriaceae*, PCC i YM, iznosili su 6,00 ± 0,96, 4,80 ± 0,11; 4,20 ± 0,42 i 5,80 ± 0,00 log CFU g<sup>-1</sup>, datim redom. *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp., *Clostridium* spp. i *Listeria* spp. nisu detektovani. Generalno, količina mikroorganizama prisutnih na površini plodonosnih tela uzoraka 100P i 80P20S, sa većim procentom komine grožđa u supstratu, značajno je veća nego u druga dva uzorka sa manjim sadržajem komine grožđa. Ovo može biti povezano sa procentom zadržavanja tečnosti u komini od grožđa, kao i sadržajem amino kiselina u gljivama (Mattila i sar., 2002) i/ili komini od grožđa kao supstratu, što predstavlja dobro okruženje za razvoj mikroorganizama. S druge strane, antioksidativna aktivnost sprečava rast patogenih bakterija (Sudha i sar., 2012; Zhu i sar., 2002), što objašnjava odsustvo patogena na površini plodonosnih tela. Slično istraživanje *A. bisporus* u aktivnom MAP (Oz i sar., 2015) uključivalo je ukupan broj



mezofilnih i psihrotrofnih bakterija; ono je pokazalo konstantan rast do 8. dana, sa postepenom stagnacijom do 16. dana, na šta je takođe uticao tretman MAP pakovanja.

Broj mikroorganizama TCC, *Enterobacteriaceae*, PCC i YM na površini svežih plodonosnih tela *P. ostreatus* gajenih na otpadu soje i suncokreta, izražen je u log CFU g<sup>-1</sup> i naveden je u Tabeli 13. Rezultati su predstavljeni u funkciji vremena skladištenja i vrste supstrata. Patogeni mikroorganizmi, tj. *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp., *Clostridium* spp. i *Listeria* spp., nisu detektovani, što ukazuje na validnost gljiva u smislu odsustva uobičajenih patogena.

U kontrolnom uzorku WS, broj mikroorganizama pokazuje isti trend tokom perioda skladištenja, sa najvišim TCC, PCC i YM vrednostima prvog dana. Smeše supstrata koje sadrže SFW i SBN imale su veći broj TCC i *Enterobacteriaceae*. Nasuprot tome, smeše koje sadrže WS imale su najviše vrednosti PCC i YM, što je razumljivo s obzirom na rezultate kontrole i sastav supstrata.

Što se tiče promene ukupnih vrednosti tokom skladištenja, brojevi mikroorganizama su opadali u prvih sedam dana, a zatim se povećavali do 14. dana za skoro sve uzorke. Akumulacija tečnosti u pakovanjima i dostupnost hranljivih materija iz gljiva pružaju dobro okruženje za razvoj mikroorganizama, što rezultira blagim povećanjem broja mikroorganizama 14. dana skladištenja (Mattila i sar., 2002).

U poređenju sa prvim delom eksperimenta, tj. uzorcima gajenim na komini grožđa (Doroški i sar., 2021), sve vrednosti bile su drastično niže. Razlog tome mogu biti opšti uslovi tokom inicijacije primordijuma i samog plodonošenja. Dok se prvi deo eksperimenta odvijao na temperaturi skladištenja između 20 i 25 °C, što je podsticalo rast mikroorganizama, eksperimentalni set-up u ovom istraživanju uključivao je temperaturni opseg od 10-12 °C, što je smanjilo stopu rasta svih grupa osim psihrotrofa. Drugi razlog za razliku u stopi rasta može biti sastav supstrata. Naime, komina grožđa je supstrat bogat šećerom (Doroški i sar., 2021), što je sigurno povoljniji izvor nutrijenata za mikroorganizme od otpadnih supstrata iz industrije SEO-a koji su korišćeni u ovom delu istraživanja.

**Tabela 12.** Uticaj komine grožđa kao supstrata na mikrobiološke karakteristike plodonosnog tela *P. ostreatus*

Uzorak	100P	80P20S	50P50S	20P80S
<b>Ukupan broj mikroorganizama (log CFU g<sup>-1</sup>)</b>				
Dan 0	6,70 ± 0,27 <sup>b, B</sup>	7,00 ± 0,19 <sup>a, B</sup>	4,60 ± 0,84 <sup>a, A</sup>	6,10 ± 0,36 <sup>ab, B</sup>
Dan 7	5,90 ± 0,13 <sup>a, B</sup>	6,70 ± 0,32 <sup>ab, C</sup>	6,10 ± 0,09 <sup>b, BC</sup>	4,90 ± 0,52 <sup>a, A</sup>
Dan 14	6,80 ± 0,30 <sup>b</sup>	6,00 ± 0,56 <sup>b</sup>	6,00 ± 0,65 <sup>b</sup>	6,60 ± 1,00 <sup>b</sup>
<b><i>Enterobacteriaceae</i> (log CFU g<sup>-1</sup>)</b>				
Dan 0	5,90 ± 0,30 <sup>ab, B</sup>	6,10 ± 0,61 <sup>a, B</sup>	2,10 ± 2,50 <sup>A</sup>	4,80 ± 0,04 <sup>a, AB</sup>
Dan 7	4,70 ± 1,00 <sup>a, B</sup>	3,50 ± 0,38 <sup>b, A</sup>	5,20 ± 0,16 <sup>B</sup>	3,50 ± 0,23 <sup>b, A</sup>
Dan 14	6,40 ± 0,10 <sup>b, B</sup>	4,10 ± 0,27 <sup>b, AB</sup>	1,90 ± 2,20 <sup>A</sup>	3,80 ± 0,27 <sup>b, A</sup>
<b>Psihrotrofni mikroorganizmi (log CFU g<sup>-1</sup>)</b>				
Dan 0	6,00 ± 0,06 <sup>B</sup>	5,70 ± 0,09 <sup>a, B</sup>	3,80 ± 0,19 <sup>a, A</sup>	5,60 ± 0,09 <sup>a, B</sup>
Dan 7	5,70 ± 0,08 <sup>A</sup>	4,20 ± 0,09 <sup>c, B</sup>	5,20 ± 0,11 <sup>b, A</sup>	3,50 ± 0,21 <sup>c, C</sup>
Dan 14	5,80 ± 0,05 <sup>A</sup>	4,60 ± 0,05 <sup>b, C</sup>	4,70 ± 0,01 <sup>b, C</sup>	5,00 ± 0,11 <sup>b, B</sup>
<b>Kvasci i plesni (log CFU g<sup>-1</sup>)</b>				
Dan 0	6,10 ± 0,16 <sup>b, A</sup>	6,10 ± 0,18 <sup>a, A</sup>	4,60 ± 0,86 <sup>B</sup>	4,10 ± 0,41 <sup>ab, B</sup>
Dan 7	5,60 ± 0,14 <sup>a, A</sup>	4,80 ± 0,41 <sup>b, B</sup>	5,00 ± 0,20 <sup>B</sup>	3,60 ± 0,14 <sup>a, C</sup>
Dan 14	6,20 ± 0,17 <sup>b</sup>	5,30 ± 0,15 <sup>b</sup>	5,40 ± 0,21 <sup>a</sup>	5,50 ± 1,20 <sup>b</sup>

Srednje vrednosti tri ponavljanja  $\pm$  standardna devijacija. Srednje vrednosti u istoj koloni sa različitim malim slovima i srednje vrednosti u istom redu sa različitim velikim slovima su značajno različite ( $p < 0,05$ ). Legenda: 100P - 100% komina grožđa; 80P20S - 80% komina grožđa; 20% pšenična slama; 50P50S - 50% komina grožđa; 50% pšenična slama; 20P80S - 20% komina grožđa; 80% pšenična slama

Kontrolni uzorak 100S\* - Dan 0: TCC  $6,00 \pm 0,96$ , *Enterobacteriaceae*  $4,80 \pm 0,11$ , PCC  $4,20 \pm 0,42$  i YM  $5,80 \pm 0,00$  log CFU g<sup>-1</sup>

**Tabela 13.** Uticaj ljuske soje i suncokreta kao supstrata na mikrobiološke karakteristike plodonosnog tela *P. ostreatus*

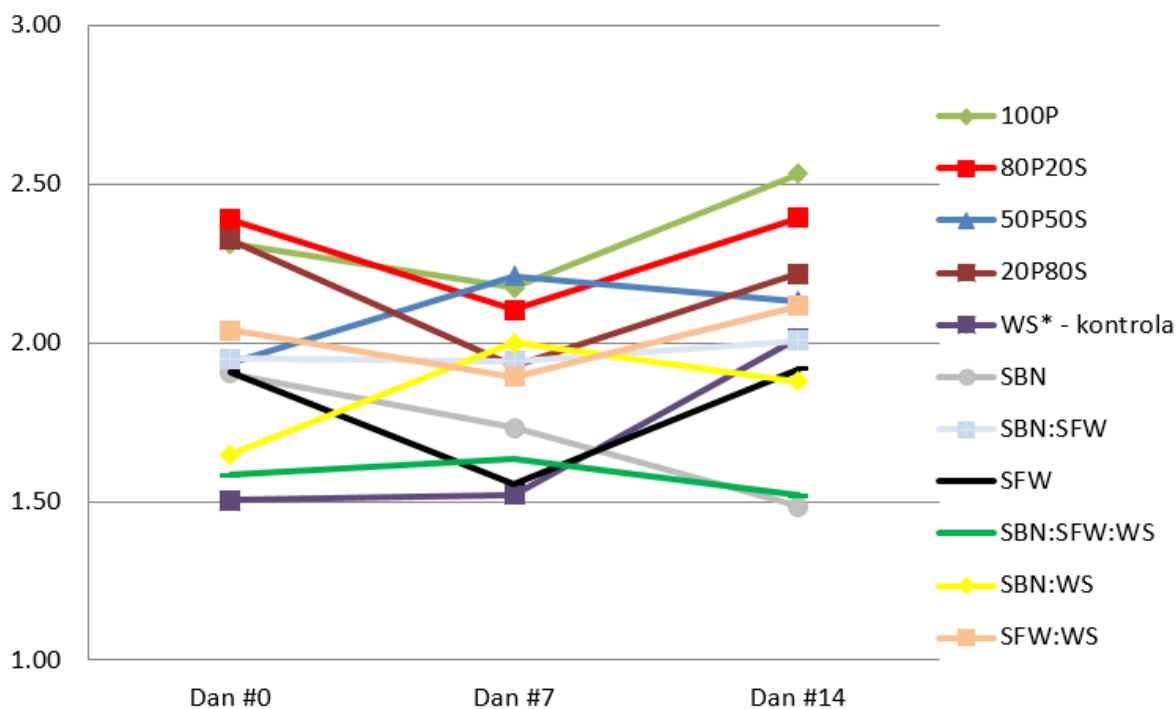
Uzorci	SBN	SBN : SFW	SFW	SBN : SFW : WS	SBN : WS	SFW : WS	WS
<b>Ukupan broj mikroorganizama (log CFU g<sup>-1</sup>)</b>							
Dan 0	3,61 $\pm$ 0,18 <sup>a</sup>	3,68 $\pm$ 0,05 <sup>ab,A</sup>	3,87 $\pm$ 0,21 <sup>abc,A</sup>	3,55 $\pm$ 0,15 <sup>a,A</sup>	3,85 $\pm$ 0,09 <sup>abc,A</sup>	3,98 $\pm$ 0,01 <sup>bc</sup>	4,07 $\pm$ 0,02 <sup>c,A</sup>
Dan 7	3,42 $\pm$ 0,22 <sup>ab</sup>	3,13 $\pm$ 0,17 <sup>a,B</sup>	3,57 $\pm$ 0,09 <sup>bc,AB</sup>	3,62 $\pm$ 0,02 <sup>bc,A</sup>	3,27 $\pm$ 0,23 <sup>ab,B</sup>	3,96 $\pm$ 0,06 <sup>c</sup>	3,86 $\pm$ 0,09 <sup>c,B</sup>
Dan 14	3,31 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	3,62 $\pm$ 0,27 <sup>ab,A</sup>	3,38 $\pm$ 0,15 <sup>a,B</sup>	3,97 $\pm$ 0,03 <sup>c,B</sup>	3,57 $\pm$ 0,02 <sup>a,AB</sup>	3,94 $\pm$ 0,01 <sup>bc</sup>	4,07 $\pm$ 0,08 <sup>c,A</sup>
<b>Enterobacteriaceae (log CFU g<sup>-1</sup>)</b>							
Dan 0	1,77 $\pm$ 0,07 <sup>b,A</sup>	1,74 $\pm$ 0,04 <sup>b,A</sup>	1,42 $\pm$ 0,42 <sup>b,A</sup>	0,00 $\pm$ 0,00 <sup>a,A</sup>	1,77 $\pm$ 0,07 <sup>b,A</sup>	1,48 $\pm$ 0,00 <sup>b,A</sup>	0,85 $\pm$ 0,85 <sup>ab</sup>
Dan 7	0,00 $\pm$ 0,00 <sup>a,B</sup>	0,65 $\pm$ 0,65 <sup>ab,AB</sup>	0,00 $\pm$ 0,00 <sup>a,B</sup>	0,50 $\pm$ 0,50 <sup>a,A</sup>	1,54 $\pm$ 0,06 <sup>bc,B</sup>	0,00 $\pm$ 0,00 <sup>a,C</sup>	1,74 $\pm$ 0,26 <sup>c</sup>
Dan 14	0,00 $\pm$ 0,00 <sup>a,B</sup>	0,50 $\pm$ 0,50 <sup>ab,B</sup>	1,00 $\pm$ 0,00 <sup>bc,A</sup>	1,39 $\pm$ 0,09 <sup>c,B</sup>	0,00 $\pm$ 0,00 <sup>a,C</sup>	1,15 $\pm$ 0,15 <sup>bc,B</sup>	0,65 $\pm$ 0,65 <sup>abc</sup>
<b>Psihrotrofni mikroorganizmi (log CFU g<sup>-1</sup>)</b>							
Dan 0	2,59 $\pm$ 0,11 <sup>a,A</sup>	3,18 $\pm$ 0,00 <sup>b,A</sup>	3,07 $\pm$ 0,07 <sup>b,B</sup>	2,54 $\pm$ 0,24 <sup>a,A</sup>	3,73 $\pm$ 0,01 <sup>c,A</sup>	3,87 $\pm$ 0,02 <sup>cd,A</sup>	4,08 $\pm$ 0,00 <sup>d,A</sup>
Dan 7	2,45 $\pm$ 0,15 <sup>b,A</sup>	2,15 $\pm$ 0,15 <sup>a,B</sup>	2,60 $\pm$ 0,00 <sup>b,A</sup>	2,97 $\pm$ 0,07 <sup>cd,B</sup>	2,95 $\pm$ 0,05 <sup>c,B</sup>	3,21 $\pm$ 0,06 <sup>d,B</sup>	2,87 $\pm$ 0,02 <sup>c,C</sup>
Dan 14	3,16 $\pm$ 0,04 <sup>b,B</sup>	3,20 $\pm$ 0,25 <sup>b,A</sup>	3,20 $\pm$ 0,02 <sup>b,C</sup>	2,65 $\pm$ 0,05 <sup>a,AB</sup>	3,18 $\pm$ 0,28 <sup>b,B</sup>	2,96 $\pm$ 0,11 <sup>ab,C</sup>	3,28 $\pm$ 0,08 <sup>b,B</sup>
<b>Kvasci i plesni (log CFU g<sup>-1</sup>)</b>							
Dan 0	2,83 $\pm$ 0,12 <sup>a</sup>	2,87 $\pm$ 0,02 <sup>a,A</sup>	2,92 $\pm$ 0,22 <sup>a,B</sup>	2,91 $\pm$ 0,43 <sup>a</sup>	3,34 $\pm$ 0,14 <sup>ab,A</sup>	3,27 $\pm$ 0,09 <sup>ab,A</sup>	3,58 $\pm$ 0,00 <sup>b,B</sup>
Dan 7	2,71 $\pm$ 0,23 <sup>b</sup>	2,15 $\pm$ 0,15 <sup>a,B</sup>	2,54 $\pm$ 0,06 <sup>b,A</sup>	2,65 $\pm$ 0,05 <sup>b</sup>	2,59 $\pm$ 0,11 <sup>b,B</sup>	3,15 $\pm$ 0,15 <sup>c,A</sup>	3,11 $\pm$ 0,03 <sup>c,A</sup>
Dan 14	2,50 $\pm$ 0,20 <sup>a</sup>	3,02 $\pm$ 0,17 <sup>bc,A</sup>	3,34 $\pm$ 0,04 <sup>de,C</sup>	3,19 $\pm$ 0,01 <sup>cd</sup>	2,81 $\pm$ 0,03 <sup>b,B</sup>	3,55 $\pm$ 0,03 <sup>ef,B</sup>	3,76 $\pm$ 0,03 <sup>f,C</sup>

Srednje vrednosti u tri ponavljanja  $\pm$  standardna devijacija. Srednje vrednosti u istoj koloni sa različitim malim slovima i srednje vrednosti u istom redu sa različitim velikim slovima su značajno različite ( $P < 0,05$ ). SBN – sojina ljuska; SFW – suncokretova ljuska; WS – pšenična slama

### 5.2.6. TQI indeks – pokazatelj ukupnog kvaliteta gljive *P. ostreatus*

Slika 7. prikazuje indeks ukupnog kvaliteta (TQI) 11 kvalitativnih parametara za 11 uzoraka svežih plodonosnih tela *P. ostreatus*. Kao kontrola prikazan je uzorak iz drugog eksperimentalnog dela, WS. Najbolji rezultat za nulti dan skladištenja pokazali su uzorci gajeni na mešavinama koje sadrže sojinu ljusku: SBN:SFW:WS, SBN:WS i SBN, osim kontrolnog uzorka WS koji je ostvario najbolji rezultat 0. i 7. dana skladištenja. Najlošiji kvalitet je primećen kod uzoraka gajenih na mešavini koja sadrži kominu grožđa, sledećim redom: 80P20S, 20P80S i 100P. Od uzoraka gajenih na supstratu koji sadrži kominu grožđa, najbolji kvalitet poseduje uzorak 50P50S za dan 0., približan rezultatu uzorka SBN, ali njegov kvalitet drastično opada do 7. dana skladištenja. 7. dana skladištenja kontrolni uzorak prati uzorak SFW u ukupnom kvalitetu, a zatim SBN:SFW:WS i SBN. Uzorak gajen na ljusci soje ostvaruje najbolji rezultat 14. dana skladištenja, praćen uzorkom SBN:SFW:WS, koji na osnovu celokupnog rezultata predstavlja uzorak koji tokom skladištenja od

14 dana sveukupno održava svoje kvalitativne karakteristike. Kontrolni uzorak 14. dana skladištenja gubi na kvalitetu, ali ne drastično. Kvalitet uzorka SBN povećava se tokom vremena skladištenja, sa najboljim kvalitetom 14. dana. Na osnovu slike 7. može se zaključiti da u ukupnom kvalitetu prednjače kontrolni uzorak u prvih 7 dana skladištenja, zatim SBN:SFW:WS u toku celokupnog skladištenja od 14 dana.

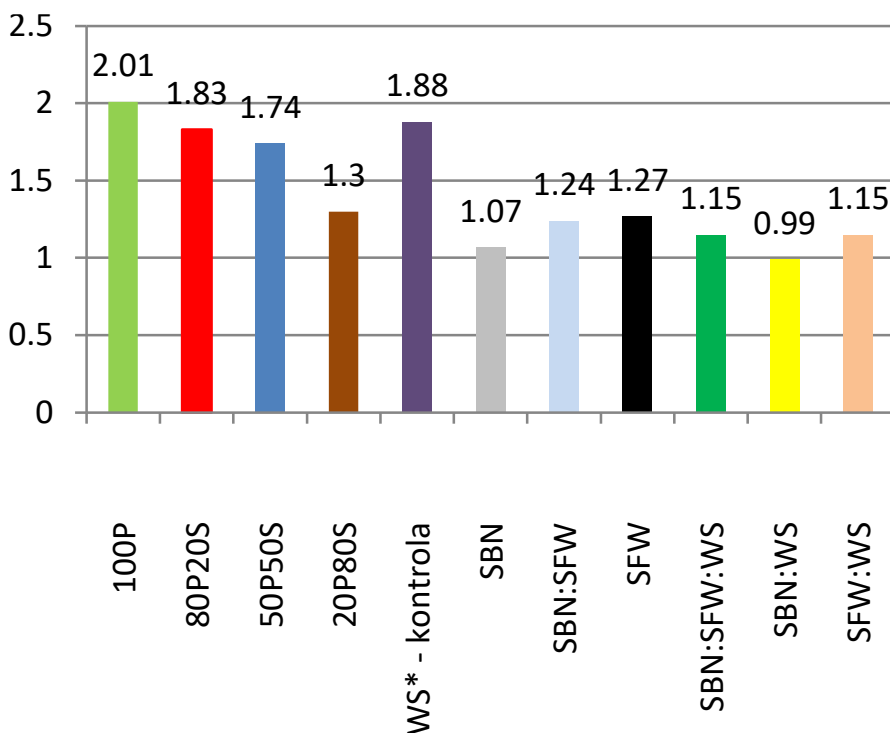


**Slika 7.** TQI indeks – indeks ukupnog kvaliteta kvalitativnih parametara svežih plodonosnih tela *P.ostreatus*, koji obuhvata sledeće: analiza profila teksture (tvrdoća, kohezivnost i elastičnost), karakteristike boje (ukupna razlika boje, indeks braon boje i indeks žute boje), curenje elektrolita i mikrobiološke karakteristike (ukupan broj mikroorganizama, *Enterobacteriaceae*, psihrotrofni mikroorganizmi, ukupan broj kvasaca i plesni). Legenda: 100P - 100% komina grožđa; 80P20S - 80% komina grožđa: 20% pšenična slama; 50P50S - 50% komina grožđa: 50% pšenična slama; 20P80S - 20% komina grožđa: 80% pšenična slama SBN – sojina ljuska; SFW – suncokretova ljuska; WS – pšenična slama

Slika 8. prikazuje indeks ukupnog kvaliteta (TQI) 6 parametara produktivnosti 11 supstrata na kojima je gajena gljiva *P.ostreatus*. Najbolji ukupan kvalitet produktivnosti poseduje uzorak SBN:WS, praćen uzorcima SBN, SBN:SFW:WS i SFW:WS, datim redosledom. Najlošiji rezultat pokazao je supstrat 100P, praćen kontrolnim uzorkom WS. Najbolji rezultat od supstrata koji sadrže kominu grožđa poseduje uzorak 20P80S, približan mešavini SBN:SFW.

Na osnovu slike 7. i 8., uzorci koji prednjače u ukupnom kvalitetu jesu SBN:SFW:WS, SBN i SBN:WS. Na osnovu ovih rezultata, može se zaključiti da je ljuska soje najbolji alternativni supstrat za proizvodnju bukovače, a prema parametrima produktivnosti, čak i bolji od kontrolnog uzorka WS.

Ipak, na osnovu hemijske karakterizacije, koja nije obilježena indeksom ukupnog kvaliteta, uzorci gajeni na supstratu sa većim sadržajem komine grožđa pokazuju odličan antioksidativni potencijal i nutritivnu vrednost (Doroški i sar., 2021b). Uopšte, ovaj model predstavlja jednostavan i precizan alat koji odražava ukupan kvalitet proizvoda. Jedinstvena TQI kalkulacija može biti omogućena za širok spektar pojedinačnih karakteristika kvaliteta povezanih sa lancem hrane tokom njenog roka trajanja (Djekic i sar., 2018; Djekic i sar., 2017).



**Slika 8.** TQI indeks – indeks ukupnog kvaliteta parametara produktivnosti supstrata na kojima je gajena gljiva *P. ostreatus*, koji obuhvata sledeće: brzina rasta micelijuma u džakovima sa supstratom (mm/dan), vreme završetka rasta micelijuma (dani), vreme potrebno za formiranje primordiuma (dani), vreme potrebno za sazrevanje plodonosnih tela (dani), ukupan prinos gljiva (g) i biološka efikasnost supstrata (BE). Legenda: 100P - 100% komina grožđa; 80P20S - 80% komina grožđa; 20% pšenična slama; 50P50S - 50% komina grožđa; 50% pšenična slama; 20P80S - 20% komina grožđa; 80% pšenična slama SBN – sojina ljuska; SFW – suncokretova ljuska; WS – pšenična slama

### 5.3. Rezultati analiza sirovih vodenih ekstrakata gljive *P. ostreatus*

#### 5.3.1. Hemijski sastav sirovih vodenih ekstrakata: ukupni polifenoli, polisaharidi i proteini

Eliminacija vode iz uzoraka sušenjem na vazduhu na 55°C do postizanja konstantne mase ima za cilj eliminaciju mogućnosti mikrobne kontaminacije, čime se osigurava očuvanje uzoraka za daljnju analizu. Uticaj temperature sušenja na sadržaj fenola i antioksidativna svojstva u semenkama kinoe proučavali su Miranda i sar. (2010), pri čemu su rezultati pokazali da povećanje temperature od 60 do 80°C smanjuje ukupan sadržaj fenola, a sa njime se detektuju i niže vrednosti IC<sub>50</sub> u DPPH testu antioksidativnosti. Međutim, trajanje procesa sušenja na vazduhu nije navedeno. Sudha i sar. (2012) su u prethodnom radu koristili metodu sušenja plodonosnih tela *Pleurotus eous* na 60°C do postizanja konstantne mase za dalju analizu. Ummat i sar. (2020) su naveli da hladne tehnike ekstrakcije, koje podrazumevaju tretmane relativno niskim temperaturama, imaju minimalan uticaj na stabilnost fenolnih jedinjenja, dok vreme ekstrakcije utiče na ukupan sadržaj fenola.

Hemijski sastav vodenih ekstrakata *P. ostreatus*, prikazan u Tabeli 14., pokazuje izvesne razlike između uzoraka. Uzorak 100P pokazuje najviše vrednosti fenolnih jedinjenja i proteina, a ujedno i najmanju količinu polisaharida, što se može pripisati supstratu koji se koristi za kultivaciju (Gąsecka i sar., 2016). Naime, bogatstvo komine grožđa polifenolnim jedinjenjima svakako utiče i na nivo polifenola koji je detektovan u uzorcima gljiva. Preostala tri uzorka ne pokazuju značajne statističke razlike između tri hemijska parametra.

Prethodni podaci ukazuju na značajnu prisutnost polisaharida, tačnije ugljenih hidrata, kao glavnog nutrijenta u gljivama, uključujući glukane, šećerne alkohole, hitin, glikogen i mono- i disaharide. Gljive su takođe odličan izvor proteina, pa sadrže i sve esencijalne aminokiseline. U poređenju sa povrćem, gljive poput *P. ostreatus* sadrže veće količine aminokiselina treonina, tirozina i arginina

(Kurtzman, 1997; Mattila i sar., 2002). Gąsecka i sar. (2016) su izvestili o  $9,64 \pm 0,33$  mg g<sup>-1</sup> polifenola u ekstraktu *P. ostreatus*, što je značajno manje u odnosu na količinu polifenola u uzorku 100P. Drugi objavljeni podaci ukazuju na količine polifenola u gljivi *P. ostreatus* u rasponu od 2 do 37 mg g<sup>-1</sup> ekstrakta (Babu i sar., 2014; Fontes Vieira i sar., 2013; Puttaraju i sar., 2006; Sudha i sar., 2012). Fenolne komponente su povezane sa antioksidativnim aktivnostima, prema Chang i sar. (2001), zbog izraženih redoks svojstava, delujući prvenstveno kao donori vodonika i supresori singletnog kiseonika (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>).

Razlika između ukupnih ekstrahovanih proteina i ukupnih proteina posledica je primenjenih metoda. Ukupni ekstrahovani proteini dobijeni su metodom po Bradford-u i uključuju količinu proteina ekstrahovanu u vrućoj vodi, čime postaju rastvorljivi u vodi (Bradford, 1976). Kontrolni uzorci pokazuju vrednosti za fenolna jedinjenja, proteine i polisaharide od  $19,40 \pm 1,07$  mg g<sup>-1</sup> GAE,  $7,12 \pm 1,49$  mg g<sup>-1</sup> BSA i  $214,93 \pm 52,03$  mg g<sup>-1</sup> GLU, datim redom.

Uzorci iz sledećih smeša supstrata (dan 0 skladištenja) imali su najviši ukupni sadržaj polisaharida: SBN:SFW: WS i SBN:SFW, zatim SFW:WS (Slika 10.). Prema studiji (Kalač, 2013), najzastupljeniji šećeri u gljivama uključuju saharozu, rafinozu, glukozu, fruktozu i ksilozu, uz dodatak manitola i trehaloze, zatim hitina kao strukturalnog polisaharida, glikogena, razgranatog polisaharida, glukana, manana i pektinskih supstanci. Baeva i sar. (2019) takođe ističu monogalakatan, poznat kao uobičajeni polisaharid u bukovači. S obzirom na to da su rezultati pokazali drastičan pad količine polisaharida tokom skladištenja, Li i sar. (2014) objasnili su isti trend u svom istraživanju potrošnjom šećera uzrokovanom disanjem gljiva tokom hladnog skladištenja.

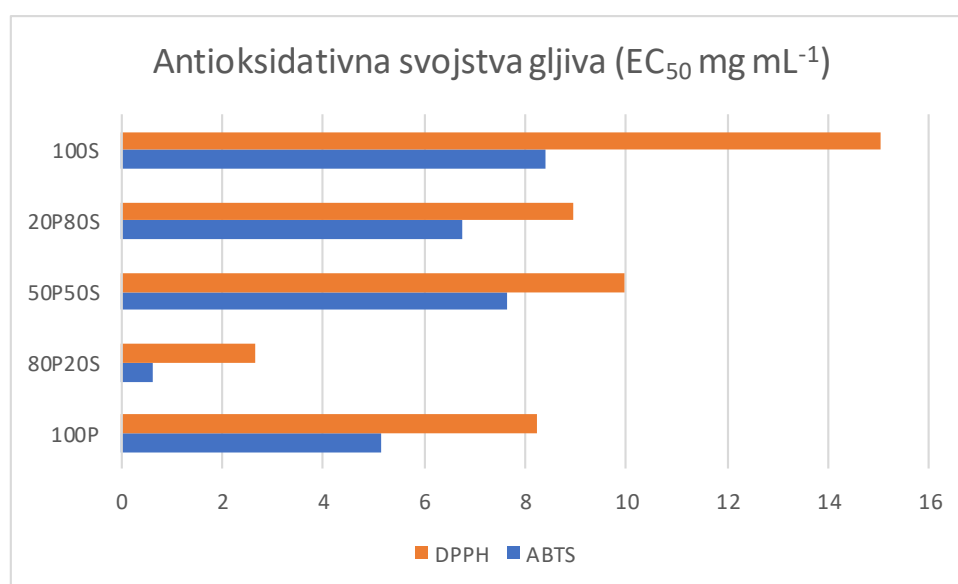
Fernandes i sar. (2013) takođe su opisali uticaj niske temperature skladištenja na smanjenje bioaktivnih jedinjenja poput masti, ukupnih šećera, tokoferola, kao i fenolnih jedinjenja. Do sedmog dana skladištenja, ukupan sadržaj polifenola povećao se u ovom istraživanju, što može biti povezano sa povećanjem sadržaja CO<sub>2</sub> u vakuum kesama tokom prvih sedam dana izazvanog metabolizmom fakultativno anaerobnih bakterija (Adams i sar., 2015; Doulgeraki i sar., 2012; Karowe i Grubb, 2011). Dalje smanjenje može takođe biti izazvano enzimskom oksidacijom fenolnih jedinjenja polifenol oksidazom (Liu i sar., 2010). Za razliku od rezultata ovog istraživanja, prvi deo istraživanja (Doroški i sar., 2021) svedoči o povećanju ukupnog sadržaja polifenola tokom 14 dana skladištenja, što se objašnjava formiranjem odbrambenih mehanizama kao reakcija na stresno okruženje (Gao i sar., 2014). Bukovača gajena na komini grožđa pokazala je gotovo deset puta veći sadržaj polifenola u poređenju sa onim gajenim na otpadu soje i suncokreta, potvrđujući pretpostavku da može postojati veza između hemijskog sastava gljiva i porekla supstrata (Gąsecka i sar., 2016). U prvom delu istraživanja uzorak sa najvećim sadržajem polisaharida takođe je imao skoro najmanji sadržaj polifenola (Doroški i sar., 2021b). Promena indeksa braon boje tokom vremena obično se podudara sa sadržajem polifenola, potvrđujući teoriju uzroka potamnjenja (Liu i sar., 2013). Što se tiče Folin-Ciocalteu reakcione metode, Everette i sar. (2010) ukazuju na to da su svi testirani fenoli, proteini i tioli reaktivni prema ovom reagensu, postavljajući pitanje koji tip jedinjenja reaguje sa reagensom u kompleksnim uzorcima hrane poput gljiva.

Ukupan sadržaj proteina bio je najviši za gljive gajene na SBN supstratu među svim supstratnim smešama. Sadržaj proteina zavisi od hemijskog sastava supstrata, kao i od C/N odnosa (Kumla i sar., 2020). U ovom slučaju, visok ukupan sadržaj proteina u SBN može biti povezan sa sojom, koja je poznata kao namirnica bogata proteinima (Qin i sar., 2022). Sedmog dana skladištenja, kontrolni uzorak WS imao je drastično više nivoe proteina u poređenju s drugim uzorcima. Uzorci gajeni na komini grožđa su pokazali značajno niže vrednosti za proteine, nasuprot sadržaju polifenola (Doroški i sar., 2021b). Još neki objavljeni podaci o ukupnom sadržaju polifenola u *P. ostreatus* kreću se od  $4,87$  mg g<sup>-1</sup> (Lam i Okello, 2015) do  $9,64$  mg g<sup>-1</sup> (Gąsecka i sar., 2016), dok se sadržaj proteina kreće od 17 do 42 g na 100 g osušenog plodonosnog tela (Deepalakshmi i sar., 2014).

**Tabela 14.** Ukupna količina fenolnih jedinjenja, ekstrahovanih proteina i polisaharida u vodenim ekstraktima *P. ostreatus* gajenih na komini grožđa

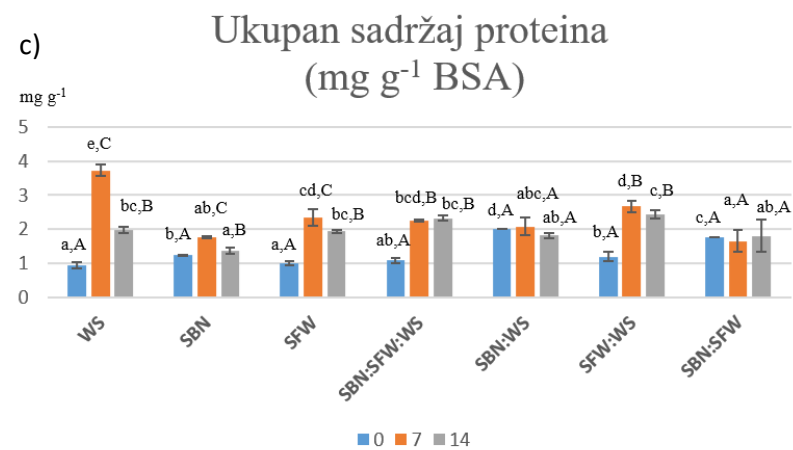
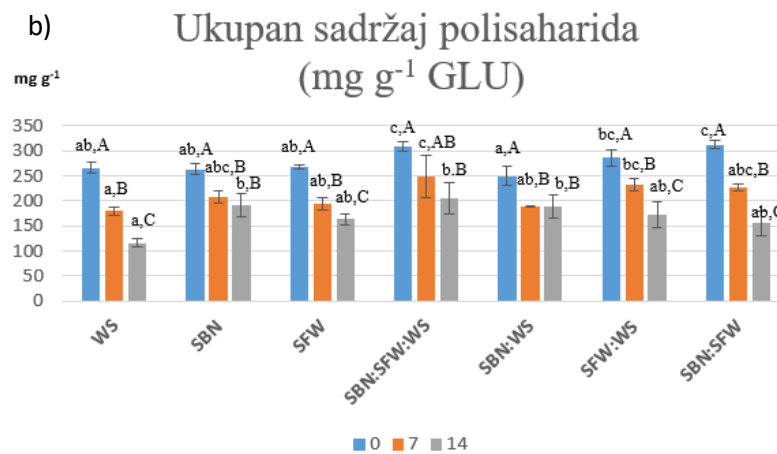
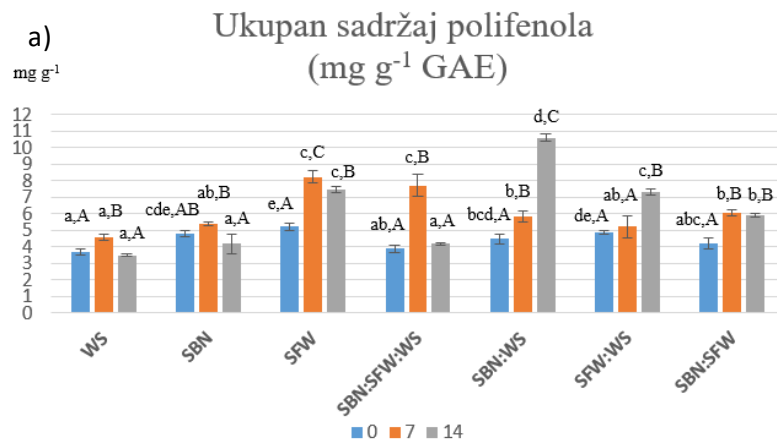
	100P	80P20S	50P50S	20P80S	100S
<b>TPC (mg/g GAE)</b>	24,24 ± 0,89 <sup>a</sup>	18,96 ± 0,28 <sup>b</sup>	20,65 ± 1,59 <sup>b</sup>	18,04 ± 0,78 <sup>b</sup>	19,40 ± 1,07 <sup>b</sup>
<b>TEP (mg/g BSA)</b>	2,82 ± 0,38 <sup>a</sup>	0,32 ± 0,0 <sup>c</sup>	0,52 ± 0,35 <sup>bc</sup>	1,58 ± 0,63 <sup>b</sup>	7,12 ± 1,49 <sup>d</sup>
<b>TPS (mg/g GLU)</b>	174,13 ± 19,74	245,02 ± 29,47	235,56 ± 53,59	224,85 ± 22,39	214,93 ± 52,03

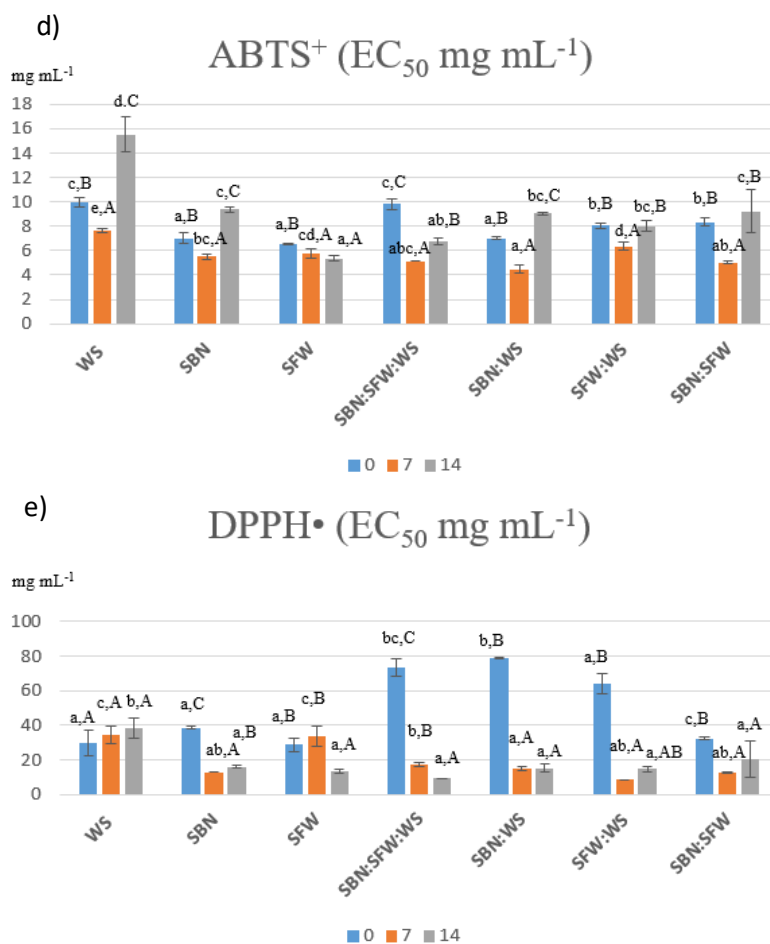
Srednje vrednosti u tri ponavljanja ± standardna devijacija. Srednje vrednosti u istom redu sa različitim malim su značajno različite ( $P < 0,05$ ). Legenda: 100P - 100% komina grožđa; 80P20S - 80% komina grožđa: 20% pšenična slama; 50P50S - 50% komina grožđa: 50% pšenična slama; 20P80S - 20% komina grožđa: 80% pšenična slama  
 TPC – Ukupna količina polifenola; TEP – ukupna količina proteina; TPS – ukupna količina polisaharida



**Slika 9.** Antioksidativna svojstva bukovače gajene na supstratnim mešavinama sa kominom grožđa: sposobnost neutralizacije ABTS i DPPH slobodnih radikala

Legenda: 100P - 100% komina grožđa; 80P20S - 80% komina grožđa: 20% pšenična slama; 50P50S - 50% komina grožđa: 50% pšenična slama; 20P80S - 20% komina grožđa: 80% pšenična slama





**Slika 10.** Hemijska analiza gljive *P. ostreatus* gajenih na ljusci soje i suncokreta: a) ukupan sadržaj polifenola; b) ukupan sadržaj polisaharida; c) ukupan sadržaj proteina; d) sposobnost neutralizacije ABTS slobodnih radikala; e) sposobnost neutralizacije DPPH slobodnih radikala.

Napomena: Srednje vrednosti u tri ponavljanja  $\pm$  standardna devijacija. Srednje vrednosti između iste grupe uzoraka (0, 7, 14) sa različitim velikim slovom i srednje vrednosti između različitih uzoraka sa različitim malim slovima su značajno različite ( $p < 0,05$ ). SBN – ljuska soje; SFW – ljuska suncokreta; WS – pšenična slama

### 5.3.2. Rezultati hemijske analize sirovih vodenih ekstrakata: određivanje antioksidativne aktivnosti – sposobnost neutralizacije ABTS i DPPH slobodnih radikala

Mehanizam prevencije mnogih hroničnih bolesti, koje u osnovi imaju mutagenezu, karcinogenezu, oštećenja DNK i rast patogenih bakterija, je vezan za neutralizaciju slobodnih radikala u biološkim sistemima (Zhu i sar., 2002). Antioksidativna svojstva gljiva direktno su povezana sa fenolnim jedinjenjima (Babu i sar., 2014; Puttaraju i sar., 2006; Sudha i sar., 2012).

Antioksidativna svojstva gljiva procenjena su upotrebom metoda sposobnosti neutralizacije ABTS i DPPH slobodnih radikala, sa EC<sub>50</sub> vrednostima (mg mL<sup>-1</sup>) koje su predstavljale pokazatelj aktivnosti. U opsegu koncentracije od 0,625–40 mg mL<sup>-1</sup>, EC<sub>50</sub> vrednosti za sposobnost hvatanja DPPH• za ekstrakte 100S, 100P, 80P20S, 50P50S i 20P80S bile su 15,04, 8,22, 2,63, 9,98 i 8,96 mg mL<sup>-1</sup>, redom (Slika 9.). Pozitivne kontrole katehin i Trolox pokazale su EC<sub>50</sub> < 0,03125 mg mL<sup>-1</sup>. Sa druge strane, EC<sub>50</sub> vrednosti za sposobnost hvatanja ABTS<sup>+</sup> za ekstrakte u istom redosledu bile su 8,42, 5,16, <0,625, 7,66 i 6,77 mg mL<sup>-1</sup>. U ovom slučaju, pozitivne kontrole katehin i BHA imale su EC<sub>50</sub> < 0,03125 mg mL<sup>-1</sup>. Korelacija između ukupnog sadržaja polifenola i antioksidativne aktivnosti nije pronađena u ovom istraživanju, iako se najjača sposobnost hvatanja primećuje u uzorcima gajenim na supstratima sa većim udelom komine grožđa u odnosu na kontrolni uzorak. Isti trend primetili su Fontes Vieira i sar. (2013), što je objašnjeno stvaranjem kompleksa fenolnih



jedinjenja sa biodostupnim mineralima poput gvožđa, cinka i litijuma. Naime, u kompleksima, visoko antioksidativna fenolna jedinjenja imaju manju dostupnost slobodnim radikalima koji su prisutni u reakcionoj sredini, što vodi smanjenoj antioksidativnoj sposobnosti.

Na dan berbe, SFW je pokazao najbolju sposobnost hvatanja ABTS<sup>•+</sup> sa rezultatom od  $6,58 \pm 0,06$  mg mL<sup>-1</sup>. Svi uzorci, osim kontrole, pokazali su svoju 50% antioksidativnu sposobnost pri efikasnim koncentracijama < 10 mg mL<sup>-1</sup>, što je u skladu s prethodnim delom istraživanja (Doroški i sar., 2021b). Međutim, prethodni rezultati TPC pokazali su mnogo više vrednosti, sugerišući bolja antioksidativna svojstva. Svi rezultati pokazali su niže EC<sub>50</sub> vrednosti za dan 7., praćene ponovnim rastom nakon 14 dana skladištenja. Na rezultate sposobnosti neutralizacije ABTS<sup>•+</sup> utiču količina polifenola i proteina, a može dodatno uticati i različita zastupljenost bočnih grupa aminokiselina (Kim i sar., 2009), dok su Chun i sar. (2021) istakli i uticaj sadržaja polisaharida na njihova antioksidativna svojstva. Vrednosti EC<sub>50</sub> za DPPH<sup>•</sup> za dan 0. bile su iznad 20 mg mL<sup>-1</sup> u svim slučajevima, ali su vrednosti opale ispod 20 mg mL<sup>-1</sup> (povećanje aktivnosti) u gotovo svim uzorcima nakon 7 i 14 dana skladištenja (Slika 10. d) i e)). Izuzeci su SFW i kontrola. Za analizu heterogenih uzoraka moraju se koristiti najmanje dva testa sposobnosti neutralizacije jer svaki test uključuje različite aspekte antioksidansa ili sadrži različit hemijski mehanizam (Serpen i sar., 2012). Floegel i sar. (2011) su uporedili aktivnost u ABTS<sup>•+</sup> i DPPH<sup>•</sup> testovima kako bi odredili antioksidativnu sposobnost različitih namirnica. ABTS<sup>•+</sup> test se odnosi na hidrofилne i lipofilne antioksidativne sisteme, dok je DPPH<sup>•</sup> test pogodan za hidrofobne sisteme (Kim i sar., 2002). *P. ostreatus* predstavlja generalno niskomasnu hranu koja se sastoji uglavnom od nezasićenih masnih kiselina (Kalač, 2013). S obzirom da hemijski sastav gljiva uglavnom zavisi od sastava supstrata (Gašević i sar., 2016), gljive u ovom slučaju mogu potencijalno sadržati veće količine lipida dobijenih od ljuske zaostale iz proizvodnje industrijskog ulja (Qin i sar., 2022). Miris ekstrakata gljiva tokom pripreme za analizu takođe je ukazao na prisustvo masti, verovatno na površini šešira gljive. Frankel i Meyer (2000) su sugerisali da slobodne masne kiseline treba izbegavati u testovima antioksidativnosti jer formiraju micelle i ponašaju se drugačije od triacilglicerola. Zbog porekla supstrata, prisustvo masti je moguće, a određene varijacije mogu uzrokovati visoke vrednosti EC<sub>50</sub> za neutralizaciju DPPH<sup>•</sup> na početku skladištenja. Tokom hladnog skladištenja, kiseonik, čiji se sadržaj vremenom povećava u vakuumiranim uzorcima, može izmeniti strukturu lipida, dovodeći do njegove oksidacije (Al-Dalali i sar., 2022), dezintegracije i uklanjanja prepreke primeni DPPH<sup>•</sup>. Fernandes i sar. (2013) sugerisali su da uticaj niskih temperatura, poput zamrzavanja, može uticati na smanjenje sadržaja masti i snižavanje sadržaja mononezasićenih i zasićenih masnih kiselina, što pak može uticati na rezultate DPPH<sup>•</sup> testa.

### 5.3.3. Rezultati analize rizika: Citotoksični i genotoksični potencijal sirovih vodenih ekstrakata

Za analizu potencijalne citotoksičnosti odabrane su dve linije ćelija: normalni fetalni fibroblasti (MRC-5), na kojim bi rezultat ukazao na potencijalni citotoksični efekat na različita normalna tkiva, i kolorektalne kancerske ćelije (HCT 116), odabrane da posebno ukažu na potencijalni efekat na kancerske ćelije, a posebno na modelu gastrointestinalnog trakta. Rezultati iz Tabele 15. pokazuju blagi citotoksični efekat za sve testirane ekstrakte gljiva gajenih na mešavinama sa kominom grožđa i to na oba tipa ćelija. Kako bismo raspravljali o posmatranim rezultatima, trebalo bi imati na umu da je citotoksičnost nekih komponenata hrane, posebno bioaktivnih jedinjenja dobijenih iz aromatičnih biljaka kao što je *Nigella sativa*, prethodno detektovana (Mahmoud i Torchilin, 2013). Štaviše, hormetska teorija, koja objašnjava korisne efekte niskih doza različitih stresora i toksina, postavljena je u nauci o nutricionizmu (Hayes, 2007; Son i sar., 2008).

Dalje, upoređivanje rezultata dobijenih na normalnim i kancerskim ćelijama ukazalo je da je većina uzoraka izazvala veću citotoksičnost na kolorektalnim kancerskim ćelijama HCT 116, što se može videti na slici 11. Rezultati ukazuju na to da su uzorci gajeni na komini grožđa pokazali citotoksičnost za ćelije MRC-5 samo u najvećoj koncentraciji (40 mg mL<sup>-1</sup>), sa izuzetkom što se tiče uzorka 80P20S koji je pokazao citotoksičnost i pri nižim koncentracijama. Kada su u pitanju

ćelije HCT 116, samo najniže koncentracije uzoraka su necitotoksične za ćelije kancera. Prema pravilu da SI (indeks selektivnosti) za citotoksični efekat  $> 3$  ukazuje na dobru selektivnost prema ćelijama kancera, SI<sub>25</sub> vrednosti izračunate za 100P i 80P20S ukazuju na značajnu selektivnost. Slično tome, SI<sub>10</sub> vrednosti pokazale su značajnu selektivnost, sa efikasnošću u sledećem redosledu 50P50S  $>$  100P  $>$  100S. Na kraju, vrednosti SI<sub>25</sub> nisu definisane za uzorke 100S, 50P50S i 20P80S jer je citotoksičnost uočena samo u slučaju HCT 116 ćelija, dok u slučaju MRC-5 ćelija nije uočena nikakva redukcija vijabilnosti na testiranim koncentracijama. Ovo ukazuje na odličnu selektivnost, iako ona nije mogla biti numerički izražena.

Da bi se obezbedili osnovni podaci u vezi sa procenom rizika korišćenja gljive *P.ostreatus* gajenih na otpadu soje i suncokreta, određena je citotoksičnost, ali i genotoksičnost sirovih vodenih ekstrakata. Što se tiče testa citotoksičnosti, on je primenjen na uzorcima sa početka (dan nulti) i kraja (dan 14.) perioda skladištenja, što je omogućilo analizu uticaja skladištenja na eventualna citotoksična svojstva. Uvođenje testa genotoksičnosti pružilo je uvid u analizu još jednog aspekta potencijalne toksičnosti. Naime, genotoksični efekat je povezan sa potencijalnim razvojem kancera, ali i drugim oboljenjima povezanim sa povećanom učestalošću oštećenja na molekulu DNK/mutacija, tako da je na ovaj način analiza dodatno obogaćena.

Rezultati ispitivanja citotoksičnosti ekstrakata bukovače gajene na sojnoj i suncokretovoj ljustici za ćelije MRC-5 i HCT 116, prikazani na slikama 12. i 13., pokazali su nizak citotoksični efekat na obe linije ćelija u nultom danu skladištenja, bez razlike između rezultata za kontrolu (WS) i alternativne podloge. Ako se prag od 80% preživljavanja smatra indikacijom niskog citotoksičnog efekta, treba napomenuti da je, sa nekoliko izuzetaka (SBN uzorak u slučaju ćelija MRC-5 i SFW i SFW:WS u slučaju ćelija HCT 116), samo najveća testirana koncentracija (40 mg mL<sup>-1</sup>) bila citotoksična. Međutim, citotoksični potencijal se uglavnom povećao tokom perioda skladištenja u ovom istraživanju. Rezultati dobijeni za uzorke 14. dana pokazali su smanjenje preživljavanja ćelija: drastično za normalne fibroblaste i slabo (SFW, SFW:WS i SBN:SFW) ili umereno (SFW i SBN:SFW: WS) za ćelije kolorektalnog kancera. Međutim, upoređujući citotoksične odgovore detektovane za uzorke dobijene ekstrakcijom gljiva gajenih na alternativnim supstratima (onim koji sadrže ljustice soje i/ili suncokreta) sa kontrolom gajenom na čistoj slami (uzorak WS), uočena je slična citotoksičnost u slučaju ćelija MRC-5, odnosno blago veći citotoksični efekat ekstrakata dobijenih na alternativnim supstratima u slučaju HCT 116 ćelija. S obzirom na to da su polifenolna jedinjenja poznata po svojoj citotoksičnoj aktivnosti (Perveen i Al-Taweel, 2017), kao i na činjenicu da se ukupna količina polifenola takođe povećala tokom perioda skladištenja (14. dan u poređenju sa nultim) za uzorke SBN:WS, SFW, SFW:WS, SBN:SFW, može se zaključiti da je moguće da u polifenoli doprinele uočenoj citotoksičnosti. Međutim, neka neslaganja između ova dva parametra (citotoksični potencijal i vrednosti TPC) sugerišu da ne samo ukupna količina polifenola, već i polifenolni profil svakog uzorka nedvosmisleno doprinose posmatranoj citotoksičnosti. Osim toga, količine polisaharida i njihovi specifični profili u uzorcima takođe mogu doprineti ukupnim citotoksičnim svojstvima koja su posmatrana (Klaus i sar., 2021; Ren i sar., 2012). Pretpostavlja se da povećan citotoksični potencijal primećen na kraju perioda skladištenja može biti rezultat hemijskih promena nastalih tokom skladištenja gljiva, što dovodi do stvaranja nekih citotoksičnih jedinjenja (kao što je malondialdehid), razgradnje polisaharida i povećane aktivnosti metaboličkih enzima (Li i sar., 2021).

U daljem istraživanju, ispitivan je genotoksični potencijal ekstrakata gljiva i to necitotoksičnih koncentracija uzoraka dobijenih nultog dana, koristeći alkalni kometni test. Prikaz genotoksičnih svojstava sproveden je ne samo radi pružanja dodatnih informacija o proceni rizika konzumacije gljiva koje se gaje na alternativnim supstratima, već i radi utvrđivanja da li je zapažena citotoksičnost barem delimično uzrokovana indukcijom oštećenja na molekulu DNK, odnosno mehanizmom genotoksičnosti. Rezultati genotoksičnosti nakon 24 h tretmana ćelija MRC-5 i HCT 116 prikazani su na slici 14. A) i B). Za liniju ćelija MRC-5, samo je SFW ekstrakt bio genotoksičan pri koncentraciji od 20 mg mL<sup>-1</sup>. S druge strane, svi ekstrakti, uključujući i WS -

kontrolu, ukazivali su na genotoksični potencijal protiv kancerskih ćelija HCT 116, s najznačajnijim oštećenjem DNK pri višim primenjenim koncentracijama. Sličan rezultat prijavljen je od strane Klaus i sar. (2021), koji su pokazali slab genotoksični potencijal alkalnih ekstrakata i ekstrakata micelijalnih egzopolisaharida iz gljive *Pleurotus flabellatus*. Takođe su Buniel i sar. (2018) izvestili o genotoksičnom uticaju etanolnih ekstrakata bele bukovače (*P. ostreatus* var. *forida*) načelijskoj liniji kancera kolona HT-29. Što se tiče nekih drugih vrsta gljiva, da Rosa Guterres i sar. (2005) nisu primetili genotoksične ili mutagene efekte organskih ekstrakata *Agaricus blazei* Murrill prema V79 ćelijama. Interesantno je napomenuti id a su Rajkovic i sar. (2022) analizirali genotoksične i genoprotektivne efekte ekstrakata *A. bisporus* na ćelijskoj liniji AmE-711 pčela i utvrdili da ekstrakti *A. bisporus* ne samo da nemaju genotoksična, već imaju antigenotoksična svojstva.

**Tabela 15.** Citotoksičnost ekstrakata gljive *P. ostreatus* gajene na komini grožđa

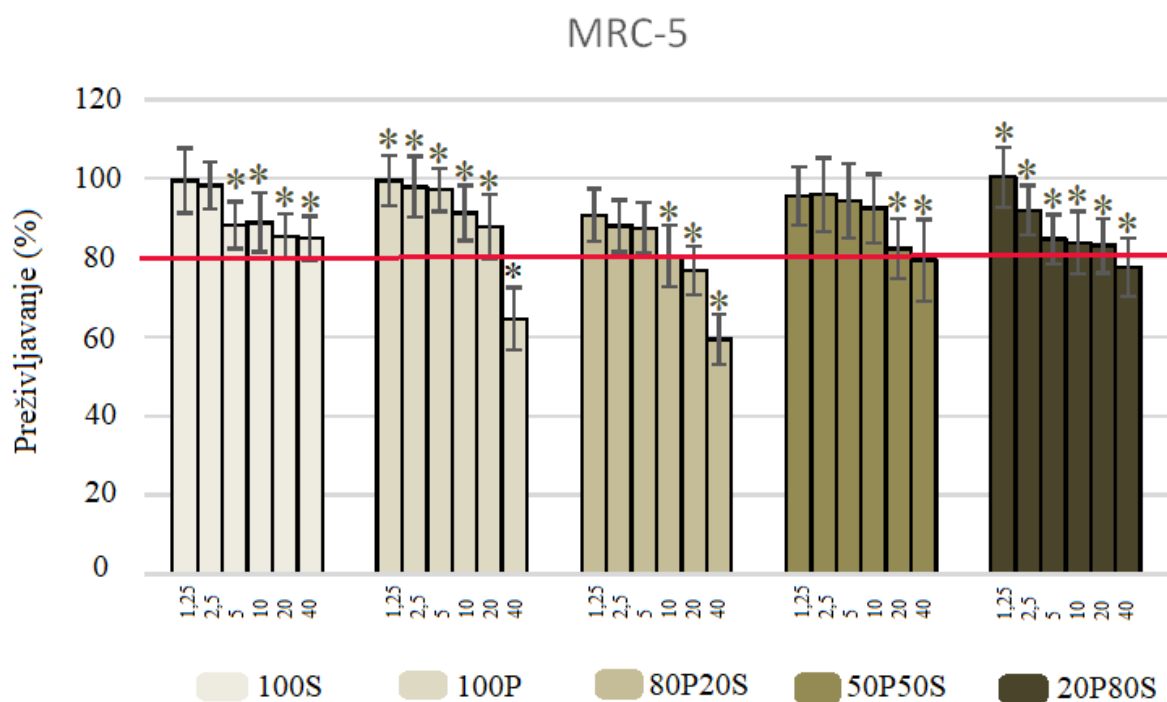
Uzorci	IC25		SI <sub>citotoksični efekat/IC25</sub>	IC10		SI <sub>citotoksični efekat/IC10</sub>
	MRC5	HCT 116		MRC5	HCT 116	
100S	nd	2,81	na	4,57	1,15	3,98
100P	31,05	6,65	4,67	13,81	1,20	11,51
80P20S	25,32	5,39	4,69	1,59	1,42	1,11
50P50S	nd	3,92	na	14,68	1,20	12,21
20P80S	nd	10,95	na	3,31	1,14	2,91

nd - nije određeno u primenjenom opsegu koncentracija zbog nedostatka toksičnosti

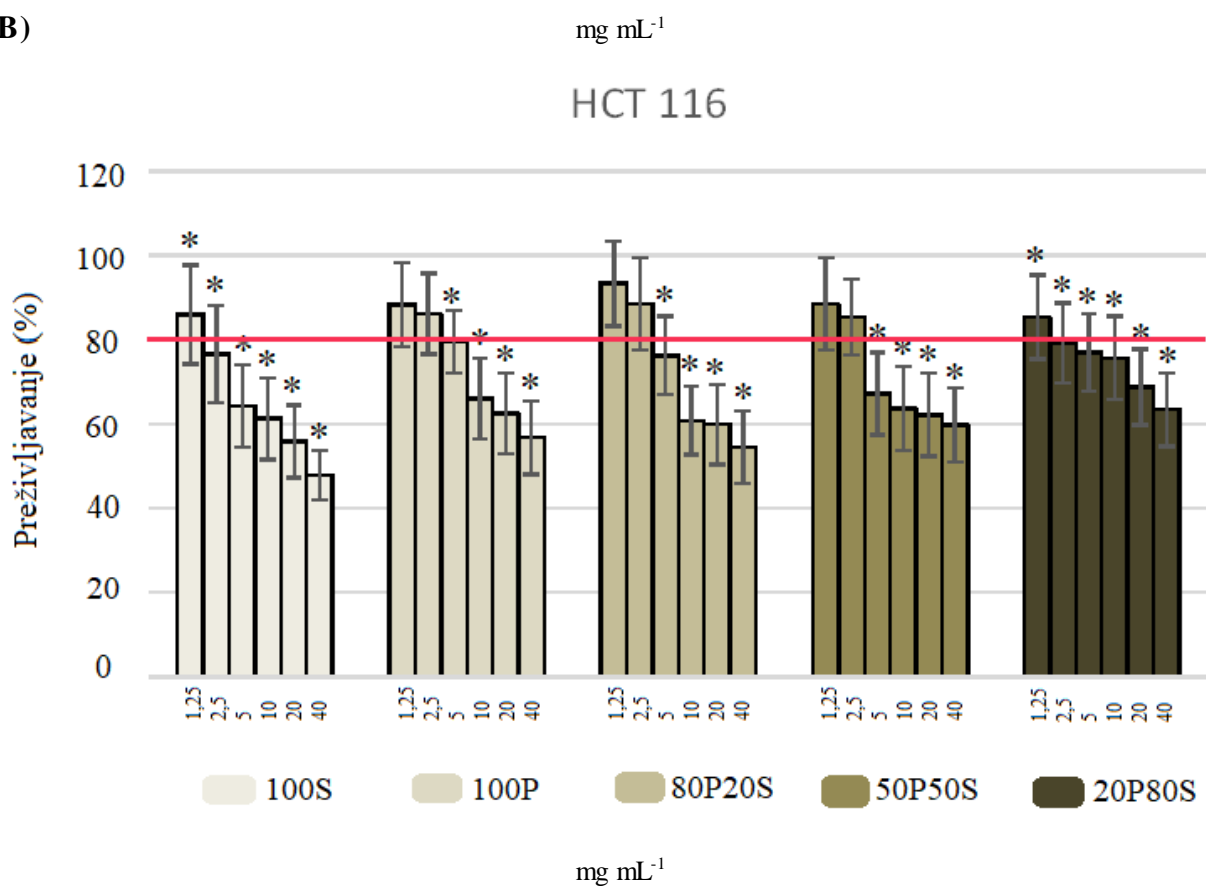
na - nije primenljivo, stoga što je citotoksičnost određena samo u kancerogenoj ćelijskoj liniji

Legenda: 100P - 100% komina grožđa; 80P20S - 80% komina grožđa: 20% pšenična slama; 50P50S - 50% komina grožđa: 50% pšenična slama; 20P80S - 20% komina grožđa: 80% pšenična slama

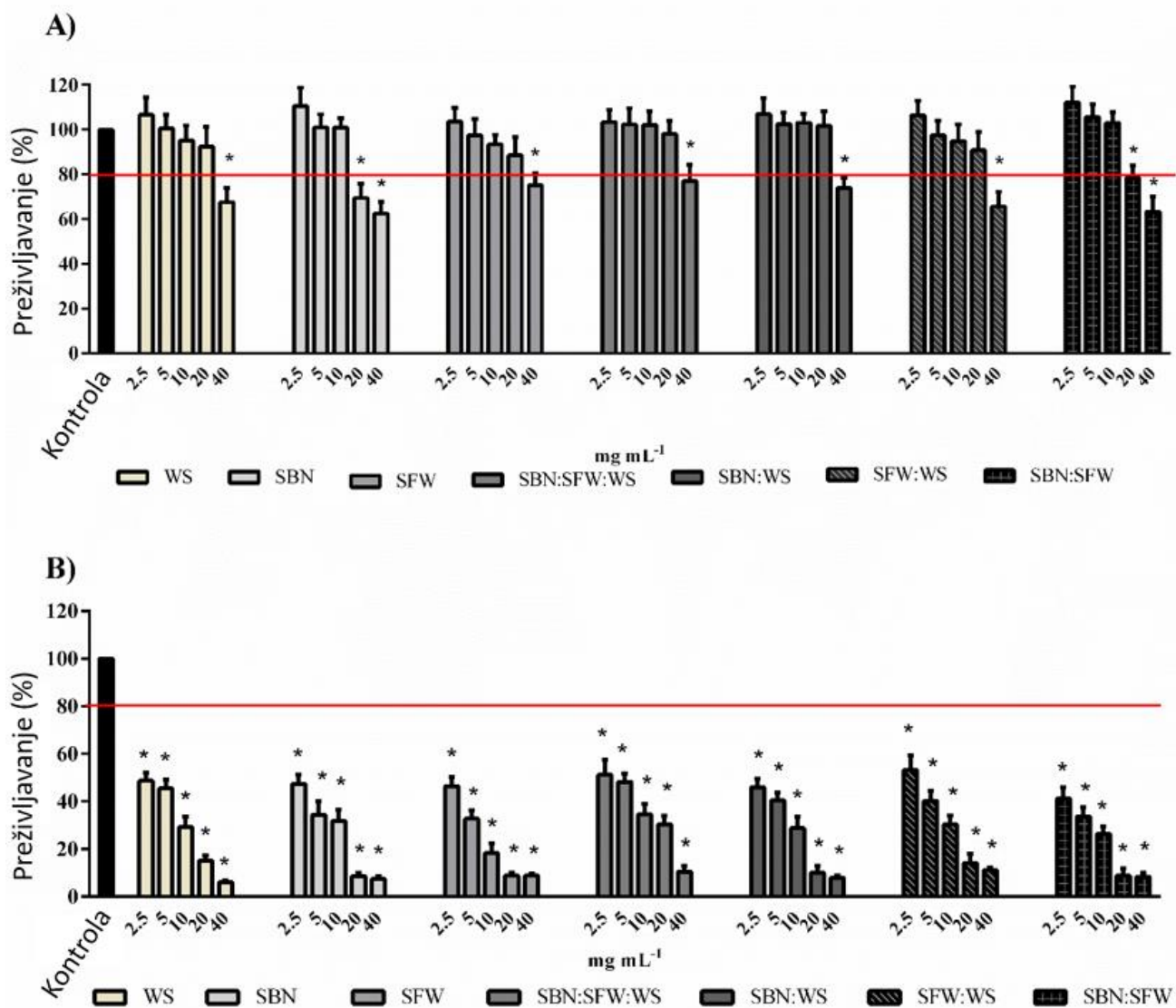
A)



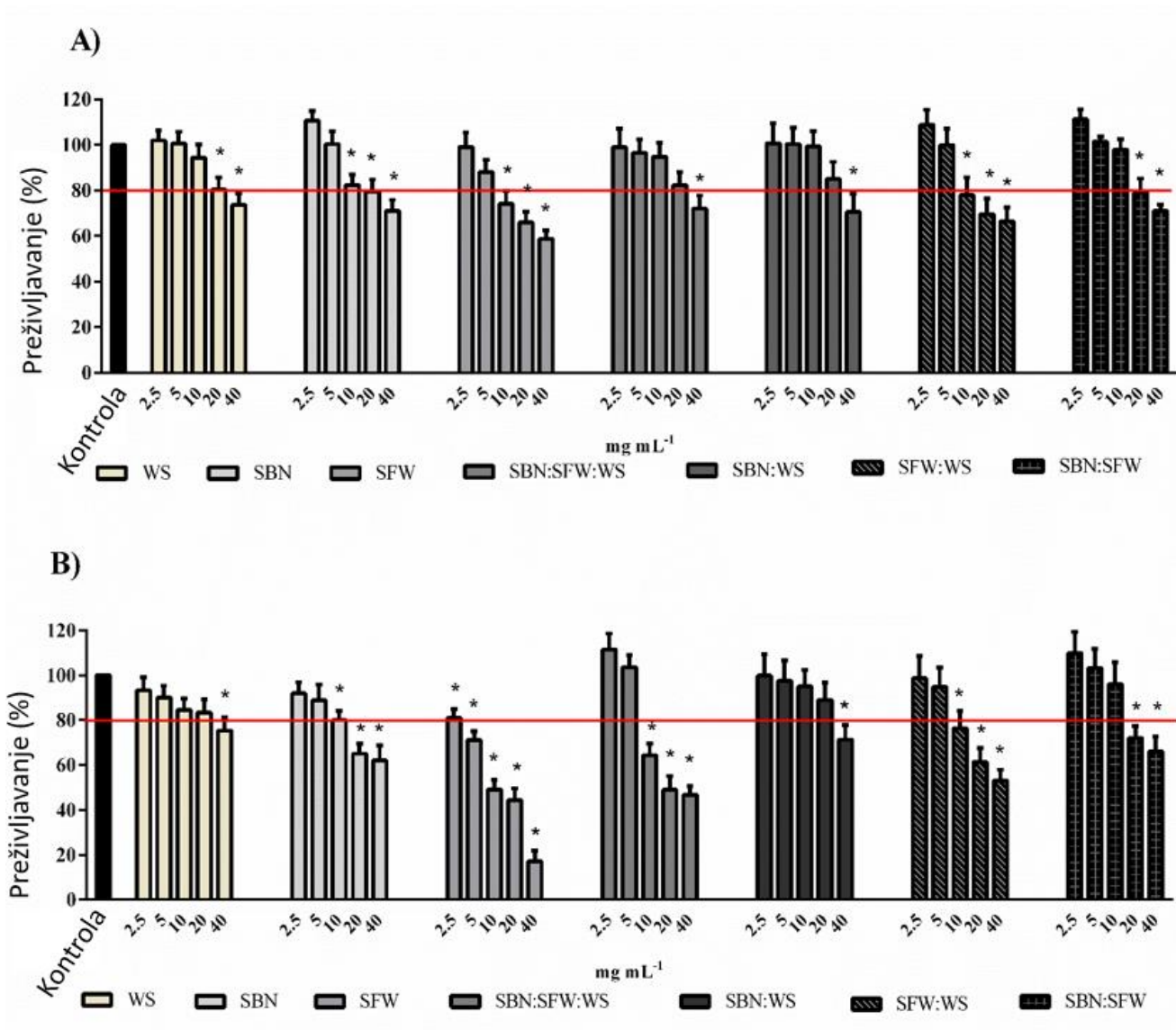
B)



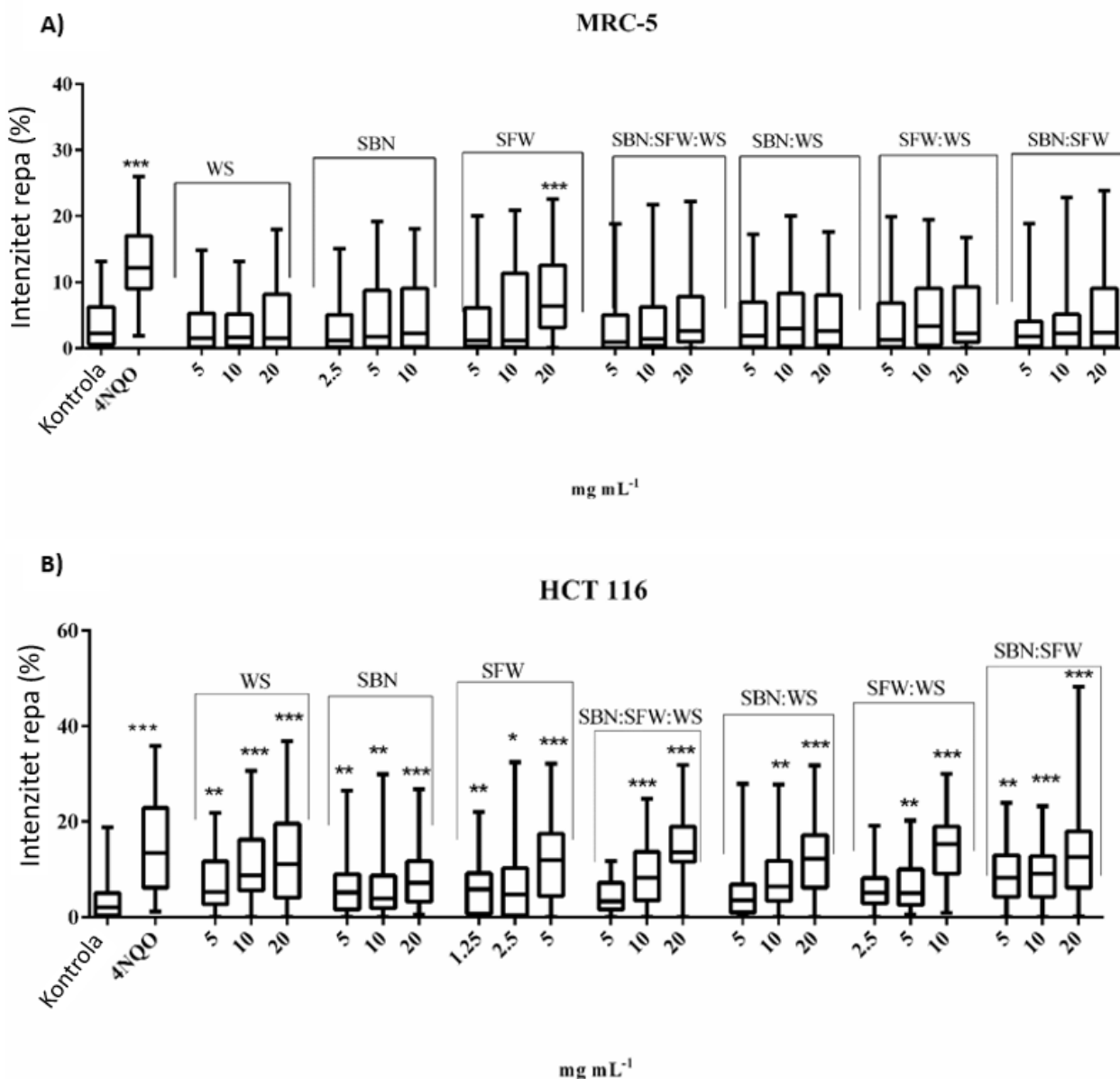
**Slika 11.** Preživljavanje ćelija tretiranih ekstraktima *P. ostreatus* gajenih na komini grožđa kombinaciji sa pšeničnom slamom nultog dana skladištenja: A) MRC-5 ćelijska linija; B) HCT 116 ćelijska linija. Prag od 80% preživljavanja se smatra indicijom niskog citotoksičnog efekta. Legenda: 100P - 100% komina grožđa; 80P20S - 80% komina grožđa: 20% pšenična slama; 50P50S - 50% komina grožđa: 50% pšenična slama; 20P80S - 20% komina grožđa: 80% pšenična slama



**Slika 12.** Preživljavanje MRC-5 ćelija tretiranih ekstraktima *P. ostreatus* gajenih na sojinoj i suncokretovoj ljusci u kombinaciji sa pšeničnom slamom: A) dan 0; B) dan 14. Prag od 80% preživljavanja se smatra indicijom niskog citotoksičnog efekta. Legenda: SBN – ljuska soje; SFW – ljuska suncokreta; WS – pšenična slama



**Slika 13.** Preživljavanje HCT 116 ćelija tretiranih ekstraktima *P. ostreatus* gajenih na sojinoj i suncokretovoj ljusci u kombinaciji sa pšeničnom slamom: A) dan 0; B) dan 14. Prag od 80% preživljavanja se smatra indikacijom niskog citotoksičnog efekta. Legenda: SBN – ljuska soje; SFW – ljuska suncokreta; WS – pšenična slama



**Slika 14.** Genotoksičnost ekstrakata gljiva (nulti dan skladištenja) prema A) fetalnim fibroblastima pluća MRC-5 (ECACC 84101801) i B) ćelijama kolorektalnog kancera HCT116 (ATCC CCL-247).

Napomena: SBN – ljuska soje; SFW – ljuska suncokreta; WS – pšenična slama (kontrola). Rezultati su izraženi kao TI (eng. tail intensity, procenat DNK u repovima komete). 4NQO (2 µg/ml) korišćen je kao pozitivna kontrola. Statistička značajnost je testirana korišćenjem Mann-Whitney U testa (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ).

#### 5.4. Rezultati FT-IR spektroskopije

FT-IR spektri plodonosnih tela gljive *P. ostreatus* gajenih na različitim supstratima koji sadrže pšeničnu slamu i kominu (otpad od grožđa) prikazani su na slici 15. Analizirani uzorci sadrže smešu/komplekse polisaharida, proteina i polifenola u različitim odnosima u zavisnosti od supstrata na kome su gajeni (Gutiérrez i sar., 1996; Radzki i sar., 2016).

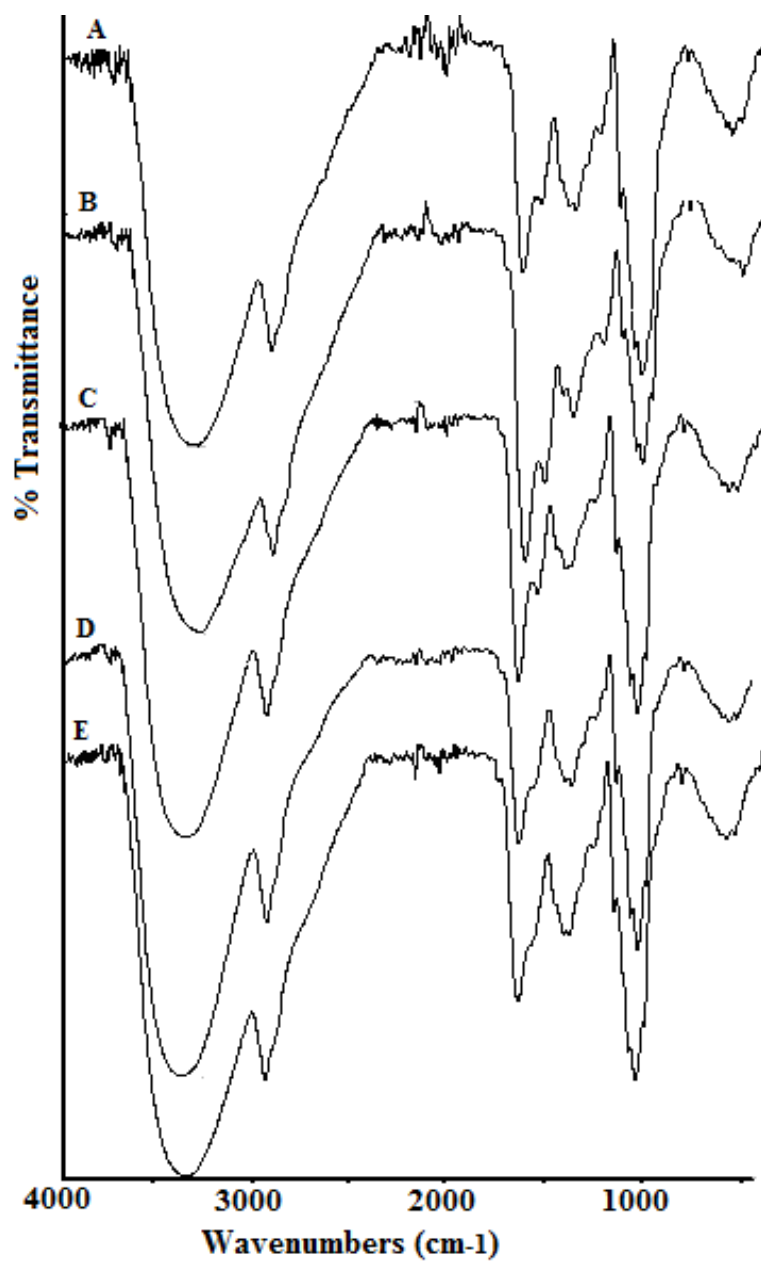
FT-IR spektar plodonosnih tela *P. ostreatus* gajenih na 100% slame (kontrolni uzorak – 100S, Slika 13. A) pokazao je regione karakteristične za prisustvo polisaharida i proteina. Karakteristična široka traka u oblasti 3000-3500  $\text{cm}^{-1}$  je rezultat valentnih vibracija OH grupa glikozidnih struktura koje učestvuju u formiranju jakih inter- i intramolekulskih veza kao i valentnih vibracija OH grupa molekula konstitucione vode. Takođe, ova široka traka, se pripisuje simetričnim i asimetričnim

vibracijama istezanja N-H veza (Carey, 1982; Kozarski i sar., 2011). Trake između 2950  $\text{cm}^{-1}$ -2850  $\text{cm}^{-1}$  koreliraju sa frekvencijama istezanja alifatičnih C-H grupa, dok se traka na 2910  $\text{cm}^{-1}$  odnosi na  $\text{CH}_2$  vibracije primarnih alkoholnih grupa monosaharidnih jedinica međusobno povezanih glikozidnim vezama (Kozarski i sar., 2019; Larkin, 2011).

Trake u oblasti 1000-1200  $\text{cm}^{-1}$  (*finger prints* za ugljene hidrate) mogu se pripisati valentnim vibracijama C-O i C-C veza kao i deformacionim vibracijama CCH, COH i HCO veza (Kačuráková i sar., 2000). Traka na 1078  $\text{cm}^{-1}$  ukazuje na prisutvo  $\beta$ -glikozidnih veza u heksapiranoznom nizu (Mathlouthi i Koenig, 1987; Stone i Clarke, 1992). Traka na 1037  $\text{cm}^{-1}$  odnosi se na C-O i C-C rastezanje  $\beta$ -glukozidnih veza, dok je traka na 988  $\text{cm}^{-1}$  relevantna rastezanju C-O (Šandula i sar., 1999). Trake manjeg intenziteta na 950  $\text{cm}^{-1}$  i 850  $\text{cm}^{-1}$  su karakteristične za  $\alpha$ -glikozidne veze (Šandula i sar., 1999). Apsorpcioni maksimum na 804  $\text{cm}^{-1}$  ukazuje na prisustvo ostataka manoze (Alzorqi i sar., 2017; Gutiérrez i sar., 1996).

U regionu između 1800  $\text{cm}^{-1}$  i 1500  $\text{cm}^{-1}$ , ističu se dve glavne trake na 1646  $\text{cm}^{-1}$  i 1570  $\text{cm}^{-1}$  što odgovara vibracijama istezanja amida I i II i ukazuje na prisustvo proteina. Traka sa maksimumom na 1646  $\text{cm}^{-1}$  se takođe poklapa sa valentnim vibracijama O-H adsorbovane vode. Intenzivna traka na 1650-1620  $\text{cm}^{-1}$  je indikativna za aromatične C=C grupe koje su konjugovane sa C=O i/ili COO-grupama i može ukazivati na prisustvo fenolnih jedinjenja (Harki i sar., 1997; Kozarski i sar., 2012). Region na 1450-1460  $\text{cm}^{-1}$  se pripisuje frekvencijama istezanja C-H veza alifatičnih grupa u fenolnim jedinjenjima (Harki i sar., 1997).





**Slika 15.** FTIR spektri plodonosnih tela gljive *P. ostreatus* gajene na različitim supstratima: A) slama (100%) – 100S; B) otpad od grožđa (100%) – 100P; C) 80% otpad od grožđa, 20% slama – 80P20S; D) 50% otpad od grožđa, 50% slama – 50P50S; E) 80% slama i 20% otpad od grožđa – 80S20P.

## 5.5. Rezultati analize parametara kvaliteta bukovače nabavljene iz standardne proizvodnje sa dodatkom začinskog bilja podvrgnute različitim kulinarskim metodama

### 5.5.1. Rezultati preliminarnog senzornog ispitivanja

Prema preliminarnoj evaluaciji (Tabela 16.), najprihvatljiviji ukus i ukupan kvalitet, uz zanemarljive primećene nedostatke, zabeleženi su za kontrolni uzorak i bukovaču sa dodatkom majčine dušice i origana, što je uticalo na odluku da se crni biber ne razmatra za dalja istraživanja. Što se tiče drugih kulinarskih metoda, ukupan kvalitet pokazao se kao obećavajući kod pripreme hrane metodom *sous-vide* ( $T = 60^{\circ}\text{C}$ ), pa je ova metoda dalje primenjena prema senzornim i teksturalnim svojstvima gljive.

**Tabela 16.** Preliminarna senzorna evaluacija bukovače pripremljene sa tri odabrana začina (majčina dušica, crni biber i origano)

Kulinarska metoda	Ukus	Miris	Ukupan kvalitet	Prisutni defekti
<b>Kuvanje, 80°C 60'</b>				
Bukovača (kontrola)	4,50 ± 0,55 <sup>a</sup>	4,17 ± 1,17 <sup>a</sup>	4,33 ± 0,82 <sup>a</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>
Bukovača sa dodatkom majčine dušice	4,50 ± 0,55 <sup>a</sup>	4,50 ± 0,55 <sup>a</sup>	4,33 ± 0,52 <sup>a</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>
Bukovača sa dodatkom crnog bibera	1,83 ± 0,75 <sup>b</sup>	4,17 ± 0,41 <sup>a</sup>	2,33 ± 0,82 <sup>b</sup>	1,83 ± 0,41 <sup>b</sup>
Bukovača sa dodatkom origana	4,33 ± 0,82 <sup>a</sup>	4,33 ± 0,82 <sup>a</sup>	4,17 ± 0,75 <sup>a</sup>	0,17 ± 0,41 <sup>a</sup>
<b>Blanširanje, 88°C 2'</b>				
Bukovača (kontrola)	2,67 ± 1,51 <sup>b</sup>	2,33 ± 0,82 <sup>b</sup>	2,50 ± 1,38 <sup>b</sup>	1,33 ± 0,82 <sup>b</sup>

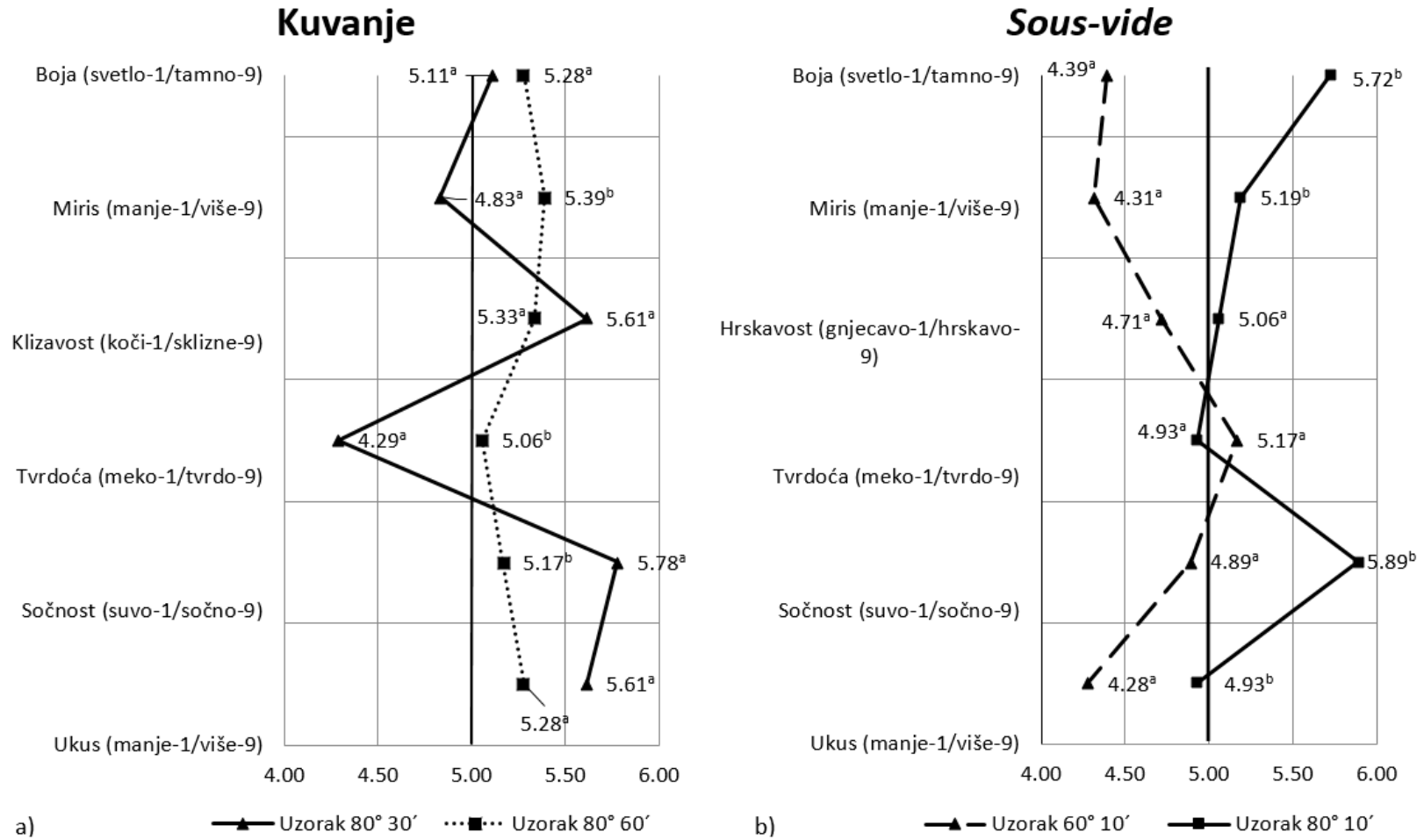
Srednje vrednosti šest ponavljanja ± standardna devijacija. Srednje vrednosti u istoj koloni sa različitim malim slovima su značajno različite ( $p < 0,05$ ).

### 5.5.2. Rezultati glavne faze senzornog ispitivanja bukovače: tretman kuvanjem i metodom *sous-vide*

#### 5.5.2.1. Senzorni profil bukovače pripremljene različitim kulinarskim metodama

Na slici 16. prikazani su senzorni profili gljiva tretiranih različitim kulinarskim metodama, pri različitim režimima termičkih tretmana: (a) kuvanje na 80°C tokom 30' i 60', u poređenju sa 45' za kontrolu; (b) *sous-vide* tokom 10' na 60°C i 80°C, u poređenju sa 70°C za kontrolu. Centralna linija na svakom grafikonu na slici 16. predstavlja unapred određenu vrednost na skali (5) za kontrolne tretmane, na osnovu koje je vršeno poređenje: tretman 80°C 45' za metodu kuvanja (a) i tretman 70°C 10' za *sous-vide* (b). Svaka senzorna karakteristika kod ispitivanih uzoraka ocenjena je u poređenju sa kontrolnim uzorkom. Kod uzoraka tretiranih kuvanjem na 80°C (slika 16.a), statistički značajne razlike između tretmana od 30 i 50 minuta javile su se u mirisu, tvrdoći i sočnosti. Naime, kraće vreme tretmana uticalo je na jaču sočnost i intenzitet mirisa, kao i omekšavanje zagrižaja gljive.

Slika 16.b) pokazuje da temperatura primenjena kod tretmana *sous-vide* značajno utiče na razlike u senzornim svojstvima između uzoraka. Prvo, boja uzorka na 60°C 10' bila je primetno svetlija u odnosu na kontrolu i uzorak na 80°C 10', tim redosledom. Ovo može biti povezano sa podacima o boji koji potiču iz instrumentalne metode CVS, prikazane u Tabeli 17. i 18., koja ukazuje na pojačanje smeđih i žutih nijansi sa tretmanom više temperature. Isti odnos bio je prisutan i za sledeće karakteristike: miris, ukus i sočnost. Mekoća uzorka rasla je sa povećanjem temperature, što je potvrđeno analizom teksture (Tabela 19.). Dodatno, intenzitet sočnosti uzorka na 80°C 10' bio je izuzetno visok, što se očekuje sa tretmanom više temperature.



**Slika 16.** Senzorni profil gljiva tretiranih različitim kulinarisim metodama, temperaturama i vremenima: (a) kuvanje na 80°C tokom 30' i 60', u poređenju sa 45' za kontrolu; (b) sous-vide tokom 10' na 60°C i 80°C, u poređenju sa 70°C za kontrolu. Srednje vrednosti sa različitim malim slovima znače da su statistički značajno različite ( $p < 0,05$ ).

### 5.5.2.2. Karakteristike boje organske bukovače

Što se tiče ukupne razlike u boji centralnog dela šešira gljive, tretmani 80°C 40' i 80°C 50' imali su najbližnju boju kontrolnom uzorku. Sličan trend primećen je i za indeks bele boje, koji je bio viši za centralni deo šešira gljiva kod tretmana sa sličnim vremenom kuvanja kao kod kontrolnog uzorka. Tretman sa najkraćim vremenom kuvanja imao je najviši indeks bele boje ivica šešira gljiva, dok su tretmani od 40' i 50' pokazali da je ovaj parametar najviši za himenijum. Što se tiče indeksa braon i žute boje centralnog dela šešira gljiva, tretmani od 40' i 50' pokazali su niže vrednosti za centralne delove i više vrednosti za ivice. Što se tiče himenijuma gljiva, indeksi braon i žute boje bili su najviši za tretman od 60' (Tabela 17.).

Tretman *sous-vide* pokazao je manji uticaj na promenu boje generalno (Tabela 18.), sa nižim vrednostima indeksa. Izuzetak je primećen u ukupnoj razlici u boji himenijuma gljiva, koja je pokazala manju razliku u boji uzoraka sa tretmanom više temperature. Naprotiv, indeks bele boje uzoraka gljiva bio je niži sa povećanjem temperature, u svim analiziranim delovima gljive. Indeks braon i žute boje centralnog dela šešira gljive povećavali su se sa tretmanom više temperature. Sličan trend primećen je za indekse braon i žute boje ivica šešira gljiva, sa blažom krivom rasta pri višim temperaturama. Vrednosti indeksa himenijuma gljiva pokazali su blagi pad sa povećanjem temperature, počevši od tretmana *sous-vide* na 60°C. Podaci o boji su vizualizovani slikama kuvanih i *sous-vide* tretiranih gljiva (Slika 17., a i b).

Pojava braon boje u gljivama nakon termičke obrade objašnjena je prisustvom Maillard-ove reakcije. Mnogi istraživači pominju ovaj fenomen, bilo da je uzrok ove reakcije kulinarska obrada gljiva kao što su kuvanje ili pečenje u rerni (Selli i sar., 2021) ili metoda sušenja (Politowicz i sar., 2018). Povećanje indeksa braon boje može biti uzrokovano i vremenom skladištenja, kao posledica enzimske oksidacije ili rasta mikroorganizama. Ovo je primećeno u prethodnim studijama (Djekic i sar., 2017; Doroški i sar., 2021b).

Boja je veoma važan parametar kvaliteta hrane koji određuje vrednost proizvoda i utiče na privlačnost proizvoda potencijalnim potrošačima (Selli i sar., 2021). Poređenje CVS sistema i tradicionalnog kolorimetra za evaluaciju boje sprovedli su Tomasevic i sar. (2018) i zatim potvrdili Milovanovic i sar., (2021) za mlečne proizvode. Rezultati oba istraživanja ukazala su na to da CVS sistem doprinosi boljim rezultatima.

**Tabela 17.** Efekti vremena kuvanja na karakteristike boje gljiva (šešir, ivica šešira i himenijum)

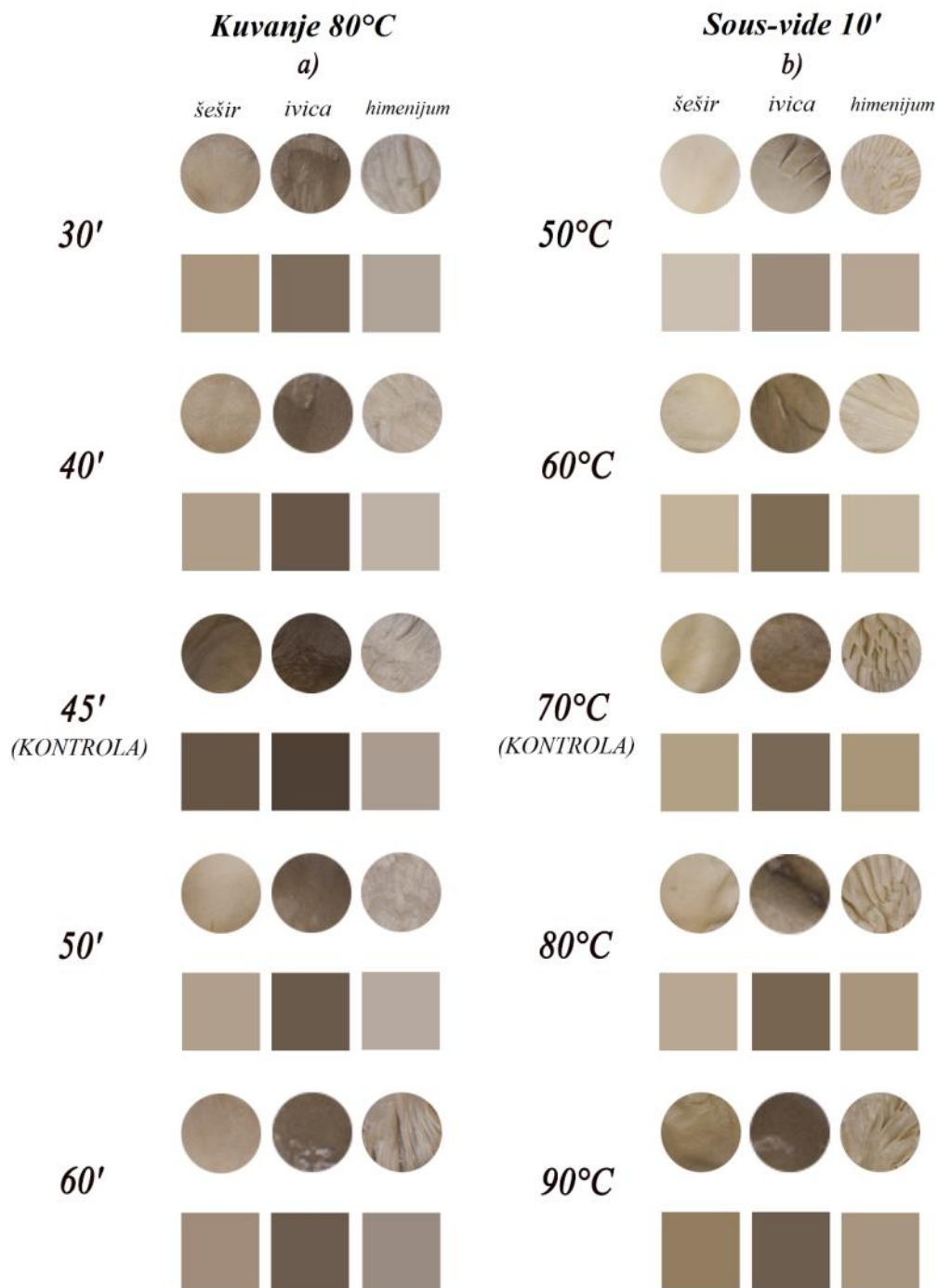
Kuvanje na 80°C	30'	40'	50'	60'
<b>Karakteristike boje centralnog dela šešira gljive</b>				
Ukupna razlika boje ( $\Delta E$ )	26,64 $\pm$ 3,20 <sup>AB</sup>	29,27 $\pm$ 2,47 <sup>BC</sup>	30,96 $\pm$ 3,11 <sup>C</sup>	23,40 $\pm$ 2,79 <sup>A</sup>
Indeks braon boje (BI)	39,65 $\pm$ 5,79 <sup>A</sup>	32,41 $\pm$ 3,65 <sup>BC</sup>	28,33 $\pm$ 4,36 <sup>C</sup>	35,36 $\pm$ 4,26 <sup>AB</sup>
Indeks žute boje (YI)	38,25 $\pm$ 4,65 <sup>A</sup>	31,94 $\pm$ 2,91 <sup>B</sup>	27,45 $\pm$ 3,73 <sup>B</sup>	32,00 $\pm$ 3,66 <sup>B</sup>
Indeks bele boje (WI)	59,46 $\pm$ 3,32 <sup>AB</sup>	62,96 $\pm$ 2,52 <sup>BC</sup>	65,09 $\pm$ 3,16 <sup>C</sup>	57,69 $\pm$ 2,75 <sup>A</sup>
<b>Karakteristike boje ivice šešira gljive</b>				
Ukupna razlika boje ( $\Delta E$ )	20,77 $\pm$ 4,92 <sup>A</sup>	11,67 $\pm$ 3,57 <sup>B</sup>	12,70 $\pm$ 3,81 <sup>B</sup>	13,47 $\pm$ 3,11 <sup>B</sup>
Indeks braon boje (BI)	47,26 $\pm$ 10,37	57,04 $\pm$ 4,17	56,00 $\pm$ 10,69	48,38 $\pm$ 8,22
Indeks žute boje (YI)	42,93 $\pm$ 8,84	49,88 $\pm$ 3,20	48,19 $\pm$ 8,54	42,08 $\pm$ 7,59
Indeks bele boje (WI)	45,56 $\pm$ 4,84 <sup>A</sup>	37,09 $\pm$ 3,29 <sup>B</sup>	37,93 $\pm$ 3,75 <sup>B</sup>	39,38 $\pm$ 3,20 <sup>B</sup>
<b>Karakteristike boje himenijuma gljive</b>				
Ukupna razlika boje ( $\Delta E$ )	3,60 $\pm$ 1,59 <sup>A</sup>	7,47 $\pm$ 2,06 <sup>B</sup>	5,19 $\pm$ 2,26 <sup>AB</sup>	6,67 $\pm$ 1,95 <sup>B</sup>
Indeks braon boje (BI)	17,32 $\pm$ 2,44 <sup>A</sup>	16,08 $\pm$ 1,08 <sup>A</sup>	15,04 $\pm$ 3,42 <sup>A</sup>	22,42 $\pm$ 5,10 <sup>B</sup>
Indeks žute boje (YI)	16,60 $\pm$ 2,64 <sup>AB</sup>	14,96 $\pm$ 1,20 <sup>A</sup>	13,40 $\pm$ 3,59 <sup>A</sup>	20,00 $\pm$ 5,34 <sup>B</sup>
Indeks bele boje (WI)	67,38 $\pm$ 2,24 <sup>B</sup>	71,88 $\pm$ 2,01 <sup>A</sup>	69,38 $\pm$ 2,26 <sup>AB</sup>	58,60 $\pm$ 2,10 <sup>C</sup>

Srednje vrednosti deset ponavljanja  $\pm$  standardna devijacija. Srednje vrednosti u istom redu sa različitim velikim slovima su statistički značajno različite ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 18.** Efekti temperature kulinarskog tretmana *sous-vide* na karakteristike boje gljiva (šešir, ivica šešira i himenijum)

<i>Sous-vide</i> tokom 10'	50°C	60°C	80°C	90°C
<b>Karakteristike boje centralnog dela šešira gljive</b>				
Ukupna razlika boje ( $\Delta E$ )	14,81 $\pm$ 4,02 <sup>A</sup>	7,51 $\pm$ 3,62 <sup>B</sup>	4,95 $\pm$ 2,23 <sup>B</sup>	13,41 $\pm$ 2,75 <sup>A</sup>
Indeks braon boje (BI)	15,88 $\pm$ 4,40 <sup>A</sup>	28,42 $\pm$ 5,36 <sup>B</sup>	31,29 $\pm$ 5,80 <sup>B</sup>	59,40 $\pm$ 8,41 <sup>C</sup>
Indeks žute boje (YI)	17,19 $\pm$ 5,01 <sup>A</sup>	30,83 $\pm$ 5,33 <sup>B</sup>	32,60 $\pm$ 5,12 <sup>B</sup>	55,80 $\pm$ 7,17 <sup>C</sup>
Indeks bele boje (WI)	76,58 $\pm$ 4,15 <sup>A</sup>	69,62 $\pm$ 3,76 <sup>B</sup>	66,03 $\pm$ 2,97 <sup>B</sup>	49,63 $\pm$ 2,89 <sup>C</sup>
<b>Karakteristike boje ivice šešira gljive</b>				
Ukupna razlika boje ( $\Delta E$ )	14,13 $\pm$ 3,17 <sup>A</sup>	4,78 $\pm$ 1,88 <sup>B</sup>	3,61 $\pm$ 1,79 <sup>B</sup>	6,18 $\pm$ 1,81 <sup>B</sup>
Indeks braon boje (BI)	33,30 $\pm$ 9,30 <sup>A</sup>	61,52 $\pm$ 9,52 <sup>B</sup>	55,01 $\pm$ 9,69 <sup>B</sup>	51,57 $\pm$ 10,81 <sup>B</sup>
Indeks žute boje (YI)	31,92 $\pm$ 7,89 <sup>A</sup>	56,41 $\pm$ 7,66 <sup>B</sup>	49,53 $\pm$ 8,49 <sup>B</sup>	46,48 $\pm$ 8,91 <sup>B</sup>
Indeks bele boje (WI)	57,05 $\pm$ 3,91 <sup>A</sup>	43,70 $\pm$ 2,27 <sup>B</sup>	42,58 $\pm$ 2,93 <sup>B</sup>	38,81 $\pm$ 2,09 <sup>C</sup>
<b>Karakteristike boje himenijuma gljive</b>				
Ukupna razlika boje ( $\Delta E$ )	10,25 $\pm$ 2,54 <sup>A</sup>	12,46 $\pm$ 2,49 <sup>A</sup>	4,60 $\pm$ 1,99 <sup>B</sup>	6,06 $\pm$ 1,88 <sup>B</sup>
Indeks braon boje (BI)	27,56 $\pm$ 3,95 <sup>A</sup>	26,79 $\pm$ 4,46 <sup>A</sup>	39,72 $\pm$ 6,17 <sup>B</sup>	35,91 $\pm$ 6,67 <sup>B</sup>
Indeks žute boje (YI)	27,56 $\pm$ 4,18 <sup>A</sup>	29,26 $\pm$ 4,53 <sup>A</sup>	39,38 $\pm$ 5,62 <sup>B</sup>	35,68 $\pm$ 6,46 <sup>B</sup>
Indeks bele boje (WI)	66,61 $\pm$ 3,36 <sup>B</sup>	70,26 $\pm$ 2,52 <sup>A</sup>	59,10 $\pm$ 2,86 <sup>C</sup>	59,98 $\pm$ 2,74 <sup>C</sup>

Srednje vrednosti deset ponavljanja  $\pm$  standardna devijacija. Srednje vrednosti u istom redu sa različitim velikim slovima su statistički značajno različite ( $p < 0,05$ ).



**Slika 17.** Slike i kolor čipovi gljiva tretiranih različitim kulinarskim metodama, temperaturama i vremenom (šešir, ivica i himenijum). (a) kuvanje na 80°C tokom 30', 40', 45' (kontrola), 50' i 60' (b) *sous-vide* na 50°C, 60°C, 70°C (kontrola), 80°C i 90°C tokom 10'.

### 5.5.2.3. Teksturna svojstva organske bukovače

Razlika u teksturnim svojstvima gljiva tretiranih metodom *sous-vide* i kuvanja naglašena je parametrom vršnog opterećenja. On predstavlja "maksimalnu silu potrebnu za probijanje hrane kombinacijom adhezivnih i kohezivnih efekata" (Zorrilla i sar., 2000). Ovaj parametar se povećavao sa većom temperaturom tretmana *sous-vide* i smanjivao sa dužim vremenom kuvanja. Naime, što je temperatura tretmana *sous-vide* bila viša, bila je potrebna veća sila kompresije. Duže vreme tretmana *sous-vide* nije uticalo na parametre teksture gljiva (podaci nisu prikazani). Za tretman kuvanja, pravilo je bilo obrnuto. Parametar adhezije takođe je pokazao suprotan trend za dve kulinarske metode. Kontrolni uzorak *sous-vide* tretmana imao je najnižu vrednost parametra adhezije, a najviši za tretman kuvanja (Tabela 19.).

Ko i sar. (2007) otkrili su da termička obrada (kuvanje na temperaturama od 70–100°C) značajno smanjuju tvrdoću i lepljivost, dok istovremeno povećavaju elastičnost i kohezivnost baršunaste panjevčice (*Flammulina velutipes*). Boin i sar. (2016) istraživali su teksturne i senzorne karakteristike uzoraka kraljevskih bukovača (*Pleurotus eryngii*) koji su bili sirovi, sveži kuvani i suvi kuvani. Proučavane su slične karakteristike u vezi sa atributima gljiva. Primećena je razlika u boji sirovih uzoraka. Kuvani uzorci su se razlikovali u slučaju atributa tvrdoće, gde je suvi kuvani uzorak dobio višu ocenu. Intenzitet arome bio je jednak, dok je žvakanje bilo lakše kod sveže kuvanih uzoraka.

**Tabela 19.** Efekti kulinarske metode, temperature i vremena na teksturne karakteristike gljiva

<i>Sous-vide</i> tokom 10'	50°C	60°C	70°C (kontrola)	80°C	90°C
Vršno opterećenje (N)	0,60 ± 0,10 <sup>a</sup>	0,78 ± 0,30 <sup>a,b</sup>	0,86 ± 0,24 <sup>a,b</sup>	0,92 ± 0,40 <sup>b</sup>	0,92 ± 0,26 <sup>b</sup>
Sila adhezije (N)	0,06 ± 0,10	0,05 ± 0,02	0,03 ± 0,01	0,03 ± 0,02	0,03 ± 0,01
Adhezija (mJ)	42,11 ± 62,28	61,87 ± 23,34	38,57 ± 50,13	40,77 ± 49,93	57,10 ± 58,98
Kuvanje na 80°C	30'	40'	45' (kontrola)	50'	60'
Vršno opterećenje (N)	1,06 ± 0,30 <sup>a</sup>	1,00 ± 0,28 <sup>a</sup>	1,02 ± 0,24 <sup>a</sup>	0,72 ± 0,31 <sup>b</sup>	0,71 ± 0,20 <sup>b</sup>
Sila adhezije (N)	0,04 ± 0,01	0,04 ± 0,02	0,03 ± 0,01	0,03 ± 0,02	0,03 ± 0,01
Adhezija (mJ)	58,39 ± 48,41	49,61 ± 36,62	63,14 ± 51,15	47,52 ± 50,11	35,45 ± 36,27

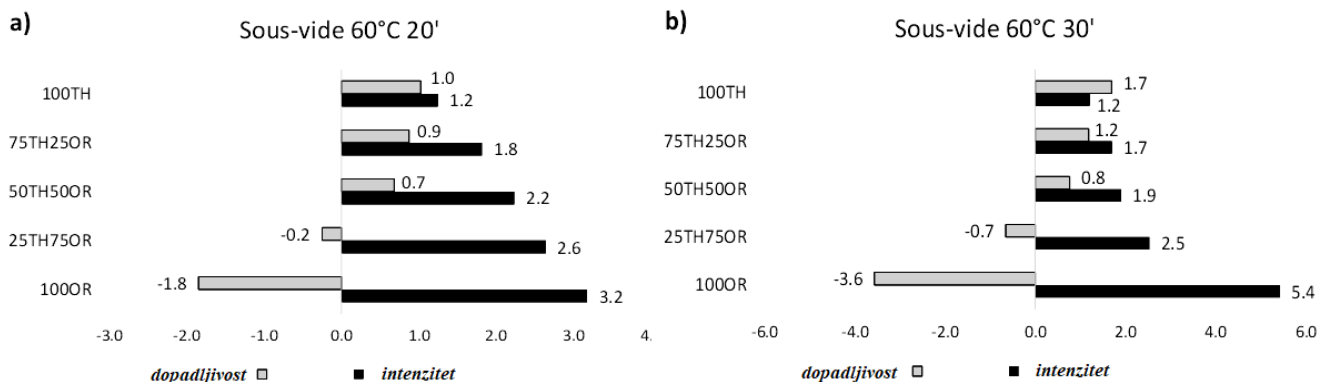
Srednje vrednosti deset ponavljanja ± standardna devijacija. Srednje vrednosti u istom redu sa različitim slovima su značajno različite (p<0,05).

### 5.5.3. Rezultati glavne faze senzornog ispitivanja bukovače sa dodatkom začinskog bilja: tretman metodom *sous-vide*

#### 5.5.3.1. Senzorni profil bukovače sa dodatkom začinskog bilja pripremljene metodom *sous-vide*

U skladu s prethodno analiziranim podacima, za dalju analizu odabrani su začini origano i majčina dušica, kao i *sous-vide* tretman na 60°C kao kulinarska metoda. Preliminarno istraživanje ukazalo je na to da se oba začina mogu koristiti kako bi se poboljšao ukus bukovače obrađene na taj način. Međutim, s obzirom da tretman koji traje 10 minuta nije rezultirao očekivanom intenzivnošću ukusa začina (podaci nisu prikazani), *sous-vide* obrada je produžena na 20 i 30 minuta. Utisci o intenzitetu povezani s dodatim začinima bili su u proporcionalni s procentom prisutnog origana. Nasuprot tome, senzorna prihvatljivost gljiva bila je obrnuto proporcionalna sadržaju origana. Upoređujući dva vremenska tretmana *sous-vide* (Slika 18.), ukupni rezultati intenziteta za svaki uzorak nakon 20 minuta (a) i 30 minuta (b) bili su slični, s izuzetkom 100OR, koji je ocenjen s mnogo jačim

intenzitetom nakon 30 minuta tretmana. Slično tome, privlačnost dva negativno ocenjena uzorka: 25TH75OR i 100OR bila je bliža kontrolnom (manje negativna) nakon kraćeg vremena *sous-vide* tretmana. Ocena privlačnosti za uzorke s većim sadržajem majčine dušice bile su više nakon dužeg *sous-vide* tretmana.



**Slika 18.** Intenzitet arome začina u poređenju sa uobičajenom začinjenosti hrane i dopadljivost organske bukovače sa dodatkom začina a) *sous-vide* 60° 20'; b) *sous-vide* 60° 30'

Legenda: Skala intenziteta: niži intenzitet (negativne vrednosti) - "0" (potpuno isto) - viši intenzitet (pozitivne vrednosti). Skala dopadljivosti: izuzetno se ne dopada (negativne vrednosti) - "0" (neutralni stav) - izuzetno se dopada (pozitivne vrednosti). Kodovi uzoraka: 100TH – 100% Majčina dušica; 75TH25OR – 75% Majčina dušica: 25% Origan; 50TH50OR – 50% Majčina dušica: 50% Origan; 25TH75OR – 25% Majčina dušica: 75% Origan; 100OR – 100% Origan.

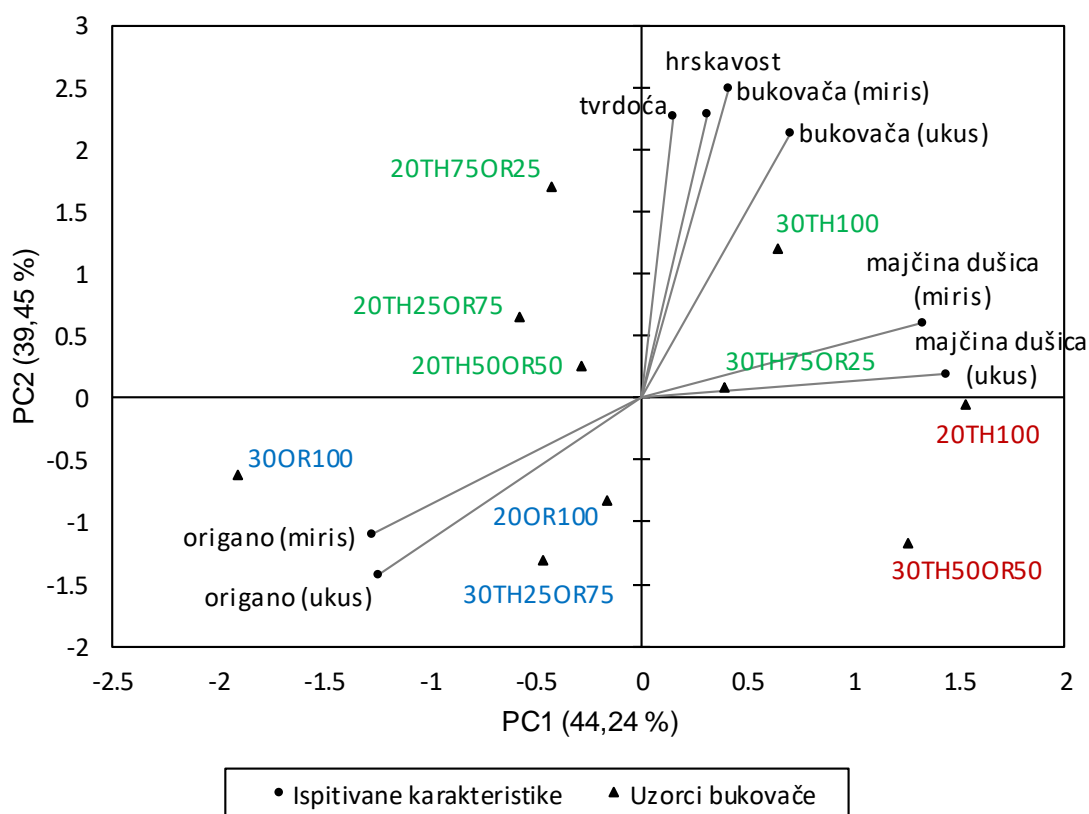
Analiza senzornih karakteristika gljiva obično se vrši bez dodataka. Jedino istraživanje koje obuhvata senzornu evaluaciju gljiva s blagim modifikacijama ukusa uradili su Khaskheli i sar. (2017) koristeći tradicionalnu kinesku anaerobnu metodu pripreme shiitake ukišljenih gljiva sa dodatkom ulja slačice ili običnom vodom, uz dodatak sirćeta i soli. Boja, aroma i ukupna prihvatljivost uzoraka s uljem slačice pokazale su se najboljim u poređenju s uzorcima s običnom vodom, što ukazuje na povećanu prijatnost senzornih karakteristika gljiva sa poboljšivačima ukusa. Origan i majčina dušica uglavnom su se dodavali u formi esencijalnih ulja, a proizvodi koji su predstavljali predmet istraživanja bili su različiti tipovi mesnih proizvoda. Nasuprot ovim rezultatima, u senzornoj evaluaciji bolonjskih kobasica s dodatkom citrusne vode, esencijalnih ulja origana i majčine dušice (Viuda-Martos i sar., 2009), uzorak sa dodatkom samo ulja origana imao je očitu prednost u vezi sa ukupnom dopadljivošću i opštim kvalitetom, dok je uzorak sa dodatkom ulja majčine dušice ocenjen kao bolji samo u slučaju intenziteta boje, sočnosti i tvrdoće. Osim toga, senzorna analiza ukusa i arome ćufti od svinjskog mesa i hamburgera sa dodatkom esencijalnih ulja origana i majčine dušice, koji su sprovedli Szymandera-Buszka i sar., (2020), ukazuje na preferenciju potrošača prema aromi i ukusu origana. Nasuprot tome, esencijalno ulje majčine dušice u tim proizvodima doprinosilo je gorčini i aromi mesa, dok su ćufte i hamburgeri s origanom bili pikantniji i ljuti.



### 5.5.3.2. PCA analiza – Analiza glavnih komponenata

Rezultati deskriptivne senzorne analize, u formi senzorne mape, prikazani su na slici 19. Sirovi deskriptivni podaci za osam ispitivanih senzornih karakteristika su, pre primene analize glavnih komponenata (PCA), bili standardizovani (Romano i sar., 2008). Analiza glavnih komponenata je pokazala da su prve dve ekstrahovane komponente dovoljne za tumačenje varijacija kod senzornih ocena datih ispitivanim uzorcima. Vrednosti koeficijenta korelacije između originalnih promenljivih (ispitivanih senzornih karakteristika) i ekstrahovanih glavnih komponenata, prikazane su u tabeli 19. Smatrano je da su ispitivane karakteristike sa koeficijentima korelacije jednakim ili većim od 0,72, u visokoj korelaciji sa odgovarajućom glavnom komponentom (Tabela 20.). Miris i ukus na majčinu dušicu i origano karakterišu PC1, dok miris i ukus na bukovaču, hrskavost i tvrdoća karakterišu PC2. Ocene uzoraka su, nakon svođenja na dvodimenzioni sistem (PC1-PC2), bile podvrgnute hijerarhijskoj klaster analizi, čiji su rezultati prikazani na slici 20. Uzorci su grupisani u tri klastera sa sličnim senzornim svojstvima

Kod sledećih uzoraka sa većim sadržajem majčine dušice: 20TH100, 30TH50OR50, 30TH75OR25 i 30TH100 uočava se intenzivniji miris i ukus ovog začina, dok uzorake sa velikim sadržajem origana 30OR100, 20OR100 i 30TH25OR75, kao i 20TH50OR50 i 20TH25OR50, karakteriše miris i ukus na origano. Miris i ukus bukovače, kao i teksturna svojstva tvrdoća i hrskavost su bili više izraženi kod uzoraka 30TH100 i 20TH75OR25, praćeni uzorkom 20TH25OR75. Rezultati analize glavnih komponenti ukazuju na to da se subjektivni utisak prisustva začina poklapa sa stvarnim sadržajem začina u smeši. Takođe, kraći vremenski tretman uticao je na intenzitet arome začina, pa su tako uzorci sa velikim sadržajem majčine dušice pokazali slabiju aromu začina pri kraćem vremenskom tretmanu.

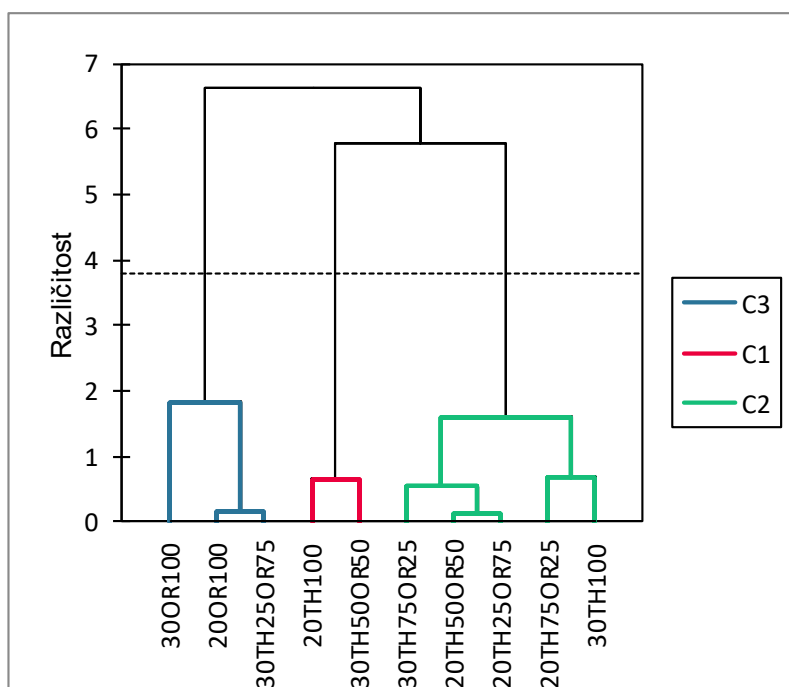


**Slika 19.** Rezultati deskriptivne senzorne analize uzoraka bukovače pripremljenih *sous-vide* kulinarskom metodom sa različitim kombinacijama i količinama dodatih začina i dva vremenska režima, nakon primene analize glavnih komponenata (PCA) na srednje vrednosti standardizovanih ocena intenziteta osam senzornih karakteristika.

Crvenom, plavom i zelenom bojom označeni su uzorci grupisani u klaster u skladu sa rezultatima hijerarhijske klaster analize prikazanim na slici 20. Legenda: *Sous-vide* 20', 100% Majčina dušica (20TH100); *Sous-vide* 20', 75% Majčina dušica, 25% Origan (20TH75OR25); *Sous-vide* 20', 50% Majčina dušica, 50% Origan (20TH50OR50); *Sous-vide* 20', 25% Majčina dušica, 75% Origan (20TH25OR75); *Sous-vide* 20', 100% Origan (20OR100); *Sous-vide* 30', 100% Majčina dušica (30TH100); *Sous-vide* 30', 75% Majčina dušica, 25% Origan (30TH75OR25); *Sous-vide* 30', 50% Majčina dušica, 50% Origan (30TH50OR50); *Sous-vide* 30', 25% Majčina dušica, 75% Origan (30TH25OR75); *Sous-vide* 30', 100% Origan (30OR100).

**Tabela 20.** Korelaciona zavisnost između originalnih promenljivih (ispitivanih senzornih karakteristika) i ekstrahovanih glavnih komponenata kao rezultat analize glavnih komponenata primenjene na rezultate deskriptivne senzorne analize uzoraka bukovače pripremljenih *sous-vide* kulinarskom metodom sa različitim kombinacijama i količinama dodatih začina i dva vremenska režima

Senzorne karakteristike	PC1	PC2
Bukovača (miris)	0.207	0.814
Majčina dušica (miris)	0.896	0.214
Origan (miris)	-0.861	-0.393
Hrskavost	0.275	0.891
Tvrdoća	0.100	0.813
Bukovača (ukus)	0.473	0.761
Majčina dušica (ukus)	0.970	0.071
Origan (ukus)	-0.839	-0.504



**Slika 20.** Dendrogram hijerarhijske klaster analize uzoraka bukovače pripremljenih *sous-vide* kulinarskom metodom sa različitim kombinacijama i količinama dodatih začina i dva vremenska režima, nakon primene analize glavnih komponenata (PCA).

### 5.5.3.3. Karakteristike boje organske bukovače sa dodatkom začinskog bilja

Kontrolni uzorci korišćeni za ovaj deo istraživanja bili su: (i) čista bukovača tretirana *sous-vide* kulinarskom metodom na 60°C tokom 20 minuta (ii) čista bukovača tretirana *sous-vide* kulinarskom metodom na 60°C tokom 30 minuta.

Promene boje na centralnom delu šešira gljive su primetne pod uticajem trajanja *sous-vide* tretmana. Ukupna razlika u boji bila je generalno veća za sve uzorke nakon 30 minuta tretmana. Ipak, boja

himenijuma i ivice šešira gljiva menjale su se suprotno trajanju tretmana. Primećeno je da je centralni deo šešira gljive i parametar braon boje ivice šešira opadao sa dužim vremenom tretmana kod uzoraka sa 100% majčine dušice, dok je ovaj trend bio suprotan kod 100% origana. Takođe, indeks braon i žute boje uzoraka sa većim procentom majčine dušice bio je veći od onih sa većim udelom origana, ukazujući na doprinos majčine dušice jačim nijansama boje.

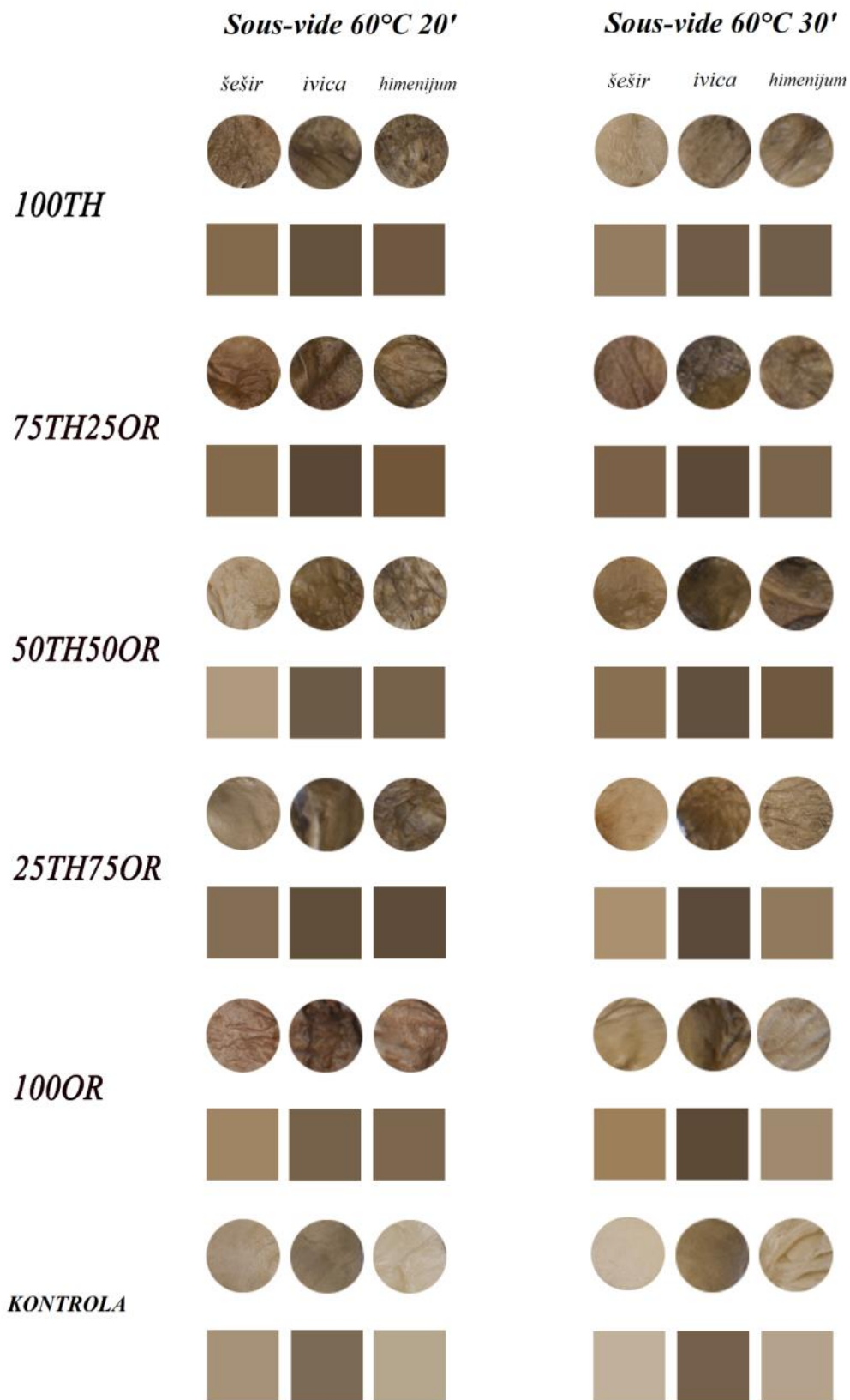
Indeks bele boje pratio je trend braon i žute boje gljiva, ali na suprotan način: kada je indeks braon boje rastao, indeks bele boje je opadao. Promena boje himenijuma gljive generalno je opadala sa dužim vremenom tretmana, sa izuzetkom indeksa bele boje, koji je rastao sa dužim *sous-vide* tretmanom. Ovi podaci takođe sadrže određene nedoslednosti u vezi sa uzorcima 75TH25OR i 25TH75OR za boju šešira gljiva, kao i 50TH50OR za boju himenijuma gljiva. Naime, parametar braon/žute boje raste ili opada sa vremenom bez logične veze sa prethodnom izjavom o uticaju začina na trend promene braon/žute boje povezan sa trajanjem tretmana. Generalno, uzorak sa jednakim procentom oba začina uvek je imao najniži indeks braon boje za tretman trajanja 20 minuta, što dovodi u pitanje određeni uticaj mešanja začina na proces neutralizacije boje (Slika 21. i Tabela 21.).

Druga istraživanja boje proizvoda obuhvatila su i istraživanje esencijalnog ulja origana. Naime, među tri esencijalna ulja bogata fenolima, koja uključuje i esencijalno ulje majčine dušice, sposobnost rastvaranja esencijalnog ulja origana pokazala se najslabijom, što može objasniti slabije bojene karakteristike (Edris i Malone, 2012). Slično tome, intenzitet boje kobasica s dodatkom esencijalnog ulja majčine dušice dobio je više ocene u odnosu na uzorke esencijalnog ulja origana u istraživanju (Viuda-Martos i sar., 2009).

**Tabela 21.** Efekti kombinacije i količine dodatih začina, kao i vremena tretmana na karakteristike boje gljiva (šešir, ivica šešira i himenijum)

<i>Sous-vide</i> na 60°C	100TH	75TH25OR	50TH50OR	25TH75OR	100OR
<b>Karakteristike boje centralnog dela šešira gljive</b>					
<b>Ukupna razlika boje (<math>\Delta E</math>)</b>					
20'	16,27 ± 2,87 <sup>A</sup>	15,93 ± 2,88 <sup>A</sup>	5,07 ± 1,35 <sup>B</sup>	14,79 ± 7,37 <sup>A</sup>	9,59 ± 3,13 <sup>B</sup>
30'	21,73 ± 3,22 <sup>B</sup>	32,66 ± 2,74 <sup>D</sup>	26,35 ± 4,68 <sup>C</sup>	16,03 ± 3,36 <sup>A</sup>	23,86 ± 3,32 <sup>BC</sup>
<b>Indeks braon boje (BI)</b>					
20'	84,17 ± 10,57 <sup>A</sup>	82,21 ± 8,07 <sup>A</sup>	42,83 ± 10,21 <sup>B</sup>	70,03 ± 20,92 <sup>A</sup>	69,28 ± 12,93 <sup>A</sup>
30'	64,35 ± 8,05 <sup>AB</sup>	92,99 ± 16,73 <sup>C</sup>	78,01 ± 11,20 <sup>BC</sup>	61,74 ± 9,33 <sup>A</sup>	84,62 ± 13,36 <sup>C</sup>
<b>Indeks žute boje (YI)</b>					
20'	70,32 ± 6,92 <sup>A</sup>	69,70 ± 5,24 <sup>A</sup>	41,31 ± 8,86 <sup>B</sup>	61,10 ± 14,45 <sup>A</sup>	61,17 ± 9,79 <sup>A</sup>
30'	57,56 ± 6,29 <sup>AB</sup>	74,86 ± 12,02 <sup>C</sup>	67,27 ± 7,34 <sup>BC</sup>	56,71 ± 7,19 <sup>A</sup>	72,56 ± 7,30 <sup>C</sup>
<b>Indeks bele boje (WI)</b>					
20'	41,87 ± 2,72 <sup>A</sup>	42,08 ± 2,81 <sup>A</sup>	59,88 ± 4,03 <sup>C</sup>	44,44 ± 8,65 <sup>AB</sup>	50,44 ± 4,21 <sup>B</sup>
30'	48,46 ± 3,10 <sup>B</sup>	37,86 ± 2,82 <sup>D</sup>	43,89 ± 4,61 <sup>C</sup>	54,41 ± 3,22 <sup>A</sup>	46,49 ± 3,28 <sup>BC</sup>
<b>Karakteristike boje ivice šešira gljive</b>					
<b>Ukupna razlika boje (<math>\Delta E</math>)</b>					
20'	10,81 ± 2,87 <sup>AB</sup>	15,50 ± 4,06 <sup>A</sup>	8,39 ± 4,52 <sup>BC</sup>	13,22 ± 5,30 <sup>AB</sup>	5,50 ± 1,98 <sup>C</sup>
30'	4,86 ± 3,83 <sup>A</sup>	10,68 ± 3,31 <sup>B</sup>	7,43 ± 2,04 <sup>AB</sup>	10,50 ± 3,26 <sup>B</sup>	10,38 ± 3,60 <sup>B</sup>
<b>Indeks braon boje (BI)</b>					
20'	91,90 ± 20,29 <sup>AB</sup>	100,34 ± 30,36 <sup>AB</sup>	72,05 ± 18,32 <sup>A</sup>	101,67 ± 28,37 <sup>B</sup>	75,07 ± 13,09 <sup>AB</sup>
30'	75,25 ± 20,83	98,36 ± 29,34	73,53 ± 15,53	87,17 ± 16,41	100,33 ± 22,45
<b>Indeks žute boje (YI)</b>					
20'	75,62 ± 13,21 <sup>AB</sup>	77,92 ± 17,90 <sup>AB</sup>	61,78 ± 13,78 <sup>A</sup>	80,45 ± 17,33 <sup>B</sup>	65,54 ± 9,28 <sup>AB</sup>
30'	62,74 ± 12,71	76,38 ± 16,97	61,57 ± 11,77	70,82 ± 12,03	78,85 ± 14,24
<b>Indeks bele boje (WI)</b>					
20'	33,32 ± 3,08 <sup>AB</sup>	29,03 ± 4,21 <sup>A</sup>	36,78 ± 4,94 <sup>BC</sup>	31,02 ± 5,09 <sup>A</sup>	39,45 ± 1,94 <sup>C</sup>
30'	37,23 ± 4,95 <sup>A</sup>	29,86 ± 3,54 <sup>B</sup>	33,89 ± 2,45 <sup>AB</sup>	30,30 ± 3,38 <sup>B</sup>	29,84 ± 3,44 <sup>B</sup>
<b>Karakteristike boje himenijuma gljive</b>					
<b>Ukupna razlika boje (<math>\Delta E</math>)</b>					
20'	30,89 ± 2,21 <sup>BC</sup>	32,54 ± 3,51 <sup>CD</sup>	27,15 ± 3,42 <sup>AB</sup>	36,56 ± 3,23 <sup>D</sup>	25,14 ± 3,58 <sup>A</sup>
30'	27,26 ± 3,26 <sup>AB</sup>	24,66 ± 3,50 <sup>B</sup>	29,35 ± 4,18 <sup>A</sup>	17,02 ± 3,39 <sup>C</sup>	9,95 ± 2,15 <sup>D</sup>
<b>Indeks braon boje (BI)</b>					
20'	86,74 ± 15,71 <sup>A</sup>	120,05 ± 26,52 <sup>B</sup>	74,99 ± 14,79 <sup>A</sup>	92,66 ± 23,37 <sup>A</sup>	73,64 ± 12,01 <sup>A</sup>
30'	66,57 ± 6,60 <sup>B</sup>	75,57 ± 14,42 <sup>B</sup>	91,88 ± 17,64 <sup>A</sup>	66,86 ± 5,01 <sup>B</sup>	49,68 ± 10,13 <sup>C</sup>
<b>Indeks žute boje (YI)</b>					
20'	71,36 ± 10,51 <sup>A</sup>	91,39 ± 14,03 <sup>B</sup>	64,68 ± 9,70 <sup>A</sup>	73,78 ± 15,83 <sup>A</sup>	63,31 ± 8,53 <sup>A</sup>
30'	58,23 ± 5,17 <sup>AB</sup>	64,22 ± 9,90 <sup>B</sup>	74,94 ± 11,62 <sup>C</sup>	59,40 ± 3,85 <sup>B</sup>	47,66 ± 8,72 <sup>A</sup>
<b>Indeks bele boje (WI)</b>					
20'	36,06 ± 2,40 <sup>BC</sup>	33,78 ± 3,54 <sup>AB</sup>	39,69 ± 3,42 <sup>CD</sup>	31,11 ± 3,47 <sup>A</sup>	41,52 ± 3,39 <sup>D</sup>
30'	38,46 ± 2,82 <sup>AB</sup>	40,25 ± 3,36 <sup>B</sup>	35,60 ± 3,99 <sup>A</sup>	47,39 ± 3,17 <sup>C</sup>	54,62 ± 2,56 <sup>D</sup>

Srednje vrednosti deset ponavljanja ± standardna devijacija. Srednje vrednosti u istom redu sa različitim velikim slovima su značajno različite ( $p < 0,05$ ). Legenda: 100TH – 100% Majčina dušica; 75TH25OR – 75% Majčina dušica; 25% Origano; 50TH50OR – 50% Majčina dušica; 50% Origano; 25TH75OR – 25% Majčina dušica; 75% Origano; 100OR – 100% Origano. Kontrolni uzorci: *Sous-vide* metoda, bez dodataka začina, 60°20' i 60°30'.



**Slika 21.** Slike i kolor čipovi sa aromatičnim začinima u odnosu na različita vremena sous -vide tretmana (šešir, ivica i himenijum). 100TH—100% majčina dušica; 75TH25OR—75% majčina dušica: 25% origano; 50TH50OR—50% majčina dušica: 50% origano; 25TH75OR—25% majčina dušica: 75% origano; 100OR—100% origano. Kontrolni uzorci: Sous-vide režim, bez dodatka začina, 60°C 20' i 60°C 30'.

#### 5.5.4. Antimikrobna svojstva začinskog bilja i ekstrakata bukovače

S obzirom na problem kontaminacije hrane mikroorganizmima, kao i na činjenicu da su poželjne prirodne metode konzerviranja koje bi mogle produžiti rok trajanja hrane, u evaluaciju je uključena i analiza antimikrobne aktivnosti začina i bukovače. Dok su se dosadašnja istraživanja uglavnom bavila antimikrobnim dejstvom začina u obliku esencijalnih ulja i različitih ekstrakata, kao i njihovim potencijalom interakcije, u ovom radu su analizirana antimikrobna svojstva sirovih vodenih ekstrakata začinskog bilja i organske bukovače. Antimikrobni efekat je ispitan za svaki uzorak primenjen pojedinačno u mikrodilucionoj metodi, ali i za različite kombinacije po dva testirana uzorka, primenom metode šahovske table. Rezultati primenjenog mikrodilucionog testa prikazani su u Tabeli 22. Crni biber imao je najslabiji antimikrobni efekat, sa MIC vrednošću od  $10 \text{ mg mL}^{-1}$  detektovanom samo za *S. aureus*, što je takođe uticalo na njegovo isključenje iz glavnog eksperimenta. S druge strane, nijedan začin nije uticao u primenjenim koncentracijama na *E. coli*, ali bukovača je izazvala inhibitorni efekat pri najvišoj testiranoj koncentraciji ( $80 \text{ mg mL}^{-1}$ ). Za ekstrakte majčine dušice i origana detektovan je određeni antimikrobni potencijal, što je u skladu sa rezultatima Boskovic i sar. (2015), koji su izvestili o MIC vrednostima ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) za esencijalna ulja majčine dušice i origana prema sledećim bakterijama: *Salmonella enteritidis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* i *MRSA*.

MIC koncentracije bile su početne vrednosti za postavku metode šahovske table (eng. checkerboard test). Interakcije između začina međusobno, kao i između začina origana i bukovače, prikazane su kroz rezultate metode šahovske table, koristeći MIC vrednosti kao početne za određivanje opsega koncentracija ekstrakta. Izračunate vrednosti FICI uglavnom su ukazivale na indiferentnu interakciju između dva sastojka. Za neke kombinacije majčine dušice i origana, kao i majčine dušice i bibera, takođe je utvrđen antagonizam, ali bez sinergizma i aditivizma (Tabela 23.).

**Tabela 22.** MIC vrednosti (Minimalna inhibiciona koncentracija) sirovih ekstraktata origana, crnog bibera, majčine dušice i organske bukovače određene su u mikrodilucijskom testu

MIC (mg mL <sup>-1</sup> )	<i>Enterococcus faecalis</i> (ATCC 29219)	<i>Proteus mirabilis</i> (ATCC 12453)	<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923)	<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)
<b>Origano</b> ( <i>Oregano vulgare</i> L.)	10	10	10	n.d.
<b>Crni biber</b> ( <i>Piper nigrum</i> L.)	n.d.	n.d.	10	n.d.
<b>Majčina dušica</b> ( <i>Thymus vulgare</i> L.)	20	20	20	n.d.
<b>Organska bukovača</b> ( <i>Pleurotus ostreatus</i> )	80	n.d.	80	80

n.d. – Nije utvrđeno u primenjenim koncentracijama opseza (do 10 mg mL<sup>-1</sup> za origano i crni biber, 20 mg mL<sup>-1</sup> za majčinu dušicu, 80 mg mL<sup>-1</sup> za bukovaču)

**Tabela 23.** Tip interakcije antimikrobne aktivnosti između začina i gljive *P.ostreatus* u metodi šahovske table (eng. checkerboard assay)

Origano (MIC)	Majčina dušica (MIC)	FICI	Interakcija
<i>P. mirabilis</i> (ATCC 12453)			
4	0,03125	2,0625	Indiferentni efekat
2	2	5	Antagonizam
1	4	8,5	Antagonizam
<i>E. faecalis</i> (ATCC 29219)			
4	0,03125	4,03125	Antagonizam
2	0,5	2,5	Indiferentni efekat
1	2	3	Indiferentni efekat
0,5	4	4,5	Antagonizam
<i>S. aureus</i> (ATCC 25923)			
2	0,03125	2,03125	Indiferentni efekat
1	1	2	Indiferentni efekat
0,03125	2	2,03125	Indiferentni efekat
Origano (MIC)	Crni biber (MIC)	FICI	Interakcija
<i>S. aureus</i> (ATCC 25923)			
2	0,015625	2,015625	Indiferentni efekat
1	1	2	Indiferentni efekat
0,5	2	2,5	Indiferentni efekat
Majčina dušica (MIC)	Crni biber (MIC)	FICI	Interakcija
<i>S. aureus</i> (ATCC 25923)			
4	0,5	4,5	Antagonizam
2	0,015625	2,015625	Indiferentni efekat
1	2	3	Indiferentni efekat
Origano (MIC)	<i>P.ostreatus</i> (MIC)	FICI	Interakcija
<i>E. faecalis</i> (ATCC 29219)			
2	0,0078125	2,0078125	Indiferentni efekat
<i>S. aureus</i> (ATCC 25923)			
2	0,0078125	2,0078125	Indiferentni efekat

Testirane koncentracije prikazane u tabeli izražene su u MIC jedinicama (testirani opseg svake supstance 4MIC - 1/32MIC). Prikazane su samo kombinacije sa najnižim testiranim koncentracijama koje ukazuju na određeni tip interakcije. Vrednosti FICI ukazuju na tip interakcije na sledeći način: sinergija (FICI ≤ 0,5); aditivnost (0,5 < FICI ≤ 1); indiferentni efekat (1 < FICI ≤ 4) i antagonizam (FICI > 4).

### 5.5.5. Antimikrobna svojstva *sous-vide* soka bukovače sa dodatkom začina

Na kraju, mikrodiluciona metoda je primenjena na čistim sokovima dobijenim nakon *sous-vide* obrade uzoraka bukovače pripremljenih sa dodatkom majčine dušice i/ili origana u različitim odnosima. Viša temperatura uticala je na vezivanje vode u gljivama. Nakon hlađenja, bukovače su oslobodile sok i on je bio izdvojen, omogućavajući lako rastvaranje isparljivih jedinjenja začina. Imajući u vidu da su isparljiva jedinjenja zapravo odgovorna za njihov antimikrobni potencijal (Abers i sar., 2021), bilo je poželjno ispitivanje soka dobijenog *sous-vide* metodom zbog njegovog potencijalnog antibakterijskog efekta. Uz ranije primenjene test sojeve (referentni sojevi *E. faecalis*, *S. aureus*, *P. mirabilis* i *E. coli*) u ovaj deo istraživanja su uključeni i dodatni model mikroorganizmi i to: humani izolat *E. faecalis*, meticilin rezistentni *S. aureus* izolat (MRSA soj), humani izolat *E. coli* i referentni soj *S. enteritidis*. Dobijeni rezultati (Tabela 24.) jasno su to potvrdili postojanje antimikrobnog potencijala. Upoređujući efekte *sous-vide* ekstrakata čistog soka sa 100% majčine dušice i 100% origana, može se primetiti da je majčina dušica izazvala intenzivnije efekte, posebno prema *S. aureus* i MRSA. Jedini izuzetak bila je *S. enteritidis*, koja je bila inhibirana ekstraktom sa dodatkom 100% origana u nižim koncentracijama.

**Tabela 24.** MIC vrednosti ekstrakata čistog soka gljive *P.ostreatus* sa začinima određene u mikrodilucionom testu

Mešavina MIC (mg g <sup>-1</sup> )	100TH (80 mg g <sup>-1</sup> majčina a dušica)	75TH25OR (60 mg g <sup>-1</sup> majčina dušica + 20 mg g <sup>-1</sup> origano)	50TH50OR (40 mg g <sup>-1</sup> majčina dušica + 40 mg g <sup>-1</sup> origano)	25TH75OR (20 mg g <sup>-1</sup> majčina dušica + 60 mg g <sup>-1</sup> origano)	100OR (80 mg g <sup>-1</sup> origano)	Ekstrakt čistog soka gljive (kontrola)
<i>P. mirabilis</i> (ATCC 12453)	1/2	1/2	1/2	1/2	1/4	n.d.
<i>S. enteritidis</i> (ATCC 13078)	1/8	1/8	1/8	1/4	1/4	1/2
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)	1/4	1/4	1/4	1/4	1/4	n.d.
<i>E. coli</i> (humani izolat)	n.d.	1/2	1/2	1/4	1/4	n.d.
<i>S. aureus</i> (ATCC 25923)	n.d.	1/2	1/2	1/4	1/16	n.d.
MRSA (humani izolat)	1/4	1/8	1/16	1/16	1/32	n.d.
<i>E. faecalis</i> (ATCC 29219)	1/2	1/2	1/2	1/2	1/2	n.d.
<i>E. faecalis</i> (humani izolat)	1/2	1/2	1/2	1/4	1/4	n.d.

Brojevi u tabeli odnose se na razblaženje čistog soka (100%) *sous-vide* testiranog mikrodilucionom metodom.

n.d. – Nije određeno u primenjenim opsezima koncentracija. Legenda: 100TH – 100% Majčina dušica; 75TH25OR – 75% Majčina dušica: 25% Origano; 50TH50OR – 50% Majčina dušica: 50% Origano; 25TH75OR – 25% Majčina dušica: 75% Origano; 100OR – 100% Origano.



## 6. Zaključak

Nekoliko zaključaka može se izvesti u skladu sa postavljenim hipotezama i ciljevima doktorske disertacije. Gljiva *P. ostreatus* gajena na sledećim otpadima iz prehrambene industrije: komini grožđa, ljusci soje, suncokreta i njihovim mešavinama uz dodatak komercijalnog supstrata pšenične slame, pokazala je poželjne karakteristike u pogledu određenih parametara kvaliteta. Postavljena su dva matematička indeksa kako bi se ocenio ukupni indeks kvaliteta (TQI): svežih plodonosnih tela na osnovu parametara kvaliteta i samih supstratnih mešavina na kojima su gljive gajene na osnovu parametara produktivnosti. Ovo istraživanje potvrdilo je potencijal odabranog matematičkog modela da proceni i uporedi ne samo gljive proizvedene na supstratima različitog sastava tokom veka trajanja, već i parametre produktivnosti tih istih supstrata. Primenom postavljenih modela za izračunavanje ukupnog indeksa kvaliteta dokazana je osnovna hipoteza ovog istraživanja da postoji opravdan razlog korišćenja alternativnih supstrata u gajenju bukovače koji predstavljaju biljni otpad iz neke druge prehrambene proizvodnje.

Pretpostavka da postoji razlika u kvalitetu, biohemijskim i antioksidativnim svojstvima bukovače gajene na supstratu koji sadrži različiti procentualni odnos otpada i slame, dokazana je kroz analizu svežih plodonosna tela gljiva, gde su izuzetan kvalitet pokazali kontrolni uzorak – pšenična slama, uzorci gajeni na supstratima sa ljuskom soje, praćeni uzorkom gajenim na 100% ljusci suncokreta. Ipak, uzorak sa određenim sadržajem komine grožđa, 50P50S, pokazao je značajne kvalitativne karakteristike. Uzorci koji prednjače u ukupnom kvalitetu bile su mešavine koje sadrže samo ljusku soje, kao i one koje osim ljuske soje sadrže još pšeničnu slamu i kombinaciju ljuske suncokreta i pšenične slame. Ipak, na osnovu hemijske karakterizacije, koja nije ušla u proračun indeksa ukupnog kvaliteta, uzorci gajeni na supstratu sa većim sadržajem komine grožđa pokazuju najbolja antioksidativna svojstva i nutritivni sastav, što može doprineti ukupnom kvalitetu i potencijalno je svrstati u kategoriju funkcionalnih proizvoda.

Sledeća pretpostavka bila je da postoji uticaj perioda skladištenja na kvalitet, biohemijska i antioksidativna svojstva bukovače gajene na supstratu koji sadrže različite procentualni odnos otpada i slame. Rezultati hemijske analize ukazuju na značajne promene hemijskog sastava tokom vremena skladištenja, kao što je smanjenje ukupnog sadržaja polisaharida i porast ukupnog sadržaja polifenola i proteina tokom 14. dana skladištenja, dok su svi rezultati testova antioksidativnosti pokazali niže  $EC_{50}$  vrednosti za dan 7., praćene ponovnim rastom nakon 14 dana skladištenja. Ocena ukupnog indeksa kvaliteta (TQI) ukazuje da u ukupnom kvalitetu ipak prednjači kontrolni uzorak (WS), naročito u prvih 7 dana skladištenja. Kod uzorka bukovače gajenog na mešavini koja sadrži sojinu, suncokretovu ljusku i pšeničnu slamu (SBN:SFW:WS) nije došlo do značajnih promena kod ispitivanih svojstava kvaliteta tokom perioda skladištenja od 14 dana. Što se tiče procene rizika, primećen je određen citotoksični i genotoksični potencijal, ali uzorci dobijeni gajenjem na alternativnim supstratima sa analiziranim otpadima izazvali su uporedive odgovore u odnosu na negativnu kontrolu (gljive gajene na čistoj pšeničnoj slami). Tačnije, ekstrakti bukovača gajenih na supstratima sa različitim udelom komine grožđa, testirani samo u nultom danu skladištenja, pokazali su veoma nisku i kontroli sličnu citotoksičnost. Uz to, indeksi selektivnosti su pokazali da su testirane kancerske ćelije osetljivije od normalnih fibroblasta, što se smatra povoljnim svojstvom. S druge strane, kada su u pitanju gljive gajene na otpadu iz industrije ulja, koje su analizirane i u nultom i u 14. danu skladištenja, pokazan je citotoksični efekat uporediv sa efektom kontrolnog uzorka, s tim da je niska citotoksičnost primećena na obe ćelijske linije u nultom danu skladištenja, a pojačanje citotoksičnog efekta sa vremenom skladištenja uočeno samo na ćelijskoj liniji fibroblasta. U slučaju genotoksičnog potencijala ekstrakata, uočeno je odsustvo genotoksičnosti na normalnim fibroblastima (izuzetak je uzorak gajen na čistim ljuskama suncokreta koji je bio genotoksičan samo pri najvećoj testiranoj koncentraciji), dok je snažniji genotoksični efekat dobijen na kancerskim ćelijama kolona. Stoga, rezultati ukazuju da maksimalni

rok trajanja *P. ostreatus*, uz očuvanje ukupnog kvaliteta, ne bi trebalo da prelazi 14 dana. Glavni razlog odbijanja ideje o čuvanju gljiva toliko dugo bio je rezultat citotoksičnosti, koji je pokazao značajno smanjenje vijabilnosti ćelija, posebno normalnih MRC-5 fibroblasta, nakon 14 dana skladištenja. Međutim, potrebna su dalja istraživanja kako bi se precizno odredila dinamika promena u citotoksičnim i genotoksičnim svojstvima i, samim tim, ispravno definisao rok trajanja.

Biološka aktivnost je jedan od ključnih parametara prilikom ocenjivanja novih sirovina za proizvodnju gljiva. Pretpostavka da postoji razlika u biološkoj efikasnosti supstrata koji sadrži različite procentualne odnose otpada i slame dokazana je kroz proračun gde je biološka efikasnost (BE) bila niža u odnosu na kontrolni uzorak za bukovaču gajenu na supstratima sa dodatkom komine grožđa, ali zato viša kada su u pitanju supstrati dobijeni iz industrije ulja. Potpuna evaluacija supstrata često zahteva ekonomsku analizu, posebno kada se teži proizvodnji u velikom obimu. Iako nije sprovedena u ovom radu, naš cilj bio je da demonstriramo mogućnost upravljanja otpadom hrane, što predstavlja ograničenje. U pogledu ukupnog kvaliteta parametara produktivnosti, uzorci sa sadržajem sojine ljuske ostvarili su najbolji rezultat, dok se kontrolni uzorak pokazao kao drastično lošiji. Uprkos ograničenju vremena čuvanja, ukupni rezultati ukazuju na izuzetna svojstva *P. ostreatus*, posebno onih gajenih na otpadu iz industrije ulja, koja po sveukupnom kvalitetu znatno nadmašuju kontrolni uzorak.

Takođe, deo ovog istraživanja potvrdilo je da *sous-vide* kulinarska metoda, kao inovativna opcija u svetu gastronomije, održava stabilnim senzorne i fizičko-hemijske karakteristike kvaliteta tretirane namirnice, čime se potvrđuje pretpostavka da je moguće odrediti parametre kvaliteta bukovače iz standardne proizvodnje koja se razlikuje po metodi kulinarske obrade. Sa idejom da se potencijalno poboljša ukus gljiva i povećaju zdravstvene koristi, dodatak odabranih začina pokazao je povećanu dopadljivost, osim kod gljiva sa većom količinom origana koje su pokazale određene nedostatke. Pretpostavku da kulinarske metode obrade bukovače iz standardne proizvodnje utiču na sveukupnu ocenu kvaliteta potvrdili su rezultati ispitivanja primene *sous-vide* metode, koji su pokazali mogućnost kontrole promena u fizičkim osobinama gljiva podešavanjem uslova tretmana, čime se obezbeđuje predvidivost efekta tretmana. Prvi put je antimikrobni efekat *sous-vide* čistih sokova gljiva ispitivan mikrodilucionom metodom, a dobijeni rezultati ukazali su da začini dodati u vakuumskim kesama u određenim koncentracijama i obrađeni zajedno sa organskim gljivama doprinose značajno antimikrobnom efektu, što daje istraživanju dodatnu važnost.

## 7. LITERATURA

- Abdullah, N., Lau, C. C., & Ismail, S. M. (2016). Potential use of *Lentinus squarrosulus* mushroom as fermenting agent and source of natural antioxidant additive in livestock feed. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96(5), 1459–1466. <https://doi.org/10.1002/jsfa.7242>
- Abers, M., Schroeder, S., Goelz, L., Sulser, A., St. Rose, T., Puchalski, K., Langland, J., (2021). Antimicrobial activity of the volatile substances from essential oils. *BMC Complementary Medicine and Therapies*. 21, 1–14. <https://doi.org/10.1186/s12906-021-03285-3>
- Abou Fayssal, S., Alsanad, M. A., El Sebaaly, Z., Ismail, A. I. H., & Sassine, Y. N. (2020). Valorization of Olive Pruning Residues through Bioconversion into Edible Mushroom *Pleurotus ostreatus* (Jacq. Ex Fr.) P. Kumm. (1871) of Improved Nutritional Value. *Scientifica*, 2020. <https://doi.org/10.1155/2020/3950357>
- Adams, K. R., Niebuhr, S. E., & Dickson, J. S. (2015). Dissolved carbon dioxide and oxygen concentrations in purge of vacuum-packaged pork chops and the relationship to shelf life and

models for estimating microbial populations. *Meat Science*, 110, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2015.06.003>

- Adebayo, E. A., Elkanah, F. A., Afolabi, F. J., Ogundun, O. S., Alabi, T. F., & Oduoye, O. T. (2021). Molecular characterization of most cultivated *Pleurotus* species in sub-western region Nigeria with development of cost effective cultivation protocol on palm oil waste. *Heliyon*, 7(2), e06215. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e06215>
- Aisala, H., Laaksonen, O., Manninen, H., Raittola, A., Hopia, A., & Sandell, M. (2018). Sensory properties of Nordic edible mushrooms. *Food Research International*, 109(January), 526–536. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.04.059>
- Aisala, H., Manninen, H., Laaksonen, T., Linderborg, K. M., Myoda, T., Hopia, A., & Sandell, M. (2020). Linking volatile and non-volatile compounds to sensory profiles and consumer liking of wild edible Nordic mushrooms. *Food Chemistry*, 304, 125403. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125403>
- Akter, M., Halawani, R. F., Aloufi, F. A., Taleb, M. A., Akter, S., & Mahmood, S. (2022). Utilization of Agro-Industrial Wastes for the Production of Quality Oyster Mushrooms. *Sustainability (Switzerland)*, 14(2), 1–10. <https://doi.org/10.3390/su14020994>
- Al-Dalali, S., Li, C., & Xu, B. (2022). Effect of frozen storage on the lipid oxidation, protein oxidation, and flavor profile of marinated raw beef meat. *Food Chemistry*, 376, 131881. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.131881>
- Alzorqi, I., Sudheer, S., Lu, T.-J., & Manickam, S. (2017). Ultrasonically extracted  $\beta$ -d-glucan from artificially cultivated mushroom, characteristic properties and antioxidant activity. *Ultrasonics Sonochemistry*, 35, 531–540. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ulsonch.2016.04.017>
- Araújo, N. L., Avelino, K. V., Halabura, M. I. W., Marim, R. A., Kassem, A. S. S., Linde, G. A., ... do Valle, J. S. (2021). Use of green light to improve the production of lignocellulose-decay enzymes by *Pleurotus* spp. in liquid cultivation. *Enzyme and Microbial Technology*, 149(June), 109860. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2021.109860>
- Ares, G., Parentelli, C., Gámbaro, A., Lareo, C., & Lema, P. (2006). Sensory shelf life of shiitake mushrooms stored under passive modified atmosphere. *Postharvest Biology and Technology*, 41(2), 191–197. <https://doi.org/10.1016/J.POSTHARVBIO.2006.03.013>
- Arnao, M., Cano, A., & Acosta, M. (2001). The hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity. *Food Chemistry*, 73, 239–244. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(00\)00324-1](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(00)00324-1)
- ASTM. (1992). Manual on descriptive analysis testing for sensory evaluation. *Micro & Nano Letters*.
- Avni, S., Ezove, N., Hanani, H., Yadid, I., Karpovsky, M., Hayby, H., ... Danay, O. (2017). Olive mill waste enhances  $\alpha$ -glucan content in the edible mushroom *Pleurotus eryngii*. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(7), 1–11. <https://doi.org/10.3390/ijms18071564>
- Babu, D. R., Pandey, M., & Rao, G. N. (2014). Antioxidant and electrochemical properties of cultivated *Pleurotus* spp. and their sporeless/low sporing mutants. *Journal of Food Science and Technology*, 51(11), 3317–3324. <https://doi.org/10.1007/s13197-012-0822-9>
- Baeva, E., Bleha, R., Lavrova, E., Sushytskyi, L., Čopíková, J., Jablonsky, I., ... Synytsya, A. (2019). Polysaccharides from Basidiocarps of Cultivating Mushroom *Pleurotus ostreatus*: Isolation and Structural Characterization. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 24(15). <https://doi.org/10.3390/molecules24152740>

- Bellettini, M. B., Fiorda, F. A., Maievas, H. A., Teixeira, G. L., Ávila, S., Hornung, P. S., ... Ribani, R. H. (2019). Factors affecting mushroom *Pleurotus* spp. Saudi Journal of Biological Sciences, 26(4), 633–646. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2016.12.005>
- Bezivin, C., Tomasi, S., Lohezic-Le Devehat, F., & Boustie, J. (2003). Cytotoxic activity of some lichen extracts on murine and human cancer cell lines. Phytomedicine : International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology, 10(6–7), 499–503. <https://doi.org/10.1078/094471103322331458>
- Boin, E. A. S. F., Azevedo, C. M. A. M., Nunes, J. M. S. A., & Guerra, M. M. (2016). Consumer Acceptability and Descriptive Characterization of Fresh and Dried King Oyster (*Pleurotus eryngii*) and Hedgehog (*Hydnum repandum*) Mushrooms. Journal of Food Research, 5(4), 55. <https://doi.org/10.5539/jfr.v5n4p55>
- Boskovic, M., Zdravkovic, N., Ivanovic, J., & Janjic, J. (2015). Antimicrobial activity of Thyme (*Tymus vulgaris*) and Oregano (*Origanum vulgare*) essential oils against some food-borne microorganisms. Italian Oral Surgery, 5, 18–21. <https://doi.org/10.1016/j.prof.oo.2015.09.005>
- Bradford, M. M. (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. 254, 248–254.
- Branco, S., Schauster, A., Liao, H. L., & Ruytinx, J. (2022). Mechanisms of stress tolerance and their effects on the ecology and evolution of mycorrhizal fungi. New Phytologist, 235(6), 2158–2175. <https://doi.org/10.1111/nph.18308>
- Bumpus, J. A., Tien, M., Wright, D., & Aust, S. D. (1985). Oxidation of persistent environmental pollutants by a white rot fungus. Science, 228(4706), 1434–1436. <https://doi.org/10.1126/science.3925550>
- Buniel, P. A. S., Winald, H., Scheewe, P., Sanico, C. G., Alima, Z. D., & Demayo, C. G. (2018). Assessing the Genotoxic and Cytotoxic Responses of the H-29 Cancer Cell Lines on the Ethanolic Extracts of the Oyster Mushroom, *Pleurotus Ostreatus* Var. *Florida*. International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research, 9(10), 4201. [https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.9\(10\).4201-09](https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.9(10).4201-09)
- Canalon, P. (1971). Chemical composition of sunflower seed hulls. J Am Oil Chem Soc 48, 629–632. <https://doi.org/10.1007/BF02544577>
- Carey, P. R. (1982). Biochemical Application of Raman and Resonance Raman Spectroscopies. New York: Academic Press.
- Carolina, F. P., AntÃnio, Z. de M. C., Givaldo, R. N., JosÃ©, L. B., Ana, P. T. U., & Elizama, A.-O. (2021). Brewers residues and cocoa pod shells as a substrate for cultivation of *Pleurotus ostreatus* CCIBt 2339 and enzymes production. African Journal of Biotechnology, 20(3), 115–121. <https://doi.org/10.5897/ajb2020.17242>
- Carrasco-Cabrera, C. P., Bell, T. L., & Kertesz, M. A. (2019). Caffeine metabolism during cultivation of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) with spent coffee grounds. Applied Microbiology and Biotechnology, 103(14), 5831–5841. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-09883-z>
- Cayetano-Catarino, M., Bernabé-Villanueva, G., Romero-Flores, A., & Bernabé-González, T. (2020). Three-plant stubble (*Family: Fabaceae*) as a substrate for cultivation of *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kummer., in Mexico. Journal of Applied and Natural Science, 12(2), 156–158. <https://doi.org/10.31018/jans.v12i2.2270>
- Chang, S T, Lau, O. W., & Cho, K. Y. (1981). The cultivation and nutritional value of *Pleurotus sajor-caju* [fungal protein from cotton waste]. European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology (Germany, F.R.). 12, 58-62. <https://doi.org/10.1007/BF00508120>

- Chang, S T, & Miles, P. G. (1989). Edible mushrooms and their cultivation. Boca Raton, USA: CRC Press. 345pp.
- Chang, Shang Tzen, Wu, J. H., Wang, S. Y., Kang, P. L., Yang, N. S., & Shyur, L. F. (2001). Antioxidant activity of extracts from acacia confusa Bark and Heartwood. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(7), 3420–3424. <https://doi.org/10.1021/jf0100907>
- Choi, K. (2004). Shelf cultivation of oyster mushroom with emphasis on substrate fermentation. *Mushroom Growers' Handbook 1: Oyster Mushroom Cultivation* MushWorld.
- Chun, S., Gopal, J., & Muthu, M. (2021). Antioxidant activity of mushroom extracts/polysaccharides —their antiviral properties and plausible antiCOVID-19 properties. *Antioxidants*, 10(12). <https://doi.org/10.3390/antiox10121899>
- Cohen, R., Persky, L., & Hadar, Y. (2002). Biotechnological applications and potential of wood-degrading mushrooms of the genus *Pleurotus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 58(5), 582–594. <https://doi.org/10.1007/s00253-002-0930-y>
- Cvetković, S., Vuletić, S., Vunduk, J., Klaus, A., Mitić-Ćulafić, D., & Nikolić, B. (2022). The role of *Gentiana lutea* extracts in reducing UV-induced DNA damage. *Mutagenesis*. <https://doi.org/10.1093/mutage/geac006>
- da Rosa Guterres, Z., Mantovani, M. S., da Eira, A. F., Ribeiro, L. R., & Jordão, B. Q. (2005). Genotoxic and antigenotoxic effects of organic extracts of mushroom *Agaricus blazei* Murrill on V79 cells. *Genetics and Molecular Biology*, 28(3), 458–463. <https://doi.org/10.1590/s1415-47572005000300022>
- de Aguiar, L. V. B., Sales-Campos, C., Gouvêa, P. R. D. S., Vianez, B. F., Dias, E. S., & Chevreuil, L. R. (2021). Substrate disinfection methods on the production and nutritional composition of a wild oyster mushroom from the amazon. *Ciencia e Agrotecnologia*, 45. <https://doi.org/10.1590/1413-7054202145010321>
- Deepalakshmi, Krishnamoorthy and Sankaran, M. (2014). *Pleurotus ostreatus*: an oyster mushroom with nutritional and medicinal properties. *Journal of Biochemical Technology*, pp. 718--726. *Journal of Biochemical Technology*. [https://doi.org/10.1007/978-1-4020-4585-1\\_845](https://doi.org/10.1007/978-1-4020-4585-1_845)
- Djekic, I., Miloradovic, Z., Djekic, S., & Tomasevic, I. (2019). Household food waste in Serbia – Attitudes, quantities and global warming potential. *Journal of Cleaner Production*, 229, 44–52. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.04.400>
- Djekic, I., Operta, S., Djulancic, N., Lorenzo, J. M., Barba, F. J., Djordjević, V., & Tomasevic, I. (2019). Quantities, environmental footprints and beliefs associated with household food waste in Bosnia and Herzegovina. *Waste Management and Research*, 37(12), 1250–1260. <https://doi.org/10.1177/0734242X19873709>
- Djekic, I., Sanjuán, N., Clemente, G., Jambrak, A. R., Djukić-Vuković, A., Brodnjak, U. V., ... Tonda, A. (2018). Review on environmental models in the food chain - Current status and future perspectives. *Journal of Cleaner Production*, 176, 1012–1025. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2017.11.241>
- Djekic, I., Tomic, N., Bourdoux, S., Spilimbergo, S., Smigic, N., Udovicki, B., ... Rajkovic, A. (2018). Comparison of three types of drying (supercritical CO<sub>2</sub>, air and freeze) on the quality of dried apple – Quality index approach. *Lwt*, 94(November 2017), 64–72. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.04.029>
- Djekic, I., Vunduk, J., Tomašević, I., Kozarski, M., Petrovic, P., Niksic, M., ... Klaus, A. (2017). Total quality index of *Agaricus bisporus* mushrooms packed in modified atmosphere. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97(9), 3013–3021. <https://doi.org/10.1002/jsfa.8142>

- Doroški, A., Klaus, A., Kozarski, M., Nikolić, B., Vunduk, J., Lazić V., Djekic, I. (2021). Impact of grape pomace as a cultivation substrate on the *Pleurotus ostreatus* chemical and biological properties. *APTEFF*, 52, 1-273. <https://doi.org/10.2298/APT2152025D>
- Doroški, A., Klaus, A., Kozarski, M., Cvetković, S., Nikolić, B., Jakovljević, D., Tomasevic, I., Vunduk, J., Lazić, V., Djekic, I. (2021). The influence of grape pomace substrate on quality characterization of *Pleurotus ostreatus*—Total quality index approach. *Journal of Food Processing and Preservation*, 45(1), 1–15. <https://doi.org/10.1111/jfpp.15096>
- Doroški, A., Klaus, A., Režek Jambrak, A., & Djekic, I. (2022). Food Waste Originated Material as an Alternative Substrate Used for the Cultivation of Oyster Mushroom (*Pleurotus ostreatus*): A Review. *Sustainability (Switzerland)*, 14(19). <https://doi.org/10.3390/su141912509>
- Doulgeraki, A. I., Ercolini, D., Villani, F., & Nychas, G. J. E. (2012). Spoilage microbiota associated to the storage of raw meat in different conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 157(2), 130–141. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.05.020>
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., & Smith, F. (1956). Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. 350–356. <https://doi.org/10.1021/ac60111a017>
- Economou, C. N., Diamantopoulou, P. A., & Philippoussis, A. N. (2017). Valorization of spent oyster mushroom substrate and laccase recovery through successive solid state cultivation of *Pleurotus*, *Ganoderma*, and *Lentinula* strains. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101(12), 5213–5222. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8251-3>
- Economou, C. N., Economou, C. N., Philippoussis, A. N., & Diamantopoulou, P. A. (2020). Spent mushroom substrate for a second cultivation cycle of *Pleurotus* mushrooms and dephenolization of agro-industrial wastewaters. *FEMS Microbiology Letters*, 367(8), 1–10. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnaa060>
- Edris, A. E., & Malone, C. F. R. (2012). Preferential solubilization behaviours and stability of some phenolic-bearing essential oils formulated in different microemulsion systems. *International Journal of Cosmetic Science*, 34(5), 441–450. <https://doi.org/10.1111/j.1468-2494.2012.00737.x>
- Ekanayake, P. M., Park, G. T., Lee, Y. D., Kim, S. J., Jeong, S. C., & Lee, J. (2005). Antioxidant potential of eel (*Anguilla Japonica* and *Conger Myriaster*) flesh and skin. *Journal of Food Lipids*, 12(1), 34–47. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4522.2005.00004.x>
- El-Ramady, H., Abdalla, N., Fawzy, Z., Badgar, K., Llanaj, X., Törös, G., ... Prokisch, J. (2022). Green Biotechnology of Oyster Mushroom (*Pleurotus ostreatus* L.): A Sustainable Strategy for Myco-Remediation and Bio-Fermentation. *Sustainability (Switzerland)*, 14(6). <https://doi.org/10.3390/su14063667>
- Elisashvili, V. I., Kachlishvili, E. T., & Wasser, S. P. (2009). Carbon and nitrogen source effects on basidiomycetes exopolysaccharide production. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 45(5), 531–535. <https://doi.org/10.1134/S0003683809050135>
- Everette, J. D., Bryant, Q. M., Green, A. M., Abbey, Y. A., Wangila, G. W., & Walker, R. B. (2010). Thorough study of reactivity of various compound classes toward the Folin-Ciocalteu reagent. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(14), 8139–8144. <https://doi.org/10.1021/jf1005935>
- FAO. (2024). FAOSTAT database. URL <http://faostat3.fao.org/home/E> (pristupljeno 04.01.2024.)
- Fernandes, Â., Barreira, J. C. M., Antonio, A. L., Santos, P. M. P., Martins, A., Oliveira, M. B. P. P., & Ferreira, I. C. F. R. (2013). Study of chemical changes and antioxidant activity variation induced by gamma-irradiation on wild mushrooms: Comparative study through principal

component analysis. *Food Research International*, 54(1), 18–25.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.06.011>

- Ferreira da Silva, I., Rodrigues da Luz, J. M., Oliveira, S. F., Humberto de Queiroz, J., & Megumi Kasuya, M. C. (2019). High-yield cellulase and LiP production after SSF of agricultural wastes by *Pleurotus ostreatus* using different surfactants. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 22, 101428. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101428>
- Finotti, E., Bersani, A. M., & Bersani, E. (2007). Total quality indexes for extra-virgin olive oils. *Journal of Food Quality*, 30(6), 911–931. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4557.2007.00159.x>
- Floegel, A., Kim, D., Chung, S., Koo, S. I., & Chun, O. K. (2011). Journal of Food Composition and Analysis Comparison of ABTS / DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods §. *Journal of Food Composition and Analysis*, 24(7), 1043–1048. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2011.01.008>
- Fontes Vieira, P. A., Gontijo, D. C., Vieira, B. C., Fontes, E. A. F., Assunção, L. S. de, Leite, J. P. V., ... Kasuya, M. C. M. (2013). Antioxidant activities, total phenolics and metal contents in *Pleurotus ostreatus* mushrooms enriched with iron, zinc or lithium. *LWT - Food Science and Technology*, 54(2), 421–425. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2013.06.016>
- Frankel, E. N., & Meyer, A. S. (2000). The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, Vol. 80, pp. 1925–1941. [https://doi.org/10.1002/1097-0010\(200010\)80:13<1925::AID-JSFA714>3.0.CO;2-4](https://doi.org/10.1002/1097-0010(200010)80:13<1925::AID-JSFA714>3.0.CO;2-4)
- Fufa, B. K., Tadesse, B. A., & Tulu, M. M. (2021). Cultivation of *Pleurotus ostreatus* on Agricultural Wastes and Their Combination. *International Journal of Agronomy*, 2021. <https://doi.org/10.1155/2021/1465597>
- Gao, M., Feng, L., & Jiang, T. (2014). Browning inhibition and quality preservation of button mushroom (*Agaricus bisporus*) by essential oils fumigation treatment. *Food Chemistry*, 149, 107–113. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.10.073>
- Gąsecka, M., Mleczek, M., Siwulski, M., & Niedzielski, P. (2016). Phenolic composition and antioxidant properties of *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus eryngii* enriched with selenium and zinc. *European Food Research and Technology*, 242(5), 723–732. <https://doi.org/10.1007/s00217-015-2580-1>
- Gowthaman, M. K., Krishna, C., & Moo-Young, M. (2001). Fungal solid state fermentation - an overview. *Applied Mycology and Biotechnology*, 1(C), 305–352. [https://doi.org/10.1016/S1874-5334\(01\)80014-9](https://doi.org/10.1016/S1874-5334(01)80014-9)
- Grimm, D., & Wösten, H. A. B. (2018). Mushroom cultivation in the circular economy. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(18), 7795–7803. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9226-8>
- Gutiérrez, A., Prieto, A., & Martínez, A. T. (1996). Structural characterization of extracellular polysaccharides produced by fungi from the genus *Pleurotus*. *Carbohydrate Research*, 281(1), 143–154. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0008-6215\(95\)00342-8](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0008-6215(95)00342-8)
- Harki, E., Talou, T., & Dargent, R. (1997). Purification, characterisation and analysis of melanin extracted from *Tuber melanosporum* Vitt. *Food Chemistry*, 58(1), 69–73. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(96\)00215-4](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0308-8146(96)00215-4)
- Hayes, D. P. (2007). Nutritional hormesis. *European Journal of Clinical Nutrition*, 61(2), 147–159. <https://doi.org/10.1038/sj.ejcn.1602507>
- Heilmann, C. J., Sorgo, A. G., Mohammadi, S., Sosinska, G. J., de Koster, C. G., Brul, S., ... Klis, F. M. (2013). Surface stress induces a conserved cell wall stress response in the pathogenic

fungus *Candida albicans*. Eukaryotic Cell, 12(2), 254–264. <https://doi.org/10.1128/EC.00278-12>

- Holtzapple, M. T. (2003). HEMICELLULOSES. In B. Caballero (Ed.), Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition (Second Edition) (Second Edi, pp. 3060–3071). Oxford: Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B0-12-227055-X/00589-7>
- Horn, R. A., & Johnson, C. R. (1985). Matrix Analysis. In Matrix Analysis. <https://doi.org/10.1017/cbo9780511810817>
- Huang, S. J., Lin, C. P., & Tsai, S. Y. (2015). Vitamin D2 content and antioxidant properties of fruit body and mycelia of edible mushrooms by UV-B irradiation. Journal of Food Composition and Analysis, 42, 38–45. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2015.02.005>
- Huang, W., Chufo Wachemo, A., Yuan, H., & Li, X. (2019). Full utilization of nutrients in rice straw by integrating mushroom cultivation, biogas production, and fertilizer use. International Journal of Agricultural and Biological Engineering, 12(4), 174–183. <https://doi.org/10.25165/j.ijabe.20191204.4658>
- ISO. (1999). ISO 6888-1:1999. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of coagulase-positive staphylococci (*Staphylococcus aureus* and other species) – Part 1: Technique using Baird-Parker agar medium. Geneva, Switzerland: International Organization for Standardization.
- ISO. (2001). ISO 17410:2001. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of psychrotrophic microorganisms. Geneva, Switzerland: International Organization for Standardization.
- ISO. (2004a). ISO 7937:2004. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of *Clostridium perfringens* – Colony-count technique. Geneva, Switzerland: International Organization for Standardization.
- ISO. (2004b). ISO 4120:2004. Sensory analysis-Methodology-Triangle test. International Organization for Standardization Geneva.
- ISO. (2004c). i ISO 16820: 2004. Sensory Analysis–Methodology–Sequential Analysis. International Organization for Standardization Geneva.
- ISO. (2008). ISO 21527-1:2008. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of yeasts and moulds – Part 1. Colony count technique in products with water activity greater than 0,95. Geneva, Switzerland: International Organization for Standardization.
- ISO. (2009). ISO 21528-2:2009. Microbiology of the food chain – Horizontal method for the detection and enumeration of *Enterobacteriaceae* – Part 2. Colony-count technique. Geneva, Switzerland: International Organization for Standardization.
- ISO. (2013). ISO 4833-2:2013. Microbiology of the food chain – Horizontal method for the enumeration of microorganisms – Part 2: Colony count at 30 degrees C by the surface plating technique. Geneva, Switzerland: International Organization for Standardization.
- ISO. (2017). ISO 6579-1:2017. Microbiology of the food chain – Horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of *Salmonella* – Part 1: Detection of *Salmonella* spp. Geneva, Switzerland: International Organization for Standardization.
- ISO. (2018). ISO 16649-1:2018. Microbiology of the food chain – Horizontal method for the enumeration of beta-glucuronidase-positive *Escherichia coli* – Part 1. Colony-count technique at 44 degrees C using membranes and 5-bromo-4-chloro-3-indolyl beta-D-glucuronide. Geneva, Switzerland: International Organization for Standardization.



- Islam W, R. A. (2017). Yield and biological efficiency of *Pleurotus ostreatus* (Jacq. Fr.) cultivated upon various weeds and agricultural wastes. *Pakistan Journal of Weed Science Research*, 23(3), 271–279.
- Iwuagwu, M., Nwaukwa, D., & Nwaru, C. (2020). Use of Different Agro-wastes in the Cultivation of *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) Kummer. *Journal of Bioresource Management*, 7(2), 29–38. <https://doi.org/10.35691/jbm.0202.0129>
- Jafri, M., Jha, A., Bunkar, D. S., & Ram, R. C. (2013). Quality retention of oyster mushrooms (*Pleurotus florida*) by a combination of chemical treatments and modified atmosphere packaging. *Postharvest Biology and Technology*, 76, 112–118. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2012.10.002>
- Jolivet, S., Arpin, N., Wichers, H. J., & Pellon, G. (1998). *Agaricus bisporus* browning: A review. *Mycological Research*, 102(12), 1459–1483. <https://doi.org/10.1017/S0953756298006248>
- Kačuráková, M., Capek, P., Sasinková, V., Wellner, N., & Ebringerová, A. (2000). FT-IR study of plant cell wall model compounds: pectic polysaccharides and hemicelluloses. *Carbohydrate Polymers*, 43(2), 195–203. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(00\)00151-X](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0144-8617(00)00151-X)
- Kalač, P. (2013). A review of chemical composition and nutritional value of wild-growing and cultivated mushrooms. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93(2), 209–218. <https://doi.org/10.1002/jsfa.5960>
- Karowe, D. N., & Grubb, C. (2011). Elevated CO<sub>2</sub> Increases Constitutive Phenolics and Trichomes, but Decreases Inducibility of Phenolics in *Brassica rapa* (*Brassicaceae*). *Journal of Chemical Ecology*, 37(12), 1332–1340. <https://doi.org/10.1007/s10886-011-0044-z>
- Khaskheli, A. A., Khaskheli, S. G., Liu, Y., Sheikh, S. A., Wang, Y.-F., Soomro, A. H., ... Huang, W. (2017). Analysis of Physicochemical, Antioxidant Properties and Sensory Characteristic of Shiitake Mushroom Pickles. *Journal of Food and Nutrition Research*, 5(8), 562–568. <https://doi.org/10.12691/jfnr-5-8-5>
- Kim, D.-O., Lee, K. W., Lee, H. J., & Lee, C. Y. (2002). Vitamin C Equivalent Antioxidant Capacity (VCEAC) of Phenolic Phytochemicals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(13), 3713–3717. <https://doi.org/10.1021/jf020071c>
- Kim, M. Y., Chung, M., Lee, S. J., Ahn, J. K., Kim, E. H., Kim, M. J., ... Song, H. K. (2009). Comparison of free amino acid, carbohydrates concentrations in Korean edible and medicinal mushrooms. *Food Chemistry*, 113(2), 386–393. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.07.045>
- Klaus, A., Wan-Mohtar, W. A. A. Q. I., Nikolić, B., Cvetković, S., & Vunduk, J. (2021). Pink oyster mushroom *Pleurotus flabellatus* mycelium produced by an airlift bioreactor—the evidence of potent in vitro biological activities. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 37(1), 17. <https://doi.org/10.1007/s11274-020-02980-6>
- Ko, W. C., Liu, W. C., Tsang, Y. T., & Hsieh, C. W. (2007). Kinetics of winter mushrooms (*Flammulina velutipes*) microstructure and quality changes during thermal processing. *Journal of Food Engineering*, 81(3), 587–598. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2006.12.009>
- Kotwaliwale, N., Bakane, P., & Verma, A. (2007). Changes in textural and optical properties of oyster mushroom during hot air drying. *Journal of Food Engineering*, 78(4), 1207–1211. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2005.12.033>
- Koutrotsios, G., Kalogeropoulos, N., Kaliora, A. C., & Zervakis, G. I. (2018). Toward an Increased Functionality in Oyster (*Pleurotus*) Mushrooms Produced on Grape Marc or Olive Mill Wastes Serving as Sources of Bioactive Compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(24), 5971–5983. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b01532>

- Koutrotsios, G., Patsou, M., Mitsou, E. K., Bekiaris, G., Kotsou, M., Tarantilis, P. A., ... Zervakis, G. I. (2019). Valorization of olive by-products as substrates for the cultivation of *Ganoderma lucidum* and *Pleurotus ostreatus* mushrooms with enhanced functional and prebiotic properties. *Catalysts*, 9(6). <https://doi.org/10.3390/catal9060537>
- Kozarski, M., Klaus, A., Jakovljević, D., Todorović, N., Abd, W., & Qadr, A. (2019). *Ganoderma lucidum* as a cosmeceutical: antiradical potential and inhibitory effect on hyperpigmentation and skin extracellular matrix degradation enzymes. *Archives of Biological Sciences*. 71(2), 253–264. <https://doi.org/10.2298/ABS181217007K>
- Kozarski, M., Klaus, A., & Niksic, M. (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(1-2), 144-153. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2012.02.004>
- Kozarski, M., Klaus, A., Niksic, M., Jakovljevic, D., Helsper, J. P. F. G., & Griensven, L. J. L. D. Van. (2011). Antioxidative and immunomodulating activities of polysaccharide extracts of the medicinal mushrooms *Agaricus bisporus*, *Agaricus brasiliensis*, *Ganoderma lucidum* and *Phellinus linteus*. *Food Chemistry*, 129(4), 1667–1675. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.06.029>
- Kulkarni, S. S., Nene, S. N., & Joshi, K. S. (2020). A comparative study of production of hydrophobin like proteins (HYD-LPs) in submerged liquid and solid state fermentation from white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 23(August 2019). <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101440>
- Kumla, J., Suwannarach, N., Sujarit, K., Penkhrue, W., Kakumyan, P., Jatuwong, K., ... Lumyong, S. (2020). Cultivation of Mushrooms and Their Lignocellulolytic Enzyme Production Through the Utilization of Agro-Industrial Waste. *Molecules*, 25(12). <https://doi.org/10.3390/molecules25122811>
- Kurtzman, J. (1997). Nutrition from mushrooms, understanding and reconciling available. *Mycoscience*, 38(2), 247–253. <https://doi.org/10.1007/bf02460860>
- Lam, Y. S., & Okello, E. J. (2015). Determination of Lovastatin,  $\beta$ -glucan, Total Polyphenols, and Antioxidant Activity in Raw and Processed Oyster Culinary-Medicinal Mushroom, *Pleurotus ostreatus* (Higher Basidiomycetes). *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 17(2), 117–128. <https://doi.org/10.1615/intjmedmushrooms.v17.i2.30>
- Larkin, P. J. (2011). *Infrared and Raman spectroscopy principles and spectral interpretation*. Elsevier.
- Li, Q., Zhang, H. H., Claver, I. P., Zhu, K. X., Peng, W., & Zhou, H. M. (2011). Effect of different cooking methods on the flavour constituents of mushroom (*Agaricus bisporus*) soup. *International Journal of Food Science and Technology*, 46(5), 1100–1108. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2011.02592.x>
- Li, R., Zheng, Q., Lu, J., Zou, Y., Lin, J., Guo, L., ... Xing, Z. (2021). Chemical composition and deterioration mechanism of *Pleurotus tuoliensis* during postharvest storage. *Food Chemistry*, 338, 127731. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127731>
- Li, Y., Ishikawa, Y., Satake, T., Kitazawa, H., Qiu, X., & Rungchang, S. (2014). Effect of active modified atmosphere packaging with different initial gas compositions on nutritional compounds of shiitake mushrooms (*Lentinus edodes*). *Postharvest Biology and Technology*, 92, 107–113. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2013.12.017>
- Liu, J., Wu, Y. chun, Kan, J., Wang, Y., & Jin, C. hai. (2013). Changes in reactive oxygen species production and antioxidant enzyme activity of *Agaricus bisporus* harvested at different stages

- of maturity. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93(9), 2201–2206. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6027>
- Liu, Z., Wang, X., Zhu, J., & Wang, J. (2010). Effect of high oxygen modified atmosphere on post-harvest physiology and sensorial qualities of mushroom. *International Journal of Food Science & Technology*, 45(6), 1097–1103. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2010.02199.x>
- Lowor, S. T., & Ofori, E. (2018). Evaluation of Cashew Pulp and Shell, Kola, Cocoa and Coffee Husk as Substrates for the Cultivation of *Pleurotus ostreatus*. *Journal of Advances in Biology & Biotechnology*, 19(3), 1–10. <https://doi.org/10.9734/jabb/2018/24346>
- Ma, N. L., Khoo, S. C., Peng, W., Ng, C. M., Teh, C. H., Park, Y. K., & Lam, S. S. (2020). Green application and toxic risk of used diaper and food waste as growth substitute for sustainable cultivation of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*). *Journal of Cleaner Production*, 268, 122272. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.122272>
- Machado, A. R. G., Teixeira, M. F. S., de Souza Kirsch, L., Campelo, M. da C. L., & de Aguiar Oliveira, I. M. (2016). Nutritional value and proteases of *Lentinus citrinus* produced by solid state fermentation of lignocellulosic waste from tropical region. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 23(5), 621–627. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2015.07.002>
- Mahmoud, S. S., & Torchilin, V. P. (2013). Hormetic/Cytotoxic Effects of *Nigella sativa* Seed Alcoholic and Aqueous Extracts on MCF-7 Breast Cancer Cells Alone or in Combination with Doxorubicin. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 66(3), 451–460. <https://doi.org/10.1007/s12013-012-9493-4>
- Mathlouthi, M., & Koenig, J. L. (1987). Vibrational Spectra of Carbohydrates. *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, 44, 7-89. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0065-2318\(08\)60077-3](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0065-2318(08)60077-3)
- Mattila, P., Salo-Väänänen, P., Könkö, K., Aro, H., & Jalava, T. (2002). Basic composition and amino acid contents of mushrooms cultivated in Finland. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(22), 6419–6422. <https://doi.org/10.1021/jf020608m>
- Meetoo, D., McGovern, P., & Safadi, R. (2007). An epidemiological overview of diabetes across the world. *British Journal of Nursing*, 16(16), 1002–1007. <https://doi.org/10.12968/bjon.2007.16.16.27079>
- Melanouri, E. M., Dedousi, M., & Diamantopoulou, P. (2022a). Cultivating *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus eryngii* mushroom strains on agro-industrial residues in solid-state fermentation. Part I: Screening for growth, endoglucanase, laccase and biomass production in the colonization phase. *Carbon Resources Conversion*, 5(1), 61–70. <https://doi.org/10.1016/j.crcon.2021.12.004>
- Melanouri, E. M., Dedousi, M., & Diamantopoulou, P. (2022b). Cultivating *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus eryngii* mushroom strains on agro-industrial residues in solid-state fermentation. Part II: Effect on productivity and quality of carposomes. *Carbon Resources Conversion*, 5(1), 52–60. <https://doi.org/10.1016/j.crcon.2021.12.005>
- Mertens, D. (1992). Critical conditions in determining detergent fibers. *Proceedings of the Forage Analysis Workshop*, C1--C8.
- Miles, P. G., & Chang, S.-T. (1997). *Mushroom Biology*. WORLD SCIENTIFIC. <https://doi.org/10.1142/3296>
- Milovanovic, B., Djekic, I., Miocinovic, J., Solowiej, B. G., Lorenzo, J. M., Barba, F. J., & Tomasevic, I. (2021). Colour assessment of milk and milk products using computer vision system and colorimeter. *International Dairy Journal*, 105084. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2021.105084>

- Miranda, M., Vega-Gálvez, A., López, J., Parada, G., Sanders, M., Aranda, M., ... Di Scala, K. (2010). Impact of air-drying temperature on nutritional properties, total phenolic content and antioxidant capacity of quinoa seeds (*Chenopodium quinoa* Willd.). *Industrial Crops and Products*, 32(3), 258–263. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2010.04.019>
- Misharina, T. A., Mukhutdinova, S. M., Zharikova, G. G., Terenina, M. B., Krikunova, N. I., & Medvedeva, I. B. (2009). The composition of volatile components of dry cepe and oyster mushroom. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 45(5), 544–549. <https://doi.org/10.1134/S0003683809050159>
- Møller, P., Azqueta, A., Boutet-Robinet, E., Koppen, G., Bonassi, S., Milić, M., ... Langie, S. A. S. (2020). Minimum Information for Reporting on the Comet Assay (MIRCA): recommendations for describing comet assay procedures and results. *Nature Protocols*, 15(12), 3817–3826. <https://doi.org/10.1038/s41596-020-0398-1>
- Mondal, S., Rehana, M., Noman, M., & Adhikary, S. (2011). Comparative study on growth and yield performance of oyster mushroom (*Pleurotus florida*) on different substrates. *Journal of the Bangladesh Agricultural University*, 8. <https://doi.org/10.3329/jbau.v8i2.7928>
- Morone, P., Papendiek, F., & Tartiu, V. E. (2017). Food waste reduction and valorisation: Sustainability assessment and policy analysis. *Food Waste Reduction and Valorisation: Sustainability Assessment and Policy Analysis*, 1–327. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-50088-1>
- Myronycheva, O., Bandura, I., Bisko, N., Gryganskyi, A. P., & Karlsson, O. (2017). Assessment of the growth and fruiting of 19 oyster mushroom strains for indoor cultivation on lignocellulosic wastes. *BioResources*, 12(3), 4606–4626. <https://doi.org/10.15376/biores.12.3.4606-4626>
- Nam, W. L., Su, M. H., Phang, X. Y., Chong, M. Y., Liew, R. K., Ma, N. L., & Lam, S. S. (2017). Production of bio-fertilizer from microwave vacuum pyrolysis of waste palm shell for cultivation of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*). *E3S Web of Conferences*, 22. <https://doi.org/10.1051/e3sconf/20172200122>
- Naraian, R., Sahu, R. K., Kumar, S., Garg, S. K., Singh, C. S., & Kanaujia, R. S. (2009). Influence of different nitrogen rich supplements during cultivation of *Pleurotus florida* on corn cob substrate. *Environmentalist*, 29(1), 1–7. <https://doi.org/10.1007/s10669-008-9174-4>
- Narváez, L., Bolaños, A. C., Chaurra, A., & Escobar, O. Z. (2021). Changes in micronutrients and physical properties during the growth of *Lentinula edodes* and *Pleurotus ostreatus* in a compost based on sugarcane bagasse agricultural waste. *Chilean Journal of Agricultural and Animal Sciences*, 37(3), 301–312. <https://doi.org/10.29393/CHJAAS37-31CMLO40031>
- Nesto, R. W. (2008). LDL cholesterol lowering in type diabetes: What is the optimum approach? *Clinical Diabetes*, 26(1), 8–13. <https://doi.org/10.2337/diaclin.26.1.8>
- Nguyen, T. M., & Ranamukhaarachchi, S. L. (2020). Effect of different culture media, grain sources and alternate substrates on the mycelial growth of *Pleurotus eryngii* and *Pleurotus ostreatus*. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 23(3), 223–230. <https://doi.org/10.3923/pjbs.2020.223.230>
- Nikolić, B., Vasiljević, B., Ćirić, A., Mitić-Ćulafić, D., Cvetković, S., Džamić, A., & Knežević-Vukčević, J. (2019). Bioactivity of *Juniperus communis* essential oil and post-distillation waste: Assessment of selective toxicity against food contaminants. *Archives of Biological Sciences*, 71(2), 235–244. <https://doi.org/10.2298/ABS181217005N>
- Nketia, S., Buckman, E. S., Dzomeku, M., & Akonor, P. T. (2020). Effect of processing and storage on physical and texture qualities of oyster mushrooms canned in different media. *Scientific African*, 9, e00501. <https://doi.org/10.1016/j.sciaf.2020.e00501>

- Nwanze, P. I., Khan, A. U., Ameh, J. B., & Umoh, V. J. (2005). The effect of the interaction of various spawn grains with different culture medium on carpophore dry weights and stipe and pileus diameters of *Lentinus squarrosulus* (Mont.) Singer. *African Journal of Biotechnology*, 4(7), 615–619. <https://doi.org/10.5897/AJB2005.000-3112>
- Omoni, V. T., Ibeto, C. N., Lag-Brotons, A. J., Bankole, P. O., & Semple, K. T. (2022). Impact of lignocellulosic waste-immobilised white-rot fungi on enhancing the development of 14C-phenanthrene catabolism in soil. *Science of the Total Environment*, 811, 152243. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.152243>
- Ortega, G. M., Martínez, E. O., Betancourt, D., González, A. E., & Otero, M. A. (1992). Bioconversion of sugar cane crop residues with white-rot fungi *Pleurotus* sp. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 8(4), 402–405. <https://doi.org/10.1007/BF01198754>
- Oyetayo, O. V., & Ariyo, O. O. (2013). Micro and Macronutrient Properties of *Pleurotus ostreatus* (Jacq : Fries) Cultivated on Different Wood Substrates. *Jordan Journal of Biological Sciences*, 6(3), 223–226. <https://doi.org/10.12816/0001537>
- Oz, A. T., Ulukanli, Z., Bozok, F., & Baktemur, G. (2015). The postharvest quality, sensory and shelf life of *Agaricus bisporus* in active map. *Journal of Food Processing and Preservation*, 39(1), 100–106. <https://doi.org/10.1111/jfpp.12301>
- Parmar, I., & Rupasinghe, H. P. V. (2013). Bio-conversion of apple pomace into ethanol and acetic acid: Enzymatic hydrolysis and fermentation. *Bioresource Technology*, 130, 613–620. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.12.084>
- Pathare, P. B., Opara, U. L., & Al-Said, F. A. J. (2013). Colour Measurement and Analysis in Fresh and Processed Foods: A Review. *Food and Bioprocess Technology*, 6(1), 36–60. <https://doi.org/10.1007/s11947-012-0867-9>
- Pereira, G. S., Cipriani, M., Wisbeck, E., Souza, O., Strapazzon, J. O., & Gern, R. M. M. (2017). Onion juice waste for production of *Pleurotus sajor-caju* and pectinases. *Food and Bioproducts Processing*, 106, 11–18. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2017.08.006>
- Perveen, S., & Al-Taweel, A. M. (2017). Phenolic Compounds from the Natural Sources and Their Cytotoxicity. In M. Soto-Hernandez, M. Palma-Tenango, & M. del Rosario Garcia-Mateos (Eds.), *Phenolic Compounds*. Rijeka: IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/66898>
- Pfaltzgraff, L. A., De Bruyn, M., Cooper, E. C., Budarin, V., & Clark, J. H. (2013). Food waste biomass: A resource for high-value chemicals. *Green Chemistry*, 15(2), 307–314. <https://doi.org/10.1039/c2gc36978h>
- Philippidis, G., Sartori, M., Ferrari, E., & M'Barek, R. (2019). Waste not, want not: A bio-economic impact assessment of household food waste reductions in the EU. *Resources, Conservation and Recycling*, 146(April), 514–522. <https://doi.org/10.1016/j.resconrec.2019.04.016>
- Politowicz, J., Lech, K., Lipan, L., Figiel, A., & Carbonell-Barrachina, Á. A. (2018). Volatile composition and sensory profile of shiitake mushrooms as affected by drying method. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 98(4), 1511–1521. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/jsfa.8622>
- Puttaraju, N. G., Venkateshaiah, S. U., Dharmesh, S. M., Urs, S. M. N., & Somasundaram, R. (2006). Antioxidant activity of indigenous edible mushrooms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(26), 9764–9772. <https://doi.org/10.1021/jf0615707>
- Qin, P., Wang, T., & Luo, Y. (2022). A review on plant-based proteins from soybean: Health benefits and soy product development. *Journal of Agriculture and Food Research*, 7, 100265. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jafr.2021.100265>

- Radünz, M., Mota Camargo, T., Santos Hackbart, H. C. dos, Inchauspe Correa Alves, P., Radünz, A. L., Avila Gandra, E., & da Rosa Zavareze, E. (2021). Chemical composition and in vitro antioxidant and antihyperglycemic activities of clove, thyme, oregano, and sweet orange essential oils. *Lwt*, 138(August 2020). <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110632>
- Radzki, W., Ziaja-Sołtys, M., Nowak, J., Rzymowska, J., Topolska, J., Sławińska, A., ... Kuczumow, A. (2016). Effect of processing on the content and biological activity of polysaccharides from *Pleurotus ostreatus* mushroom. *LWT - Food Science and Technology*, 66, 27–33. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.10.016>
- Rajkovic, M., Stanimirovic, Z., Stevanovic, J., Ristanic, M., Vejnovic, B., Goblirsch, M., & Glavinic, U. (2022). Evaluation of genotoxic and genoprotective effects of *Agaricus bisporus* extract on AmE-711 honey bee cell line in the Comet assay. *Journal of Apicultural Research*, 0(0), 1–9. <https://doi.org/10.1080/00218839.2022.2146367>
- Rashad, F. M., Kattan, M. H. El, Fathy, H. M., El-Fattah, D. A. A., Tohamy, M. El, & Farahat, A. A. (2019). Recycling of agro-wastes for *Ganoderma lucidum* mushroom production and *Ganoderma* post mushroom substrate as soil amendment. *Waste Management*, 88, 147–159. <https://doi.org/10.1016/J.WASMAN.2019.03.040>
- Ravindran, R., & Jaiswal, A. K. (2016). Exploitation of Food Industry Waste for High-Value Products. *Trends in Biotechnology*, 34(1), 58–69. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2015.10.008>
- Ren, L., Perera, C., & Hemar, Y. (2012). Antitumor activity of mushroom polysaccharides: a review. *Food & Function*, 3(11), 1118–1130. <https://doi.org/10.1039/c2fo10279j>
- Reverberi, M., Di Mario, F., & Tomati, U. (2004).  $\beta$ -Glucan synthase induction in mushrooms grown on olive mill wastewaters. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 66(2), 217–225. <https://doi.org/10.1007/s00253-004-1662-y>
- Režek Jambrak, A., Šimunek, M., & Djekic, I. (2018). Total quality index of ultrasound-treated blueberry and cranberry juices and nectars. *Food Science and Technology International*, 24(5), 434–446. <https://doi.org/10.1177/1082013218764962>
- Rodriguez Estrada, A. E., & Royse, D. J. (2007). Yield, size and bacterial blotch resistance of *Pleurotus eryngii* grown on cottonseed hulls/oak sawdust supplemented with manganese, copper and whole ground soybean. *Bioresource Technology*, 98(10), 1898–1906. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.07.027>
- Rodriguez Estrada, Alma E., & Pecchia, J. (2017). Cultivation of *Pleurotus ostreatus*. *Edible and Medicinal Mushrooms*, 339–360. <https://doi.org/10.1002/9781119149446.ch16>
- Romano, R., Brockhoff, P. B., Hersleth, M., Tomic, O., & Næs, T. (2008). Correcting for different use of the scale and the need for further analysis of individual differences in sensory analysis. *Food Quality and Preference*, 19(2), 197–209. <https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2007.06.008>
- Rotola-Pukkila, M., Yang, B., & Hopia, A. (2019). The effect of cooking on umami compounds in wild and cultivated mushrooms. *Food Chemistry*, 278(November), 56–66. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.11.044>
- Rugolo, M., Lechner, B., Mansilla, R., Mata, G., & Rajchenberg, M. (2020). Evaluation of *Pleurotus ostreatus* basidiomes production on Pinus sawdust and other agricultural and forestry wastes from Patagonia, Argentina. *Maderas: Ciencia y Tecnologia*, 22(4), 517–526. <https://doi.org/10.4067/S0718-221X2020005000410>
- Sakellari, A., Karavoltzos, S., Tagkouli, D., Rizou, C., Sinanoglou, V. J., Zoumpoulakis, P., ... Kalogeropoulos, N. (2019). Trace Elements in *Pleurotus ostreatus*, *P. eryngii*, and *P.*

- nebrodensis* Mushrooms Cultivated on Various Agricultural By-Products. *Analytical Letters*, 52(17), 2692–2709. <https://doi.org/10.1080/00032719.2019.1594865>
- Salehi, B., Zakaria, Z. A., Gyawali, R., Ibrahim, S. A., Rajkovic, J., Shinwari, Z. K., ... Setzer, W. N. (2019). Piper species: A comprehensive review on their phytochemistry, biological activities and applications. In *Molecules* (Vol. 24). <https://doi.org/10.3390/molecules24071364>
- Salehi, M. A., Trey, S. M., Henriksson, G., & Johansson, M. (2010). Effect of model lignin structures on the oxidation of unsaturated fatty acids. *Polymers from Renewable Resources*, 1(2), 69–90. <https://doi.org/10.1177/204124791000100201>
- Sánchez, Ó. J., & Montoya, S. (2020). Assessment of polysaccharide and biomass production from three white-rot fungi by solid-state fermentation using wood and agro-industrial residues: A kinetic approach. *Forests*, 11(10), 1–23. <https://doi.org/10.3390/f11101055>
- Šandula, J., Kogan, G., Kačuráková, M., & Machová, E. (1999). Microbial (1→3)-β-d-glucans, their preparation, physico-chemical characterization and immunomodulatory activity. *Carbohydrate Polymers*, 38(3), 247–253. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(98\)00099-X](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0144-8617(98)00099-X)
- Sekan, A. S., Myronycheva, O. S., Karlsson, O., Gryganskyi, A. P., & Blume, Y. (2019). Green potential of *Pleurotus* spp. in biotechnology. *PeerJ*, 7, 1–27. <https://doi.org/10.7717/peerj.6664>
- Selli, S., Guclu, G., Sevindik, O., & Kelebek, H. (2021). Variations in the key aroma and phenolic compounds of champignon (*Agaricus bisporus*) and oyster (*Pleurotus ostreatus*) mushrooms after two cooking treatments as elucidated by GC-MS-O and LC-DAD-ESI-MS/MS. *Food Chemistry*, 354(February), 129576. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129576>
- Serpen, A., Gökmen, V., & Fogliano, V. (2012). Total antioxidant capacities of raw and cooked meats. *Meat Science*, 90(1), 60–65. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2011.05.027>
- Shashirekha, M., Rajarathnam, S., & Bano, Z. (2005). Effects of supplementing rice straw growth substrate with cotton seeds on the analytical characteristics of the mushroom, *Pleurotus florida* (Block & Tsao). *Food Chemistry*, 92, 255–259. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.07.034>
- Schellekens, M., 1996. New research issues in sous-vide cooking. *Trends in Food Science and Technology* 7, 256–262.
- Silva, R. M. da, Carmo, C. O. do, Oliveira, T. A. S. de, Figueirêdo, V. R. de, Duarte, E. A. A., & Soares, A. C. F. (2020). Biological efficiency and nutritional value of *Pleurotus ostreatus* cultivated in agroindustrial wastes of palm oil fruits and cocoa almonds. *Arquivos Do Instituto Biológico*, 87, 1–10. <https://doi.org/10.1590/1808-1657000852018>
- 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. *Exp. Cell Res.*, 175, 184-191.
- Singh, M., Pandey, V. K., Pandey, A. K., Srivastava, A., Vishwakarma, N. K., & Singh, V. K. (2008). Production of xylanase by white rot fungi on wheat straw. *Asian Journal of Microbiology, Biotechnology and Environmental Sciences*, 10, 859–862.
- Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventós, R. M. (1999). [14] Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. In *Methods in Enzymology: Vol. 299. Oxidants and Antioxidants Part A* (pp. 152–178). Academic Press. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(99\)99017-1](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)99017-1)
- Son, T. G., Camandola, S., & Mattson, M. P. (2008). Hormetic dietary phytochemicals. *NeuroMolecular Medicine*, 10(4), 236–246. <https://doi.org/10.1007/s12017-008-8037-y>

- Souza, W. R. De. (2013). Microbial Degradation of Lignocellulosic Biomass.
- Sözbir Düzkale, G. (2021). Utilization of various lignocellulosic substrates for *Pleurotus ostreatus* mushroom cultivation in the manufacturing of polycaprolactone (PCL)-based biocomposite films. *BioResources*, 16(2), 3783-3796.
- Stone, B. A., & Clarke, A. E. (1992). Chemistry and Biology of (1,3)- $\beta$ -glucans. Australia: La Trobe University Press.
- Sudha, G., Vadivukkarasi, S., Shree, R. B. I., & Lakshmanan, P. (2012). Antioxidant activity of various extracts from an edible mushroom *Pleurotus eous*. *Food Science and Biotechnology*, 21(3), 661–668. <https://doi.org/10.1007/s10068-012-0086-1>
- Sundarraaj, A. A., & Ranganathan, T. V. (2018). A review on cellulose and its utilization from agro-industrial waste. *Drug Invention Today*, 10(1), 89–94.
- Stockert, J.C., Horobin, R.W., Colombo, L.L., Blázquez-Castro, A., (2018). Tetrazolium salts and formazan products in Cell Biology: Viability assessment, fluorescence imaging, and labeling perspectives. *Acta Histochem.*, 120, 159-167.
- Szymandera-Buszka, K., Waszkowiak, K., Jędrusek-Golińska, A., & Heś, M. (2020). Sensory analysis in assessing the possibility of using ethanol extracts of spices to develop new meat products. *Foods*, 9(2). <https://doi.org/10.3390/foods9020209>
- Tagkouli, D., Bekiaris, G., Pantazi, S., Anastasopoulou, M. E., Koutrotsios, G., Mallouchos, A., ... Kalogeropoulos, N. (2021). Volatile profiling of *Pleurotus eryngii* and *Pleurotus ostreatus* cultivated on agricultural and agro-industrial by-products. *Foods*, 10(6). <https://doi.org/10.3390/foods10061287>
- Tarrés, Q., Espinosa, E., Domínguez-Robles, J., Rodríguez, A., Mutjé, P., & Delgado-Aguilar, M. (2017). The suitability of banana leaf residue as raw material for the production of high lignin content micro/nano fibers: From residue to value-added products. *Industrial Crops and Products*, 99, 27–33. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.01.021>
- Tomasevic, I., Tomovic, V., Milovanović, B., Đorđević, V., Karabasil, N., & Djekic, I. (2018). Comparison of a computer vision system vs. traditional colorimeter for color evaluation of meat products with various physical properties. *Meat Science*, 148. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2018.09.015>
- Tsiantas, K., Tsiaka, T., Koutrotsios, G., Siapi, E., Zervakis, G. I., Kalogeropoulos, N., & Zoumpoulakis, P. (2021). On the identification and quantification of ergothioneine and lovastatin in various mushroom species: Assets and challenges of different analytical approaches. *Molecules*, 26(7). <https://doi.org/10.3390/molecules26071832>
- Tsujiyama, S. ichi, & Ueno, H. (2013). Performance of wood-rotting fungi-based enzymes on enzymic saccharification of rice straw. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93(11), 2841–2848. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6118>
- Uddin, M. N., Yesmin, S., Khan, M. A., Tania, M., Moonmoon, M., & Ahmed, S. (2010). Production of Oyster Mushrooms in Different Seasonal Conditions of Bangladesh. *Journal of Scientific Research*, Vol. 3, p. 161. <https://doi.org/10.3329/jsr.v3i1.6130>
- Ummat, V., Tiwari, B. K., Jaiswal, A. K., Condon, K., Garcia-Vaquero, M., O'Doherty, J., ... Rajauria, G. (2020). Optimisation of Ultrasound Frequency, Extraction Time and Solvent for the Recovery of Polyphenols, Phlorotannins and Associated Antioxidant Activity from Brown Seaweeds. *Marine Drugs*, 18(5). <https://doi.org/10.3390/md18050250>
- van Herpen, E., & van der Lans, I. (2019). A picture says it all? The validity of photograph coding to assess household food waste. *Food Quality and Preference*, 75(February), 71–77. <https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2019.02.006>



- Van Soest, P. J. (1963). Use of Detergents in the Analysis of Fibrous Feeds. II. A Rapid Method for the Determination of Fiber and Lignin. *Journal of Association of Official Agricultural Chemists*, 46(5), 829–835. <https://doi.org/10.1093/jaoac/46.5.829>
- Villaescusa, R., & Gil, M. I. (2003). Quality improvement of *Pleurotus* mushrooms by modified atmosphere packaging and moisture absorbers. *Postharvest Biology and Technology*, 28(1), 169–179. [https://doi.org/10.1016/S0925-5214\(02\)00140-0](https://doi.org/10.1016/S0925-5214(02)00140-0)
- Viuda-Martos, M., Ruiz-Navajas, Y., Fernández-López, J., & Pérez-Álvarez, J. A. (2009). Effect of adding citrus waste water, thyme and oregano essential oil on the chemical, physical and sensory characteristics of a bologna sausage. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 10(4), 655–660. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2009.06.001>
- Wan-Mohtar, W. A. A. Q. I., Klaus, A., Cheng, A., Salis, S. A., & Abdul Halim-Lim, S. (2019). Total quality index of commercial oyster mushroom *Pleurotus sapidus* in modified atmosphere packaging. *British Food Journal*, 121(8), 1871–1883. <https://doi.org/10.1108/BFJ-06-2018-0408>
- Wiafe-Kwagyan, M., Odamtten, G. T., & Kortei, N. K. (n.d.). Influence of substrate formulation on some morphometric characters and biological efficiency of *Pleurotus ostreatus* EM-1 (Ex. Fr) Kummer grown on rice wastes and “wawa” (*Triplochiton scleroxylon*) sawdust in Ghana. *Food Science & Nutrition*, n/a(n/a). <https://doi.org/10.1002/fsn3.2802>
- Xu, X., Yan, H., Chen, J., & Zhang, X. (2011). Bioactive proteins from mushrooms. *Biotechnology Advances*, 29(6), 667–674. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.05.003>
- Ye, J. jun, Li, J. rong, Han, X. xiang, Zhang, L., Jiang, T. jia, & Xia, M. (2012). Effects of Active Modified Atmosphere Packaging on Postharvest Quality of Shiitake Mushrooms (*Lentinula edodes*) Stored at Cold Storage. *Journal of Integrative Agriculture*, 11(3), 474–482. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(12\)60033-1](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(12)60033-1)
- Yildiz, S., Yildiz, Ü. C., Gezer, E. D., & Temiz, A. (2002). Some lignocellulosic wastes used as raw material in cultivation of the *Pleurotus ostreatus* culture mushroom. *Process Biochemistry*, 38(3), 301–306. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(02\)00040-7](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(02)00040-7)
- Zakil, F. A., Sueb, M. S. M., & Isha, R. (2019). Growth and yield performance of *Pleurotus ostreatus* on various agro-industrial wastes in Malaysia. *AIP Conference Proceedings*, 2155(September). <https://doi.org/10.1063/1.5125559>
- Zárate-Salazar, J. R., Santos, M. N., Caballero, E. N. M., Martins, O. G., & Herrera, Á. A. P. (2020). Use of lignocellulosic corn and rice wastes as substrates for oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus* Jacq.) cultivation. *SN Applied Sciences*, 2(11), 1–10. <https://doi.org/10.1007/s42452-020-03720-z>
- Zervakis, G. I., Koutrotsios, G., & Katsaris, P. (2013). Composted versus raw olive mill waste as substrates for the production of medicinal mushrooms: An assessment of selected cultivation and quality parameters. *BioMed Research International*. <https://doi.org/10.1155/2013/546830>
- Zhu, Q., Hackman, R., Ensunsa, J., Holt, R., & Keen, C. (2002). Antioxidative Activities of Oolong Tea. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 6929–6934. <https://doi.org/10.1021/jf0206163>
- Zied, D. C., Prado, E. P., Dias, E. S., Pardo, J. E., & Pardo-Gimenez, A. (2019). Use of peanut waste for oyster mushroom substrate supplementation—oyster mushroom and peanut waste. *Brazilian Journal of Microbiology*, 50(4), 1021–1029. <https://doi.org/10.1007/s42770-019-00130-1>

- Zivanovic, S., Busher, R. W., & Kim, K. S. (2000). Textural changes in mushrooms (*Agaricus bisporus*) associated with tissue ultrastructure and composition. *Journal of Food Science*, 65(8), 1404–1408. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2000.tb10621.x>
- Zorrilla, S. E., Rovedo, C. O., & Singh, R. P. (2000). A new approach to correlate textural and cooking parameters with operating conditions during double-sided cooking of meat patties. *Journal of Texture Studies*, 31(5), 499–523. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4603.2000.tb01017.x>

## PRILOZI

**Prilog 1 – Upitnik senzorne analize organskih bukovača pripremljenih pomoću tri kulinarske metode: (1) blanširanje u vreloj vodi na 88°C tokom 2 minuta (kontrola), (2) kuvanje na 80°C tokom 60 minuta - samo bukovača i bukovača sa dodatkom začinskog bilja i (3) *sous-vide* (60°C tokom 22 minuta) - samo bukovača i bukovača sa dodatkom začinskog bilja**

### Blanširanje bukovače (88°C, 2 minuta)

	Ukus	Miris	Sveukupan kvalitet	Defekt
Bukovača (kontrola)				

Legenda: Skala za ukus, miris, sveukupan kvalitet: 1 – vrlo neprihvatljivo; 2 – neprihvatljivo; 3 - na granici prihvatljivosti; 4 – prihvatljivo; 5 – vrlo prihvatljivo (odlično)

Skala za ocenu intenziteta defekta: 0 - nema defekta; 1 - blagi defekt; 2 - ozbiljan defekt

Opis defekata:

### Kuvanje na 80°C, 60 minuta

	Ukus	Miris	Sveukupan kvalitet	Defekt
Bukovača				
Bukovača + MD				
Bukovača + BI				
Bukovača + OR				

Legenda: Skala za ukus, miris, sveukupan kvalitet: 1 – vrlo neprihvatljivo; 2 – neprihvatljivo; 3 - na granici prihvatljivosti; 4 – prihvatljivo; 5 – vrlo prihvatljivo (odlično)

Skala za ocenu intenziteta defekta: 0 - nema defekta; 1 - blagi defekt; 2 - ozbiljan defekt

Opis defekata:

**Sous-vide (60°C, 22 minuta)**

	Ukus	Miris	Sveukupan kvalitet	Defekt
Bukovača				
Bukovača + MD				
Bukovača + BI				
Bukovača + OR				

Legenda: Skala za ukus, miris, sveukupan kvalitet: 1 – vrlo neprihvatljivo; 2 – neprihvatljivo; 3 - na granici prihvatljivosti; 4 – prihvatljivo; 5 – vrlo prihvatljivo (odlično)

Skala za ocenu intenziteta defekta: 0 - nema defekta; 1 - blagi defekt; 2 - ozbiljan defekt

Opis defekata:

**Prilog 2 – Upitnik intenziteta senzornih svojstava bukovače podvrgnute kulinarskoj metodi *sous-vide* na različitim temperaturama, koji uključuje skalu stepena i smera razlika u odnosu na kontrolni proizvod**

**Senzorno testiranje** – Skala stepena i smera razlika u odnosu na kontrolni proizvod.

Neprihvatljiva razlika	Značajna razlika	Marginalna razlika	Mala razlika	<b>Kao kontrolni uzorak</b>	Mala razlika	Marginalna razlika	Značajna razlika	Neprihvatljiva razlika
<<< manje od <<<					>>> više od >>>			
1	2	3	4	5	6	7	8	9

Senzorno svojstvo

Kontrolni uzorak je **sous-vide 70° 10'**

Šifra uzorka

Boja (svetlo - <u>1</u> / tamno - <u>9</u> )	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Intenzitet boje bukovače									
Sočnost / juiciness (suvo - <u>1</u> / sočno - <u>9</u> )	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Intenzitet sočnosti bukovače									
Hrskavost / crispness (gnjecavo - <u>1</u> / hrskavo - <u>9</u> )	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Intenzitet hrskavosti bukovače									
Tvrdoća / hardness (meko - <u>1</u> / tvrdo - <u>9</u> )	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Sila sabijanja proizvoda između jezika i nepca									
Miris (manje - <u>1</u> / više - <u>9</u> )	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Intenzitet mirisa bukovače									
Ukus bukovače (manje - <u>1</u> / više - <u>9</u> )	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Intenzitet prepoznatljivog ukusa bukovače									
Atipičan ukus (veliki defekti - <u>9</u> )					5	6	7	8	9
Intenzitet atipičnih ukusa bukovače									


Atipični ukusi	1 – kiselo; 2 – slatko; 3 – hemija; 4 – bljutavo; 5 – seno;
	6 - _____; 7 _____; 8 _____

<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
--------------------------	--------------------------	--------------------------	--------------------------	--------------------------

**Senzorno testiranje** – Stepen prihvatljivosti proizvoda sa aspekta kvaliteta

Izuzetno mi se ne sviđa	Veoma mi se ne sviđa	Umereno mi se ne sviđa	Malo mi se ne sviđa	Niti mi se sviđa niti mi se ne sviđa	Donekle mi se sviđa	Umereno mi se sviđa	Veoma mi se sviđa	Izuzetno mi se sviđa
1	2	3	4	5	6	7	8	9

Šifra uzorka

**PRIHVATLJIVOST PROIZVODA SA ASPEKTA KVALITETA**

Ocena kvaliteta	1	2	3	4	5	6	7	8	9
	Ocenite prihvatljivost sa aspekta kvaliteta								

<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
--------------------------	--------------------------	--------------------------	--------------------------	--------------------------

**Prilog 3 - Upitnik intenziteta senzornih svojstava bukovače podvrgnute kulinarskoj metodi kuvanje sa različitim vremenskim trajanjem, koji uključuje skalu stepena i smeru razlika u odnosu na kontrolni proizvod**



**Senzorno testiranje** – Skala stepena i smera razlika u odnosu na kontrolni proizvod.

Neprihvatljiva razlika	Značajna razlika	Marginalna razlika	Mala razlika	<b>Kao kontrolni uzorak</b>	Mala razlika	Marginalna razlika	Značajna razlika	Neprihvatljiva razlika
<<< manje od <<<					>>> više od >>>			
1	2	3	4	5	6	7	8	9

Senzorno svojstvo

Kontrolni uzorak je **kuvanje 80° 45'**

Šifra uzorka

Boja (svetlo - <u>1</u> / tamno - <u>9</u> )	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Intenzitet boje bukovače									
Sočnost / juiciness (suvo - <u>1</u> / sočno - <u>9</u> )	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Intenzitet sočnosti bukovače									
Tvrdoća / hardness (meko - <u>1</u> / tvrdo - <u>9</u> )	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Sila sabijanja proizvoda između jezika i nepca									
Klizavost (koči - <u>1</u> /sklizne - <u>9</u> )	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Miris (manje - <u>1</u> / više - <u>9</u> )	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Intenzitet mirisa bukovače									
Ukus bukovače (manje - <u>1</u> / više - <u>9</u> )	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Intenzitet prepoznatljivog ukusa bukovače									
Atipičan ukus (veliki defekti - <u>9</u> )					5	6	7	8	9
Intenzitet atipičnih ukusa bukovače									


Atipični ukusi	1 – kiselo; 2 – slatko; 3 – hemija; 4 – bljutavo; 5 – seno;
	6 - _____; 7 _____; 8 _____

<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
--------------------------	--------------------------	--------------------------	--------------------------	--------------------------

**Senzorno testiranje** – Stepen prihvatljivosti proizvoda sa aspekta kvaliteta

Izuzetno mi se ne sviđa	Veoma mi se ne sviđa	Umereno mi se ne sviđa	Malo mi se ne sviđa	Niti mi se sviđa niti mi se ne sviđa	Donekle mi se sviđa	Umereno mi se sviđa	Veoma mi se sviđa	Izuzetno mi se sviđa
1	2	3	4	5	6	7	8	9

Šifra uzorka

**PRIHVATLJIVOST PROIZVODA SA ASPEKTA KVALITETA**

Ocena kvaliteta	1	2	3	4	5	6	7	8	9
	Ocenite prihvatljivost sa aspekta kvaliteta								

<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
--------------------------	--------------------------	--------------------------	--------------------------	--------------------------

**Prilog 4 – Upitnik intenziteta senzornih i teksturnih svojstava bukovače sa dodatkom začinskog bilja, koji uključuje skalu intenziteta odabranih senzornih atributa, kao i skalu dopadljivosti proizvoda**

Šifra \_\_\_\_\_

Ime i prezime \_\_\_\_\_ Datum \_\_\_\_\_

Intenzitet mirisa bukovače  
 Ništa \_\_\_\_\_ Intenzivno

Intenzitet mirisa majčine dušice  
 Ništa \_\_\_\_\_ Intenzivno

Intenzitet mirisa origano  
 Ništa \_\_\_\_\_ Intenzivno

Intenzitet hrskavosti  
 Gnjecavo \_\_\_\_\_ Hrskavo

Intenzitet tvrdoće  
 Meko \_\_\_\_\_ Tvrd

Intenzitet ukusa bukovače  
 Ništa \_\_\_\_\_ Intenzivno

Intenzitet ukusa majčine dušice  
 Ništa \_\_\_\_\_ Intenzivno

Intenzitet ukusa origano  
 Ništa \_\_\_\_\_ Intenzivno

Opišite intenzitet začina u bukovači u odnosu  
 na vašu uobičajenu začinjenost hrane  
 Manje \_\_\_\_\_ Isto \_\_\_\_\_ Više

Kako vam se sviđa ovaj proizvod?  
 Uopšte mi se ne sviđa \_\_\_\_\_ Nemam stav \_\_\_\_\_ Veoma mi se sviđa

## BIOGRAFIJA KANDIDATA

Ana Doroški, rođena u Beogradu, 2011. godine završila je Četvrtu beogradsku gimnaziju, sa odličnim uspehom. Iste godine upisala je osnovne akademske studije na Poljoprivrednom fakultetu Univerziteta u Beogradu, smer: Prehrambena tehnologija, modul: Upravljanje bezbednošću i kvalitetom u proizvodnji hrane, koje je završila je 2015. godine sa prosekom ocena 9,66 i stekla stručno zvanje Diplomirani Inženjer Tehnologije. Iste godine upisala je master akademske studije na Poljoprivrednom fakultetu Univerziteta u Beogradu, smer: Prehrambena tehnologija, modul: Upravljanje bezbednošću i kvalitetom hrane. U toku master studija, provela je pet meseci na Univerzitetu u Gentu, Belgija. 2017. godine odbranila je Master rad čime je stekla stručno zvanje Master Inženjer Tehnologije. U toku svog studiranja bila je korisnik stipendije Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja, kao i stipendije Dositeja, Fonda za mlade talente Republike Srbije.

Kao istraživač-saradnik i student doktorskih studija, zaposlena je na Poljoprivrednom fakultetu Univerziteta u Beogradu od 2018. godine (istraživač-pripravnik 2018-2021, istraživač-saradnik 2021-danas). Od 2018. godine, angažovana je na projektu Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja III46010, pod nazivom "Razvoj novih inkapsulacionih i enzimskih tehnologija za proizvodnju biokatalizatora i biološki aktivnih komponenata hrane u cilju povećanja njene konkurentnosti, kvaliteta i bezbednosti", a od 2022. godine angažovana je i na projektu pod nazivom „Functional products based on goat’s milk proteins and bioactive compounds extracted from grape pomace and edible mushrooms – FUNPRO“ u okviru projektnog ciklusa IDEJE Fonda za Nauku Republike Srbije. Kao autor i koautor objavila je 5 naučnih radova, od kojih je 4 naučna rada proisteklo iz istraživanja i pisanja doktorske disertacije, na kojima je prvi autor. Naučni radovi Ane Doroški su citirani 31 put, dok H-index iznosi 3, prema podacima citatne baze Scopus. Učestvovala je u održavanju i organizaciji praktičnih vežbi na sledećim predmetima: Upravljanje kvalitetom u proizvodnji hrane, Opšta mikrobiologija, Mikrobiologija, Proizvodnja jestivih i medicinskih gljiva, Mikrobiologija biljnih proizvoda, Industrijski mikroorganizmi u hrani biljnog porekla i Mikrobiološko kvarenje hrane.

## Izjava o autorstvu

Ime i prezime autora: Ana Doroški

Broj indeksa: TH170004

### Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom:

Ispitivanje kvaliteta i biološkog potencijala bukovače (*Pleurotus ostreatus*) i analiza mogućnosti gajenja na celuloznom otpadu prehrambene industrije

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

**Potpis autora**

U Beogradu, \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

## **Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada**

Ime i prezime autora: Ana Doroški

Broj indeksa: TH170004

Studijski program: Prehrambena tehnologija

Naslov rada: Ispitivanje kvaliteta i biološkog potencijala bukovače (*Pleurotus ostreatus*) i analiza mogućnosti gajenja na celuloznom otpadu prehrambene industrije

Mentor 1: dr Ilija Đekić, redovni profesor

Mentor 2: dr Anita Klaus, redovni profesor

Izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao radi pohranjenja u Digitalnom repozitorijumu Univerziteta u Beogradu.

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

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

**Potpis autora**

U Beogradu, \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

## Izjava o korišćenju

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

Ispitivanje kvaliteta i biološkog potencijala bukovače (*Pleurotus ostreatus*) i analiza mogućnosti gajenja na celuloznom otpadu prehrambene industrije

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim priložima predao sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje. Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalnom repozitorijumu Univerziteta u Beogradu i dostupnu u otvorenom pristupu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučila.

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

### Potpis autora

U Beogradu, \_\_\_\_\_

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



2. Autorstvo – nekomercijalno. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence, Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.
3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerada. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela. U odnosu na sve ostale licence, ovom licencom se ograničava najveći obim prava korišćenja dela.
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada.
5. Autorstvo – bez prerada. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada. Slična je softverskim licencama, odnosno licencama otvorenog koda.