

UNIVERZITET U BEOGRADU
POLJOPRIVREDNI FAKULTET

Vesna V. Lazić

**UTICAJ NAČINA EKSTRAKCIJE NA
ANTIADHEZIVNI I ANTIBIOFILMSKI
POTENCIJAL I BIOLOŠKA SVOJSTVA GLJIVE
*INONOTUS OBLIQUUS***

doktorska disertacija

Beograd, 2024.

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF AGRICULTURE

Vesna V. Lazić

**THE INFLUENCE OF THE EXTRACTION
METHOD ON THE ANTI-ADHESIVE AND
ANTI-BIOFILM POTENTIAL AND
BIOLOGICAL PROPERTIES OF THE
MUSHROOM *INONOTUS OBLIQUUS***

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2024.

UNIVERZITET U BEOGRADU POLJOPRIVREDNI FAKULTET

MENTOR:

dr Anita Klaus, redovni profesor

Univerzitet u Beogradu Poljoprivredni fakultet

ČLANOVI KOMISIJE:

1. dr Maja Kozarski, redovni profesor

Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet

2. dr Jovana Vunduk, viši naučni saradnik

Institut za opštu i fizičku hemiju, Beograd

3. dr Milka Malešević, naučni saradnik

Univerzitet u Beogradu, Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo

4. dr Senka Vidović, redovni profesor

Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet

5. dr Ilija Đekić, redovni profesor

Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet

Datum odbrane: _____

Zahvalnica

Najveći deo ove doktorske disertacije realizovan je na Katedri za tehnološku mikrobiologiju, Univerziteta u Beogradu - Poljoprivrednog fakulteta, dok su pojedini delovi realizovani na Katedri za farmaceutsko inženjerstvo, Tehnološkog fakulteta u Novom Sadu; na Katedri za analitičku hemiju, Univerziteta u Beogradu - Hemijskog fakulteta; na Katedri za mikrobiologiju, Univerziteta u Beogradu - Biološkog fakulteta; na Katedri za matematiku i fiziku, Univerziteta u Beogradu - Poljoprivrednog fakulteta; u Laboratoriji za molekularnu mikrobiologiju, Univerziteta u Beogradu - Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo. Istraživanja u okviru ove doktorske disertacije realizovana su zahvaljujući 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“.

Ovom prilikom želim da se zahvalim...

Neizmernu zahvalnost dugujem mentorki prof. dr Aniti Klaus, redovnom profesoru Poljoprivrednog fakulteta, Univerziteta u Beogradu, na pružanju mogućnosti izrade doktorskog disertacije, na strpljenju, posvećenosti, nesebično izdvojenom vremenu, razumevanju, pomoći tokom izrade teze, svim savetima i smernicama tokom pisanja. Hvala Vam za prelepu saradnju, ukazano poverenje, slobodu u eksperimentalnom radu ali i trudu da realizujemo sve ideje. Hvala Vam za sve prijateljske savete i životne lekcije.

Posebnu zahvalnost dugujem dr Jovani Vunduk, višem naučnom saradniku Instituta za opštu i fizičku hemiju, Beograd, koja je od početka do kraja bila uključena u realizaciju ove disertacije: koncept, eksperimentalni deo, uobličavanje, obradu i tumačenje rezultata; hvala za svo nesebično preneto praktično i teorijsko znanje, na neiscrpnim idejama, temeljnim analizama, za sve pružene prilike, za sve savete, smernice, stručne korekcije tokom pisanja, finalnog oblikovanja naučnih radova i same disertacije. Hvala na izdvojenom vremenu i uloženom trudu za savladavanje svih prepreka tokom izvođenja celokupne disertacije.

Veliku zahvalnost dugujem prof. dr Maji Kozarski, redovnom profesoru na Katedri za hemiju i biohemiju, Poljoprivrednog fakulteta, Univerziteta u Beogradu za sve korisne savete i sugestije tokom izvođenja eksperimentalnog dela hemijskih analiza ali i kasnije, tokom pisanje naučnih radova i disertacije. Hvala Vam na lepoj saradnji, podršci, uloženom trudu i izdvojenom vremenu za sva moja pitanja.

Veliku zahvalnost ukazujem dr Milki Malešević, naučnom saradniku Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Univerziteta u Beogradu na prilici da dođem na IMGGI, naučim nešto novo, za urađene molekularne analize i pomoć tokom tumačenja rezultata, koji su doprineli kvalitetu ove disertacije. Hvala na izdvojenom vremenu, efikasnosti, pažljivom čitanju i savetima tokom pisanja. Posebno hvala za prijatnu atmosferu tokom eksperimentalnog rada i saradnju koja će se nadam se nastaviti.

Želim da se zahvalim prof. dr Senki Vidović, redovnom profesoru na Katedri za farmaceutsko inženjerstvo, Tehnološkog fakulteta u Novom Sadu, kao i budućem doktoru nauka Siniši Simić na

moogućnosti pripreme ekstrakata bez koji ne bi mogla da se realizuje ova disertacija, na lepoj saradnji i kritičkoj oceni doktorske disertacije.

Želim da se zahvalim prof. dr Iliji Đekiću na savetima, korisnim sugestijama koje su unapredile kvalitet teze, kao i na kritičkoj oceni teze.

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

*Dr Tomislavu Tostiju, višem naučnom saradniku Instituta za hemiju, tehnologiju i metalurgiju, Univerziteta u Beogradu na kvalitativnoj hemijskoj analizi ekstrakata gljive *Inonotus obliquus* i pomoći oko tumačenja dobijenih rezultata.*

Veliku zahvalnost dugujem dr Predragu Petroviću, naučnom saradniku na odličnoj saradnji, ogromnoj pomoći i sugestijama koje su bile od neprocenjivog značaja prilikom izrade ove teze.

Takođe, hvala prof. dr Vladanu Pavloviću, redovnom profesoru na Katedri za matematiku i fiziku, Poljoprivrednog fakulteta, Univerziteta u Beogradu, na SEM mikrografijama.

Velikom kolektivu Katedre za tehnološku mikrobiologiju na savetima i prijatnoj atmosferi.

Posebno se zahvaljujem mojoj Ani Doroški, budućem doktoru nauka, na prijateljstvu, neizmernoj podršci tokom trajanja doktorata, pomoći tokom eksperimenata, za nezaboravne momente u laboratoriji i van nje.

Najiskrenije hvala mojoj Milani u dalekoj Australiji, cimerima Ani i Stefanu, Marini, Jovani, Maji, Saški i Milici, Vladi, Ivanu, Dušanu, Radi, Saletu i Valentini na podršci i razumevanju tokom svih ovih godina kada nisam imala mnogo slobodnog vremena za druženje. Hvala Vam što ste deo mog života.

Beskrajnu zahvalnost dugujem mojim roditeljima i bratu, na svemu što ste mi omogućili i verovali u mene, za ogromnu podršku koju mi svakodnevno pružate tokom čitavnog školovanja, za ljubav i razumevanje. Hvala mom Marku za podršku, razumevanje i ljubav.

Mojim roditeljima

Uticaj načina ekstrakcije na antiadhezivni i antibiofilmski potencijal i biološka svojstva gljive *Inonotus obliquus*

REZIME

Inonotus obliquus, poznata kao Čaga, smatra se lekovitom gljivom koja raste na kori breza, sa viševjekovnom tradicionalnom primenom u narodnoj medicini. U ovom istraživanju korišćene su odabrane zelene tehnike ekstrakcija: mikrotalasna (MW), ultrazvučna (VAE), subkritična vodena (SWE) i ekstrakcija superkritičnim CO₂ (SFE), sa ciljem da se preporuči najoptimalniji postupak dobijanja ekstrakta sa biološki aktivnim svojstvima. Pripremljeni ekstrakti Čage poreklom iz Srbije (IS) i Čage poreklom iz Mongolije (IM) hemijski su okarakterisani i ispitana su njihova biološka svojstva. SWE ekstrakcijom dobijen je značajno veći prinos, kao i ukupan sadržaj polisaharida i glukana u poredjenju sa drugim tehnikama. Glukoza je bila najzastupljeniji slobodni monosaharid u svim ekstraktima. MW 50% EtOH ekstrakti imali su najviše ukupnih fenola. Među ispitanim fenolnim jedinjenjima najzastupljenija je bila prisutna hlorogena kiselina. SWE ekstrakti su u svim antioksidativnim testovima, *in vitro*, ispoljili snažan antioksidativni potencijal. Takođe, isti ekstrakti pokazali su antimikrobnu aktivnost prema skoro svim izolatima bakterijskih kultura, a veća osetljivost je primećena kod Gram pozitivnih bakterija. Rezultati ispitivanja antiadhezivnog dejstva na odabrane izolate bakterija ukazali su na viši procenat inhibicije u odnosu na antibiofilmsko dejstvo. Posebna pažnja je bila usmerena na model sistem *Pseudomonas aeruginosa* MMA83, kod ovog izolata je skenirajućom elektronskom mikroskopijom (SEM) i fluorescentnom mikroskopijom potvrđen antibiofilmski efekat SWE i VAE H₂O ekstrakata ukazujući na morfološke i strukturne promene. Isti ekstrakti su izazvali smanjenje ekspresije gena Quorum sensing sistema (QS) i produkcije faktora virulencije. MTT testom, *in vitro*, dokazana je citotoksična aktivnost SWE ekstrakata prema Hs 294T i SW 620 tumorskim ćelijskim linijama, ali i prema neizmenjenim fibroblastima pluća (MRC - 5). Ekstrakti IS SWE 200 °C su pokazali genotoksični efekat prema svim odabranim ćelijskim linijama.

Ključne reči: *Inonotus obliquus*; mikrotalasna ekstrakcija; ultrazvučna ekstrakcija; subkritična ekstrakcija; ekstrakcija superkritičnim CO₂; antioksidativna aktivnost; antimikrobna aktivnost; antibiofilmska aktivnost; antiadhezivna aktivnost; citotoksičnost

Naučna oblast: Tehnološko inženjerstvo

Uža naučna oblast: Tehnološka mikrobiologija

UDK broj: 66.061:582.28(043.3)

The influence of the extraction method on the anti-adhesive and anti-biofilm potential and biological properties of the mushroom *Inonotus obliquus*

ABSTRACT

Inonotus obliquus, known as Chaga, is a medicinal mushroom that grows on birch bark and has been used in traditional folk medicine for several centuries. In this research, selected green extraction techniques were used: microwave (MW), ultrasonic (VAE), subcritical water (SWE), and supercritical CO₂ (SFE), to recommend the most optimal extraction method. The prepared extracts of Serbian (IS) and Mongolian Chaga were chemically characterized, and their biological properties were examined. SWE extraction resulted in a significantly higher yield, as well as higher total polysaccharide and glucan content compared to the other techniques. Glucose was the most dominant monosaccharide in all extracts. MW 50% EtOH extracts exhibited the highest total phenols content, with chlorogenic acid being the most dominant phenolic compound among those tested. In all antioxidant assays, SWE extracts showed strong antioxidant capacity. Also, the same extracts showed antimicrobial activity against almost all isolates at the highest tested concentrations, with greater sensitivity observed towards Gram-positive bacteria. The results of testing the antiadhesive effect on the selected isolates showed a higher percentage of inhibition compared to the antibiofilm effect. Special attention was focused on the model system strain *Pseudomonas aeruginosa* MMA83; scanning electron microscopy (SEM) and fluorescent microscopy confirmed the antibiofilm effect of SWE and VAE H₂O extracts, indicating morphological and structural changes. The same extracts caused a decrease in Quorum Sensing system (QS) and virulence factor production. The MTT test showed the cytotoxic activity of SWE extracts against Hs 294T and SW 620 cancer cell lines, but also against normal lung fibroblasts (MRC - 5). IS SWE 200 °C extracts showed a genotoxic effect against all selected cell lines.

Key words: *Inonotus obliquus*; microwave-assisted extraction; ultrasonic-assisted extraction; subcritical water extraction; supercritical CO₂; antioxidant activity; antimicrobial activity; antibiofilm activity; antiadhesive activity; cytotoxicity

Scientific field: Technological engineering

Scientific subfield: Food and Industrial Microbiology

UDC number: 66.061:582.28(043.3)

SADRŽAJ:

LISTA SKRAĆENICA.....	I
LISTA TABELA	IV
LISTA SLIKA	V
1. Uvod	1
2. Pregled literature.....	2
2.1. Zelene ekstrakcije.....	2
2.1.1. Mikrotalasna ekstrakcija	3
2.1.2. Ultrazvučna ekstrakcija	3
2.1.3. Ekstrakcija subkritičnom vodom.....	4
2.1.4. Ekstrakcija superkritičnim ugljendioksidom.....	5
2.2. Čaga (<i>Inonotus obliquus</i>)	6
2.3. Bioaktivna jedinjenja <i>I. obliquus</i>	7
2.3.1. Polisaharidi.....	8
2.3.2. Polifenolna jedinjenja.....	9
2.3.3. Terpeni	10
2.4. Primena <i>I. obliquus</i> u tradicionalnoj medicini	11
2.5. Savremena istraživanja – biološka aktivnost <i>I. obliquus</i>	12
2.5.1. Antioksidativna aktivnost.....	12
2.5.2. Antitumorska aktivnost.....	13
2.5.3. Antimikrobna aktivnost	14
2.6. Biofilm	15
2.6.1. Međucelijska komunikacija bakterija - <i>Quorum Sensing</i>	17
3. Ciljevi istraživanja.....	19
4. Materijal i metode.....	20
4.1. Gljive korišćene u eksperimentalnom radu	20
4.1.1. Priprema ekstrakata.....	20
4.1.1.1. Ultrazvučna ekstrakcija	21
4.1.1.2. Mikrotalasna ekstrakcija.....	21
4.1.1.3. Ekstrakcija subkritičnom vodom.....	22
4.1.1.4. Ekstrakcija superkritičnim ugljendioksidom	22
4.2. Hemijska karakterizacija ekstrakata.....	23
4.2.1. Određivanje sadržaja ukupnih proteina	23
4.2.2. Analiza polisaharida.....	24
4.2.2.1. Određivanje sadržaja ukupnih šećera	24
4.2.2.2. Određivanje ukupnih, α - i β -glukana.....	24
4.2.2.3. Analiza šećera primenom visoko-efikasne jonske hromatografije sa pulsno-amperimetrijskom detekcijom (HPAEC/PAD)	24
4.2.3. Analiza fenola	25
4.2.3.1. Određivanje sadržaja ukupnih fenolnih jedinjenja	25
4.2.3.2. Fenolni profil	25
4.2.4. Profil masnih kiselina	26

4.3.	Biološka karakterizacija ekstrakata	26
4.3.1.	<i>Antioksidativna aktivnost</i>	26
4.3.1.1.	Sposobnost neutralizacije slobodnih DPPH•	26
4.3.1.2.	Sposobnost neutralizacije ABTS+•	27
4.3.1.3.	Sposobnost redukcije jona bakra	27
4.3.1.4.	Sposobnost heliranja jona gvožđa	27
4.3.2.	<i>Antimikrobna aktivnost</i>	28
4.3.2.1.	Bakterijski sojevi, odžavanje i priprema	28
4.3.2.2.	Utvrđivanje minimalne inhibitorne (MIC) i minimalne baktericidne koncentracije (MBC) testiranih ekstrakata	28
4.3.2.3.	Određivanje kinetike rasta odabranih bakterija merenjem optičke gustine (OD)	29
4.3.2.4.	Utvrđivanje tipa interakcije između odabranih ekstrakata metodom šahovske table (eng. checkerboard assay)	29
4.3.3.	<i>Antiadhezivni i antibiofilmski potencijal ekstrakata gljive I. obliquus</i>	30
4.3.3.1.	Utvrđivanje produkcije biofilma	30
4.3.3.2.	Uticaj pojedinačnih ekstrakata kao i kombinacija različitih koncentracija na fomiranje biofilma	31
4.3.3.3.	Uticaj na već formirani biofilm – razaranje biofilma	31
4.3.3.4.	Kvantifikacija ekstraćelijskih polimernih supstanci (EPS)	32
4.3.4.	<i>Fluorescentna mikroskopija (Fluorescence microscopy)</i>	32
4.3.5.	<i>Skenirajuća elektronska mikroskopija (Scanning Electron Microscopy) - SEM</i>	32
4.3.6.	<i>Molekularne analize – metode rada sa RNK molekulima bakterija</i>	33
4.3.6.1.	Gajenje bakterija za potrebe izolacije RNK	33
4.3.6.2.	Izolacija RNK iz bakterijskih ćelija	33
4.3.6.3.	Prečišćavanje bakterijske RNK od DNK molekula	33
4.3.6.4.	Reverzna transkripcija RNK	34
4.3.6.5.	Provera prevođenja bakterijske RNK u cDNK i izostanka DNK PCR metodom	34
4.3.6.6.	Kvantitativni PCR u realnom vremenu - RT-qPCR	35
4.3.7.	<i>Ispitivanje biološkog potencijala ekstrakata gljive I. obliquus na ćelijskim kulturama</i>	36
4.3.7.1.	Procedura čuvanja, održavanja i zamrzavanja ćelijskih linija	36
4.3.7.2.	Oživljavanje zamrznutih ćelijskih kultura, njihovo gajenje i tripsinizacija	36
4.3.7.3.	Procena broja i vijabilnosti ćelija	36
4.3.7.4.	Određivanje citotoksičnosti testiranih ekstrakata primenom MTT testa	37
4.3.8.	<i>Ispitivanje genotoksičnosti ekstrakata gljive I. obliquus alkalnim komet testom</i>	38
4.4.	Statistička analiza podataka	39
5.	Rezultati i diskusija	40
5.1.	Zelene ekstrakcije	40
5.1.1.	<i>Prinos ekstrakata I. obliquus ostvaren zelenim ekstrakcijama</i>	40
5.2.	Hemijska karakterizacija ekstrakata gljive <i>I. obliquus</i>	41
5.2.1.	<i>Sadržaj proteina u ekstraktima gljive I. obliquus</i>	41
5.2.2.	<i>Ukupan sadržaj šećera u ekstraktima gljive I. obliquus</i>	41

5.2.3.	<i>Sadržaj ukupnih, α- i β-glukana u ekstraktima gljive <i>I. obliquus</i></i>	44
5.2.4.	<i>Ukupan sadržaj fenola u ekstraktima gljive <i>I. obliquus</i></i>	44
5.2.5.	<i>Kvalitativna i kvantitativna analiza šećera u ekstraktima gljive <i>I. obliquus</i></i>	45
5.2.6.	<i>Profil fenolnih jedinjenja u ekstraktima gljive <i>I. obliquus</i></i>	47
5.2.7.	<i>Profil masnih kiselina u ekstraktima gljive <i>I. obliquus</i>.....</i>	49
5.2.8.	<i>Analiza glavnih komponenti – PCA (eng. Principal Component Analysis).....</i>	51
5.3.	<i>Biološka karakterizacija ekstrakata</i>	53
5.3.1.	<i>Antioksidativna aktivnost</i>	53
5.3.1.1.	<i>Sposobnost neutralizacije slobodnih DPPH• ekstrakata gljive <i>I. obliquus</i></i>	53
5.3.1.2.	<i>Sposobnost neutralizacije ABTS+• ekstrakata gljive <i>I. obliquus</i></i>	56
5.3.1.3.	<i>Sposobnost redukcije jona bakra ekstrakata gljive <i>I. obliquus</i>.....</i>	59
5.3.1.4.	<i>Sposobnost heliranja jona gvožđa ekstrakata gljive <i>I. obliquus</i></i>	62
5.3.2.	<i>Antimikrobna aktivnost</i>	65
5.3.2.1.	<i>Minimalne inhibitorne (MIC) i minimalne baktericidne koncentracije (MBC) ekstrakata gljive <i>I. obliquus</i></i>	66
5.3.2.2.	<i>Određivanje kinetike rasta odabranih bakterija merenjem optičke gustine (OD)</i>	69
5.3.2.3.	<i>Utvrđivanje tipa interakcija između odabranih ekstrakata gljive <i>I. obliquus</i> i etanolnog ekstrakta kantariona (<i>Hypericum perforatum</i>)</i>	71
5.3.3.	<i>Utvrđivanje produkcije biofilma</i>	73
5.3.4.	<i>Antiadhezivni i antibiofilmski potencijal ekstrakata gljive <i>I. obliquus</i>.....</i>	74
5.3.5.	<i>Uticaj ekstrakata čage na produkciju ekstraćelijskih polimernih supstanci (EPS).....</i>	82
5.3.6.	<i>Fluorescentna i skenirajuća elektronska mikroskopija (SEM) biofilmova tretiranih odabranim ekstraktima gljive <i>I. obliquus</i></i>	84
5.3.7.	<i>Molekularna analiza</i>	85
5.3.8.	<i>Citotoksična aktivnost odabranih ekstrakata gljive <i>I. obliquus</i>.....</i>	87
6.	<i>Zaključci</i>	94
7.	<i>LITERATURA</i>	96
	<i>PRILOZI</i>	119
	<i>BIOGRAFIJA KANDIDATA</i>	135
	<i>Izjava o autorstvu.....</i>	136
	<i>Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada.....</i>	137
	<i>Izjava o korišćenju</i>	138

LISTA SKRAĆENICA

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

ANOVA - statistička metoda analize varijanse (Analysis of variance)

AMR - antimikrobna rezistencija (antimicrobial resistance)

ATCC - američka organizacija za nabavku standardnih referentnih mikroorganizama (American Type Culture Collection)

BSA - goveđi serumski albumin (bovine serum albumine)

cDNK - komplementarna DNK

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

CUPRAC - sposobnost redukcije jona bakra (cupric reducing antioxidant capacity)

DMEM medijum - Dulbecco's modified eagle's medium

DMSO - dimetil sulfoksid

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

ECACC - evropska kolekcija ćelijskih kultura (The European Collection of Authenticated Cell Cultures)

eDNK - ekstracelularna DNK

EDTA - etilen diamin tetra sirćetna kiselina

EPS - egzopolisaharid

FIC - frakciona inhibitorna koncentracija (Fractional Inhibitory Concentration)

FICI - frakcioni inhibitorni koncentracioni indeks (Fractional inhibitory concentration index)

GAE - ekvivalent galne kiseline (gallic acid equivalent)

GC×GC/MS - sveobuhvatna dvodimenzionalna gasna hromatografija sa masenim detektorom

GLU - glukoza (D-glucose)

HPAEC/PAD - visoko-efikasne jonske hromatografije sa pulsno-amperimetrijskom detekcijom (High-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection)

Hs 294T - ćelije melanoma (human melanoma cells)

IC50 - inhibitorna koncentracija ekstrakta gljive potrebna da pokaže 50% svoje antitumorske sposobnosti

iRNK - informaciona RNK

IM - mongolska Čaga
IS - srpska Čaga
MBC - minimalna baktericidna koncentracija
MHB - Miler-Hinton bujon (Mueller Hinton Broth)
MIC - minimalna inhibitorna koncentracija
MRSA - *Staphylococcus aureus* otporan na meticilin (Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*)
MTT - 3-(4,5-difeniltiazol-2-il)-2,5 difenil tetrazolijum bromid (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5 diphenyl tetrazolium bromide)
MRC-5 - fetalni fibroblasti pluća
MW - mikrotalasna ekstrakcija (microwave-assisted extraction)
OD - optička gustina (optical density)
PBS - fiziološki rastvor sa puferom fosfata (phosphate-buffered saline)
PCA - analiza glavnih komponenata (Principal component analysis)
PCR - polimerazna lančana reakcija (Polymerase Chain Reaction)
pH - mera aktivnosti vodonikovih jona u rastvoru
QS - Quorum Sensing
QSI - quorum sensing inhibitor
ROS - reaktivne vrste kiseonika (Reactive oxygen species)
RT-qPCR - Kvantitativni – polimerazna lančana reakcija u realnom vremenu - RT-qPCR (Real Time quantitative Polymerase Chain Reaction)
SDS - natrijum dodecil sulfat (sodium dodecyl sulfate)
SEM - skenirajući elektronski mikroskop (Scanning Electron Microscopy)
SFE - superkričnu ekstrakciju ugljendioksidom (Supercritical Fluid Extraction)
SI - selektivni indeks (selectivity index)
SWE - subkrična vodena ekstrakcija (Subcritical Water Extraction)
SW 620 - ćelije kolorektalnog adenocarcinoma (human colorectal cancer cell line)
SFA - zasićene masne kiseline (saturated fatty acids)
TEP - ukupna količina proteina (total extracted protein)
TI - intenzitet repa, procenat DNK u repu kometa (tail intensity)
TPC - ukupan sadržaj polifenola (total phenolic content)
TPS - ukupna količina polisaharida (total polysaccharide content)
TTC - 2,3,5- trifeniltetrazolijum hlorid (2,3,5-Trifeniltetrazolium hlorid (TTC))

UAE - ultrazvučna ekstrakcija (ultrasound-assisted extraction)

UFA - nezasićene masne kiseline (unsaturated fatty acids)

UV - ultraljubičasto zračenje

WHO - svetska zdravstvena organizacija (World Health Organization)

LISTA TABELA

Tabela 1. Glavne hemijske komponente *I. obliquus* i njihove biološke aktivnosti

Tabela 2. Oznake srpskih i mongolskih ekstrakata *I. obliquus* dobijenih različitim zelenim tehnikama ekstrakcije

Tabela 3. Bakterijski sojevi

Tabela 4. Spisak prajmera za RT-qPCR analizu korišćenih u istraživanju

Tabela 5. Ukupan prinos, sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja (TPC), ukupno ekstrahovanih proteina (TEP), ukupnih polisaharida (TPS), ukupnih glukana (TG), sadržaj α - i β - glukana u ekstraktima gljive *I. obliquus*

Tabela 6. Profil masnih kiselina (mg/100 g) ekstrakata *I. obliquus* dobijenih različitim zelenim tehnikama ekstrakcije

Tabela 7. Antibakterijska aktivnost ekstrakata gljive *I. obliquus* određena mikrodilucionom metodom i izražena vrednostima MIC i MBC (mg/mL)

Tabela 8. Sinergistički efekat odabranih kombinacija ekstrakata prema izolatu *E. faecalis*

Tabela 9. Sinergistički efekat odabranih kombinacija ekstrakata prema kliničkom izolatu MRSA

Tabela 10. Inicijalna adhezivnost i sposobnost formiranja biofilma odabranih ATCC i kliničkih izolata

Tabela 11. Antiadhezivni efekat različitih ekstrakta *I. obliquus* prema *P. aeruginosa* MMA83 i MRSA

Tabela 12. Antiadhezivni efekat različitih ekstrakta *I. obliquus* prema kliničkom izolatu *E. faecalis* i ATCC soju *E. faecalis*

Tabela 13. Efekat prevencije formiranja biofilma *P. aeruginosa* MMA83 i MRSA u prisustvu različitih ekstrakta *I. obliquus*

Tabela 14. Efekat prevencije formiranja biofilma kliničkog izolata *E. faecalis* i ATCC soja *E. faecalis* u prisustvu različitih ekstrakta *I. obliquus*

Tabela 15. Citotoksičnost subkritičnih vodenih ekstrakata gljive *I. obliquus*

LISTA SLIKA

Slika 1. Globalna geografska rasprostranjenost gljive *I. obliquus* u borealnim regionima

Slika 2. *I. obliquus* na stablu breze

Slika 3. Inotodiol i betulinska kiselina, dva važna triterpenoida iz gljive *I. obliquus*

Slika 4. Proces formiranja biofilma

Slika 5. Ultrazvučno kupatilo

Slika 6. Šema modifikovane mikrotalasne pećnice za MW

Slika 7. Model uređaja za ekstrakciju subkritičnom vodom

Slika 8. Šema uređaja za ekstrakciju superkritičnim ugljendioksidom

Slika 9. Sadržaj različitih šećera dobijen u ekstraktima *I. obliquus* dobijenim SWE; IM - mongolska Čaga; IS - srpska Čaga; SWE - subkritična vodena ekstrakcija (120 i 200 °C)

Slika 10. Sadržaj hlorogene kiseline u ekstraktima srpske i mongolske *I. obliquus* dobijenim različitim zelenim tehnikama ekstrakcije. Srednje vrednosti između različitih ekstrakta sa različitim malim slovima su značajno različite ($p < 0,05$)

Slika 11. Analiza glavnih komponenti za (a) prinos i ukupno 51 ispitano jedinjenje (b) ukupne šećere, glukane i kvalitativni sastav šećera i (c) ukupne fenole i fenolna jedinjenja; IM (tačka) i IS (trougao); Različiti tipovi ekstrakcija su predstavljeni različitim bojama, dok nazivi ispod tačke/trougla ukazuju na rastvarač/ temperaturu

Slika 12. Sposobnost neutralizacije slobodnih DPPH radikala ekstrakata IS i IM gljive *I. obliquus* dobijenih mikrotalasnom ekstrakcijom

Slika 13. Sposobnost neutralizacije slobodnih DPPH radikala ekstrakata IS i IM gljive *I. obliquus* dobijenih ultrazvučnom ekstrakcijom

Slika 14. Sposobnost neutralizacije slobodnih DPPH radikala ekstrakata IS i IM gljive *I. obliquus* dobijenih subkritičnom vodenom ekstrakcijom

Slika 15. Sposobnost neutralizacije ABTS $+•$ radikala ekstrakata IS i IM gljive *I. obliquus* dobijenih mikrotalasnom ekstrakcijom

Slika 16. Sposobnost neutralizacije ABTS $+•$ radikala ekstrakata IS i IM gljive *I. obliquus* dobijenih ultrazvučnom ekstrakcijom

Slika 17. Sposobnost neutralizacije ABTS $+•$ radikala ekstrakata IS i IM gljive *I. obliquus* dobijenih subkritičnom vodenom ekstrakcijom

Slika 18. Sposobnost redukcije jona bakra (Cu^{2+}) ekstrakata IS i IM gljive *I. obliquus* dobijenih mikrotalasnom ekstrakcijom

Slika 19. Sposobnost redukcije jona bakra (Cu^{2+}) ekstrakata IS i IM gljive *I. obliquus* dobijenih ultrazvučnom ekstrakcijom

Slika 20. Sposobnost redukcije jona bakra (Cu^{2+}) ekstrakata IS i IM gljive *I. obliquus* dobijenih subkritičnom vodenom ekstrakcijom

Slika 21. Sposobnost heliranja jona gvožđa (Fe^{2+}) ekstrakata IS i IM gljive *I. obliquus* dobijenih mikrotalasnom ekstrakcijom

Slika 22. Sposobnost heliranja jona gvožđa (Fe^{2+}) ekstrakata IS i IM gljive *I. obliquus* dobijenih ultrazvučnom ekstrakcijom

Slika 23. Sposobnost heliranja jona gvožđa (Fe^{2+}) ekstrakata IS i IM gljive *I. obliquus* dobijenih subkritičnom vodenom ekstrakcijom

Slika 24. Kinetika rasta kliničnog izolata MRSA u prisustvu najaktivnijih ekstrakata gljive *I. obliquus* pri najvišoj testiranoj koncentraciji ekstrakata (20 mg/mL)

Slika 25. Kinetika rasta *E. faecalis* ATCC 29219 u prisustvu najaktivnijih ekstrakata gljive *I. obliquus* pri najvišoj testiranoj koncentraciji ekstrakata (20 mg/mL)

Slika 26. Efekat ekstrakata srpske *I. obliquus* na produkciju ekstraćelijskih polimernih supstanci matriksa biofilma *P. aeruginosa* MMA83

Slika 27. Efekat ekstrakata srpske *I. obliquus* na produkciju ekstraćelijskih polimernih supstanci matriksa biofilma *P. aeruginosa* MMA83

Slika 28. Vizualizacija biofilma fluorescentnom mikroskopijom. Uticaj IS VAE H_2O , IM VAE H_2O , IS SWE IM 200 °C, SWE 200 °C ekstrakata na formiranje i dekompoziciju formiranog biofilma

Slika 29. Vizualizacija biofilma skenirajućom elektronskom mikroskopijom. Uticaj IS VAE H_2O , IM VAE H_2O , IS SWE 200 °C, IM SWE 200 °C ekstrakata na formiranje biofilma *P. aeruginosa* MMA83

Slika 30. RT-qPCR analiza korišćena je za ispitivanje promene nivoa ekspresije gena nakon tretmana *P. aeruginosa* MMA83 odabranim ekstraktima gljive *I. obliquus* u poređenju sa netretiranim MMA83

Slika 31. Citotoksična aktivnost subkritičnih vodenih ekstrakata gljive *I. obliquus* na MRC-5 ćelijama

Slika 32. Citotoksična aktivnost subkritičnih vodenih ekstrakata gljive *I. obliquus* na Hs 294T ćelijama

Slika 33. Citotoksična aktivnost subkritičnih vodenih ekstrakata gljive *I. obliquus* na SW 620 ćelijama

Slika 34. Genotoksična aktivnost subkritičnih vodenih ekstrakata gljive *I. obliquus* na MRC-5 ćelijama

Slika 35. Genotoksična aktivnost subkritičnih vodenih ekstrakata gljive *I. obliquus* na Hs 294T ćelijama

Slika 36. Genotoksična aktivnost subkritičnih vodenih ekstrakata gljive *I. obliquus* na SW 620 ćelijama

1. Uvod

Poslednju deceniju je obeležio ogroman porast upotrebe lekovitih gljiva, kao dijetetskih suplemenata i funkcionalne hrane (Arshadi i sar., 2023). Sve veća primena prirodnih lekovitih supstanci poreklom iz bioloških izvora doživljava renesansu snažno podržanu razvojem tehnologije. Sve je manji udeo manifakturnog rada, posebno u proizvodnji sirovina zbog sve naprednije mehanizacije. Prerada sirovina uključuje ekstrakciju, te upotrebu hemikalija, kao i primenu brojnih tehnoloških rešenja čime se proizvodi brže i efikasnije. Međutim, sve to dovodi do povećanja ugljeničnog otiska, odnosno povećanja globalne emisije ukupnih gasova staklene bašte koji predstavlja jedan od najznačajnijih indikatora zagađenja životne sredine. Tako na primer, da bi se dobio komercijalni dijetetski preparat na bazi lekovitih gljiva potrebno je obezbediti sirovinu (komercijalni uzgoj), potom sprovesti ekstrakciju, te uobličiti proizvod tako da ispunjava farmaceutske zahteve.

Obe faze se u velikoj meri oslanjaju na fosilna goriva, bilo za pokretanje proizvodnje ili za proizvodnju hemikalija (npr. rastvarača) što izaziva emisiju gasova staklene bašte od skoro 200 miliona tona godišnje, uz povećanje od 10% u periodu od 2012. do 2021. godine kako je izvestila Agencija za Zaštitu Životne Sredine Sjedinjenih Američkih Država (EPA, 2024). Sa porastom cene energenata i težnjom za smanjenjem emisije CO₂ proizvođači su pred izazovom da pronađu nove načine ekstrakcije te smanje potrošnju energije, rastvarača, a time i ispunili zakonske zahteve u pogledu emisije i bezbednosti proizvoda (Chemat i sar., 2019). Pitanje je kako do 2050. godine ostvariti ciljeve održivog razvoja (Pariski sporazum) i približiti se nultoj emisiji? Završena je prva faza, priznavanje problema i njihove kompleksnosti. Sledeća je rešavanje problema iz različitih uglova, što je praćeno snažnom podrškom istraživačke zajednice (Bradu i sar., 2023).

Zelene tehnologije, koje se koriste za proizvodnju dobara i usluga sa manjim ili nultim ugljeničnim otiskom, predstavljaju dobru priliku za dekarbonizaciju hemijskog, medicinskog, poljoprivrednog i prehrambenog sektora. Postoji nekoliko opcija za postizanje održivog razvoja, npr. razvoj ekološke biotehnologije, korišćenje bio-zasnovanih materijala i bioenergije, inženjeringa kao i proizvodnja hemikalija na zeleniji način. Naravno, sve ovo treba da bude podržano odgovarajućim zakonima (Bradu i sar., 2023). Štaviše, upotreba "zelenih" rastvarača bila bi bezbedna i poželjna, a podrazumevala bi izdvajanje prirodnih jedinjenja bez upotrebe štetnih hemikalija (Picot-Allain i sar., 2021). Kako je saopštila Evropska Komisija, za svaki kilogram aktivnog sastojka proizvoda široke potrošnje potrebno je oko 100 kilograma različitih materijala/sirovina za proizvodnju (EU, 2017). Sa jedne strane, koriste se prirodni proizvodi i dijetetski suplementi zbog njihove zdravstvene koristi, prirodnog porekla sa manje ili nimalo neželjenih efekata, dok sa druge strane proizvodnim postupkom povećavamo zagađenost naše planete (Hossain i sar., 2022). Isti dualizam pogađa i sektor dijetetskih preparata na bazi lekovitih gljiva te su rešenja koja se dotiču zelenih tehnologija dobrodošla, i jedan od najznačajnijih pravaca razvoja ove oblasti.

2. Pregled literature

2.1. Zelene ekstrakcije

Ekstrakcija prirodnih proizvoda datira još od davnina i omogućava selektivno izdvajanje bioaktivnih jedinjenja iz kompleksnih matriksa (Gbashi i sar., 2016). Nutritivno važna jedinjenja iz gljiva ekstrahuju se bilo konvencionalnim ili savremenim tehnikama ekstrakcije. Konvencionalne ekstrakcione tehnike uključuju ekstrakciju po Soxhletu, maceraciju i hidrodestilaciju (Giacometti i sar., 2018). Međutim, ovi procesi dugo traju, zahtevaju skupe, lako isparljive, zapaljive organske rastvarače koji nisu dovoljno selektivni jer rastvaraju i teško isparljive komponente velikih molekulskih masa (Azmir i sar., 2013). Pored toga, tradicionalne tehnike ekstrakcije podrazumevaju potrošnju velike količine sirovina i organskih rastvarača što ove procese čini neekonomičnim i nepogodnim sa aspekta održivog razvoja. Na primer, polisaharadni ekstrakti dobijeni iz lekovitih gljiva se komercijalno proizvode kombinacijom etanolne i vodene ekstrakcije pod pritiskom što zahteva značajno vreme, fizički rad i električnu energiju (Vunduk i sar., 2023). Pored toga, pojedine konvencionalne tehnike koriste toksične rastvarače, daju niske prinose, mogu izazvati termičku degradaciju aktivnih jedinjenja, gubitak isparljivih jedinjenja, a mogu dovesti i do zaostajanja rastvarača u željenim jedinjenjima i krajnjim proizvodima (Tiwari, 2015; Mishra i sar., 2021; Majid i sar., 2023). Zbog svih navedenih nedostataka, postoji izražena potreba za razvojem efikasnijih, održivijih i ekološki prihvatljivijih tehnika ekstrakcije koje su definisane zajedničkim terminom "Zelene Ekstrakcije" (Chemat i sar., 2012; Fraterrigo Garofaloi sar., 2021).

Savremene ekstrakcione tehnike se zasnivaju na pronalaženju rešenja koja će smanjiti potrošnju energije, smanjiti ili isključiti upotrebu organskih rastvarača i obnovljivih prirodnih resursa, svesti na minimum stvaranje nusproizvoda i otpada, ali i osigurati visokokvalitetan ekstrakt (Raj i sar., 2023). Chemat i sar., (2019) i Galanakis (2013) su saopštili da je zelenim ekstrakcionim tehnikama moguće uštedeti oko 80% energije, smanjiti vreme ekstrakcije za oko 90% a da se svojstva ekstrakata ne promene. S obzirom na rastuću potražnju bioaktivnih jedinjenja i ograničene prirodne resurse neophodan je razvoj novih procedura kao i rastvarača. Primena zelenih rastvarača za ekstrahovanje bioaktivnih jedinjenja može doprineti razvoju hemijskog inženjeringa i održive proizvodnje (Chemat i sar., 2017). U cilju dobijanja što većeg prinosa bioaktivnih proizvoda u što kraćem vremenskom periodu, razvijene su moderne nekonvencionalne tehnike ekstrakcije, kao što su: mikrotalasna (Rodsamran i Sothornvit, 2019), ultrazvučna (Menezes i sar., 2019), subkrična vodena ekstrakcija (Vladić i sar., 2019), ekstrakcija superkričnim CO₂ (Vladić i sar., 2023), ekstrakcija uz pomoć enzima, uz pomoć implusnog električnog polja, kao i ekstrakcija pod negativnim pritiskom uz pomoć kavitacije. Sve savremene inovativne tehnologije koje su označene kao zelene imaju specifične prednosti. Međutim, imaju i ograničenja koja su u vezi sa veoma visokim investicionim troškovima, kao i nedostatkom regulatornih odobrenja i mogućnostima primene na industrijskom nivou (Giacometti i sar., 2018).

Pregledom dostupne literature nije utvrđeno da su do sad vršena uporedna ispitivanja zelenih tehnologija za dobijanje ekstrakata gljiva, kao ni njihov uticaj na hemijski sastav i biološka svojstva ekstrakata. Stoga, nije poznato u kojoj meri bi i na koji način ekstrakciona tehnologija uticala na proizvodni sektor. Sa druge strane, nove informacije bazirane na eksperimentalnim podacima mogle bi se direktno primeniti u praksi i uticati na donošenje

odluka o investiranju i adaptaciji postojeće proizvodnje, u korist potrošača, proizvođača i planete.

2.1.1. Mikrotalasna ekstrakcija

Mikrotalasna ekstrakcija (MW- *microwave-assisted extraction*) je jedna od najperspektivnijih novih ekstrakcionih tehnika pri kojoj se željeni materijal izlaže dejstvu mikrotalasa, pod čijim uticajem se materijal zagreva, voda isparava, stvara se visok pritisak, dolazi do pucanja ćelijskih zidova i oslobađanja željenog unutarćelijskog sadržaja (Roselló-Soto i sar., 2016). Ovaj tip ekstrakcije karakteriše smanjena upotreba rastvarača, ponekad i odsustvo ukoliko materijal ima visok udeo vodom, manji utrošak energije, kraće vreme trajanja procesa, veći prinosi i bolji kvalitet ekstrahovanih jedinjenja (Périno-Issartier, 2011). Glavne prednosti u odnosu na ekstrakciju superkritičnim fluidima su niža cena i jednostavnija procesna oprema, dok u poređenju sa ekstrakcijom potpomognutom ultrazvukom odlučujući faktor je kraće vreme izvođenja ekstrakcije (Zhang i sar., 2011). S obzirom da delovanje mikrotalasa može dovesti do promene hemijske strukture ciljanih bioaktivnih jedinjenja ili njihove degradacije ovaj tip ekstrakcije nije pogodan za izdvajanje termolabilnih jedinjenja (Wen i sar., 2019). Mikrotalasna tehnika se obično koristi za ekstrahovanje organskih jedinjenja, dok su najčešće korišćeni rastvarači voda i etanol jer imaju dobru apsorpcionu moć mikrotalasa (Alupului, 2012). Od organskih rastvarača često se koriste aceton i metanol, ali zbog njihove toksičnosti i visoke cene, bolji izbor za ekstrahovanje prirodnih bioaktivnih jedinjenja je etanol (Zhu i sar., 2016). Takođe, značajan uticaj na efikasnost mikrotalasne ekstrakcije ima snaga mikrotalasa. Veća snaga mikrotalasa dovodi do bržeg zagrevanja i intenzivnijeg kretanja molekula unutar rastvarača i korišćenog materijala (Azmir i sar., 2013).

Postoji nekoliko istraživanja koja su pokazala bolju efikasnost mikrotalasne ekstrakcije u poređenju sa drugim konvencionalnim tehnologijama kada je u pitanju dobijanje nutritivno vrednih jedinjenja iz gljiva. Özyürek i sar., (2014) su pokazali da je znatno viši prinos fenola i flavonoida iz gljiva *Boletus edulis* i *Lactarius volemus* detektovan u ekstraktima dobijenim mikrotalasnom ekstrakcijom u odnosu na konvencionalne tehnike. Kod istih ekstrakata je primećena i bolja antioksidativna aktivnost. U drugom istraživanju autori su koristili mikrotalasnu ekstrakciju u kombinaciji sa ultrazvukom za izdvajanje polisaharida iz *Lycium barbarum*. Prinos je u slučaju mikrotalasa bio viši a komponenta od interesa potentnija u biološkom smislu kad se uporedi sa tradicionalnim ekstrakcijama vrelom vodom (Dong i sar., 2011). Navedena tehnika se često koristi za ekstrakciju polifenolnih jedinjenja iz materijala biljnog porekla. U jednom od istraživanja pokazano je da je mikrotalasna ekstrakcija u kombinaciji sa etanolom dala mnogo viši prinos ukupnih fenolnih jedinjenja iz masline nego kada je kao rastvarač korišćen aceton (Rafiee i sar., 2011). Takođe, efikasno se koristi za proizvodnju mnogih antibiotika, poput norfloksacina, ciprofloksacina, tetraciklina iz mikroorganizama zemljišta i ekstrahovanje antibiotika iz komposta (Ying Li i sar., 2013).

2.1.2. Ultrazvučna ekstrakcija

Ultrazvučna ekstrakcija (UAE - *ultrasound-assisted extraction*) je jeftin, isplativ i ekološki prihvatljiv proces koji zadovoljava principe zelenih tehnologija. Ultrazvuk je relativno jednostavan za upotrebu, izvodi se lako u ultrazvučnom kupatilu, zahteva male investicije u poređenju sa drugim tehnikama ekstrakcije (Tiwari, 2015). Veoma je efikasna tehnika jer oštećuje ćelijski zid kod bioloških materijala i povećava prodiranje rastvarača u materijal, čime se povećava prinos (Dobiáš i sar., 2010). Efekat ekstrakcije ultrazvukom je zbir nekoliko fizičkih i hemijskih pojava, uključujući agitaciju, vibracije, pritisak, udarne talase, sile smicanja, kavitaciju, mikromlaznice, kapilarnost, akustično strujanje kao i formiranje

radikala koji su odgovorni za ultrazvučni efekat (Chemat i sar., 2017). Kada se ova tehnika kombinuje sa rastvaračima, omogućava kraće trajanje ekstrakcije i upotrebu niže temperature što može potencijalno biti način za očuvanje termolabilnih jedinjenja (Barba i Grimi, 2015). Glavne prednosti ultrazvučne ekstrakcije su jednostavnost, skraćanje trajanja ekstrakcije, manja potrošnja toplotne energije i rastvarača, kao i smanjenje emisije CO₂. Istovremeno se zadržava čistoća finalnog proizvoda (Tiwari, 2015). Pozitivni efekti primene ove ekstrakcione tehnike su i povećanje prinosa ekstrakcije i željenih bioaktivnih jedinjenja. Međutim, primećeno je da sa povećanjem frekvencije i vremena ekstrakcije dolazi do smanjenja antioksidativne aktivnosti (Golmohamadi i sar., 2013).

Nekoliko autora koristilo je ultrazvučnu tehniku za ekstrahovanje nutritivno vrednih jedinjenja iz lekovitih gljiva i biljaka. Cheung i sar., (2013) su pokazali da je ultrazvuk bio efikasniji za izdvajanje velikih molekula, poput polisaharida rastvorljivih u vodi iz medicinskih gljiva *Grifola frondosa* i *Lentinus edodes* u poređenju sa ekstrakcijom toplom vodom (povećanje od 52 – 129%). Sa druge strane, Petrović i sar., (2014) su utvrdili da su vodeni ekstrakti *Laetiporus sulphureus* dobijeni pomoću ultrazvuka sadržali više ukupnih fenolnih jedinjenja, ali i imali bolja antioksidativna i antimikrobna svojstva u odnosu na ekstrakte dobijene klasičnom ekstrakcijom. Etarska ulja ekstrahovana su iz listova pepermint (Martínez i Martín-Belloso, 2007), artemizije (Asfaw i sar., 2005), lavande (Da i sar., 2009), belog luka (Kimbaris i sar., 2006) i cvetova citrusa (Gachovska i sar., 2010) pomoću ultrazvučne ekstrakcije. Primena ultrazvučne ekstrakcione tehnike u preradi hrane je od značajnog interesa zbog povećanja prinosa polifenola, antocijanina, aromatičnih jedinjenja, polisaharida, ali i etarskih ulja iz bioloških materijala (Fomo i sar., 2020).

2.1.3. Ekstrakcija subkritičnom vodom

Među raznim novim tehnologijama zelene ekstrakcije koje su u primeni poslednjih godina, subkritična vodena ekstrakcija (SWE - *Subcritical Water Extraction*) je najperspektivnija. Ova tehnika fokusirana je na prirodne proizvode kao polazne matrice i najčešće su to: biljke (62,3%), nusproizvodi hrane (29,0%), morske alge (4,9%) i gljive (3,8%) (Cheng i sar., 2021). Voda je izrazito polarni molekul sa visokom vrednošću dielektrične konstante na sobnoj temperaturi i pri atmosferskom pritisku, pa kao takav nije u stanju da rastvori većinu organskih jedinjenja (Fraterrigo Garofalo i sar., 2021). S povećanjem temperature modifikuju se njena svojstva, dolazi do smanjenja viskoziteta i površinskog napona, kao i povećanja difuznog karaktera vode. Povećanjem temperature sa 25 °C na 250 °C, dielektrična konstanta se smanjuje sa 80 na 27, što je veoma blisko metanolu (33) i etanolu (24) (Fraterrigo Garofalo i sar., 2021). Pod ovakvim uslovima voda ima mogućnost rastvaranja širokog opsega umereno i niskopolarnih jedinjenja (Chye i sar., 2010). Polarnije komponente sa većom rastvorljivošću u vodi na sobnoj temperaturi, ekstrahuju se efikasnije na nižim temperaturama, dok umereno polarnim i nepolarnim komponentama odgovara manja polarnost rastvarača, koja se ostvaruje pri povišenoj temperaturi. Ova nova tehnika ekstrakcije sprovodi se na temperaturi između 100 °C (tačka ključanja) i 374 °C (kritična tačka) i pritiscima dovoljno visokim da se održi tečno stanje vode (Haghighi i Khajenoori, 2013). Pored temperature, parametri koje još treba uzeti u obzir su pritisak (varira u opsegu od 10 do 80 Pa), pH, protok, vreme ekstrakcije i hemijska struktura jedinjenja (Zakaria i Kamal, 2016). Povišeni pritisak na visokim temperaturama ubrzava ekstrakciju posebno ukoliko je metabolit zarobljen unutar pora ćelijskog zida i takođe doprinosi ulasku rastvarača u zone ćelijskog zida koje inače nisu pokrivene vodom (Gbashi i sar., 2016). Štaviše, subkritična vodena ekstrakcija u poređenju sa konvencionalnim tehnikama ima nekoliko izuzetnih prednosti: koristi vodu umesto organskih rastvarača, ekstrakcija je brža, relativno

su niži troškovi procesa a ekstrakt je kvalitetniji (Zakaria i Kamal, 2016). Maksimalnu radnu temperaturu ekstrakcije treba pažljivo odabrati, prema materijalu koji se koristi kako bi se izbegla degradacija jedinjenja od interesa. Pored ovog nedostatka neophodan je i veliki oprez kako bi se osigurao bezbedan radni sistem pod visokim pritiskom i temperaturom (Cheng i sar., 2021).

Nekoliko vrsta lekovitih gljiva je ekstrahovano subkritičnom vodenom tehnikom kao ekološki prihvatljivom metodom za dobijanje biološki aktivnih proizvoda (Rodríguez-Seoane i sar., 2022). Subkritična vodena ekstrakcija korišćena je za ekstahovanje bioaktivnih jedinjenja iz zlatne bukovače na visokim temperaturama (50 - 300 °C) i pokazano je da ekstrakti dobijeni na višim temperaturama (250 - 300 °C) poseduju bolju antioksidativnu sposobnost (Jo i sar., 2013). Sa druge strane, ekstrakti gljive *I. obliquus* dobijeni ovom tehnikom pokazali su najveću antioksidativnu aktivnost na temperaturi ispod 250 °C (Seo i Lee, 2010). Dosadašnja istraživanja uglavnom su bila fokusirana na ekstrakciju polisaharida i fenola iz gljiva. Međutim, subkritična vodena ekstrakcija interesantna je i za ekstrahovanje jedinjenja niskog polariteta (tj. masnih kiselina) (Roselló-Soto i sar., 2016). Različiti biljni materijali ekstrahovani su ovom ekstrakcionom tehnikom, uključujući bilje (Cho i sar., 2020; Yulianto i sar., 2018), povrće sa lekovitim osobinama (Tomšik i sar., 2017), voće (Wang i sar., 2021), uljane kulture i žitarice (Wu i sar., 2018; Bodoira i sar., 2017) i listovi različitih čajeva (He i sar., 2018). Jedinjenja koja se ekstrahuju iz ovih prirodnih proizvoda su najčešće: alkaloidi, ugljeni hidrati, eterična ulja, polifenoli, flavonoidi, organske kiseline, glikozidi, hinoni, terpeni i steroli (Cheng i sar., 2021).

2.1.4. Ekstrakcija superkritičnim ugljendioksidom

Interesovanje za superkritičnu ekstrakciju fluidima, posebno superkritičnu ekstrakciju ugljendioksidom (SFE - *Supercritical Fluid Extraction*) poraslo je tokom poslednje četiri decenije. Ova tehnologija je počela da se razvija u Nemačkoj 1979. godine i doživela primenu u prehrambenoj industiji (ekstrakcija kofeina iz zrna kafe i čaja, ekstrakcija hmelja, voskova iz propolisa) (Majid i sar., 2019). Dalji razvoj evoluirao je u ekološki prihvatljiv process primenljiv kako u prehrambenoj, tako i u farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji. Superkritična ekstrakcija je postupak u kom se kao rastvarač koristi fluid koji se nalazi u superkritičnom stanju, na temperaturi i pritisku iznad njihovih kritičnih tačaka (Mohamed i Mansoori, 2002). Fizičko-hemijske karakteristike superkritičnog fluida koje se nalaze između karakteristika tečnosti i gasova, čine ih efikasnim rastvaračima (Sahena i sar., 2009). Superkritični fluidi poseduju veliku gustinu koja je bliska gustini tečnosti, što omogućava efikasnije rastvaranje. S druge strane, poseduju visoku difuzivnost i nizak viskozitet, kao gasovi, što doprinosi lakšoj penetraciji u materijal i rastvaranje (Sahena i sar., 2009). Većina superkritičnih sistema ekstrahuje jedinjenja koristeći superkritični ugljendioksid, umesto organskih rastvarača (Fraterrigo Garofalo i sar., 2021). Ovaj fluid se pokazao kao veoma poželjan rastvarač za ekstrakciju nepolarnih, termolabilnih jedinjenja, netoksičan je, nezapaljiv, jeftin, lako dostupan, i može se reciklirati (Fomo i sar., 2020). Pošto je nepolarni molekul ima mali afinitet prema polarnim komponentama i to je jedan od najvećih nedostataka ove ekstrakcione tehnike. Ovaj problem može se prevazići dodavanjem više polarnih ko-rastvarača, kao što su voda ili etanol, čime se povećava afinitet rastvarača prema polarnim komponentama (Herrero i sar., 2010). Još jedna od mana je visoka cena procesne opreme. Ugljendioksid je u potpunosti ekološki prihvatljiv, isparava na niskim temperaturama što omogućava čist finalni ekstrakt, poseduje povoljna svojstva za postizanja superkritičnog stanja ($T_k = 31,06 \text{ °C}$, $P_k = 73,8 \text{ Pa}$), takođe nema sekundarnih proizvoda koji su štetni po okolinu (Jokić i sar., 2011).

Ekstrakcija superkričnim ugljendioksidom poslednjih decenija ima važnu ulogu za ekstrakciju nutritivnih jedinjenja iz različitih izvora, uključujući gljive. Vidović i sar., (2011) su pokazali da je ekstrakcija superkričnim ugljendioksidom poboljšala prinos masnih kiselina iz ispitivane gljive *Boletus edulis* u poređenju sa konvencionalnim metodama ekstrakcije. U ovom istraživanju je uočeno da se prinos masnih kiselina povećao sa povećanjem pritiska i vremena ekstrakcije, a takođe se izdvojila linoleinska kiselina u superkričnim ekstraktima. U drugom istraživanju, gljiva *Pleurotus ostreatus* tretirana je toplom vodom, a potom superkričnim ugljendioksidom kako bi se dobili ekstrakti bogati antioksidativnim polisaharidima (Rodrigues Barbosa i sar., 2020). Ova tehnika ekstrakcije široko se koristi za ekstrahovanje mnogih vrednih bioaktivnih jedinjenja iz biljnog materijala. Nekoliko istraživanja bilo je fokusirano na ovu ekstrakcionu tehniku, izdvajanje bioaktivnih jedinjenja iz mahune kakaa (Valadez-Carmona i sar., 2018), šećerne repe i šećerne trske (Varaee i sar., 2019), kao i bademovog ulja (Salinas i sar., 2020). U nekim istraživanjima ekstrakciji superkričnog ugljendioskida dodat je ko-rastvarač kako bi se ekstrahovala i polarna jedinjenja. Ekstrakcija superkričnim ugljendioksidom na bazi 10% ko-rastvarača etanola je bila efikasnija za selektivnu ekstrakciju cijanidin glikozida, elaginske kiseline i kvercetin glikozida iz borovnice (Babova i sar., 2016). U drugom istraživanju, korišćena je ista ekstrakciona tehnika i etanol kao ko-rastvarač da bi se ostvario visok ukupni sadržaj fenola iz kore manga (Garcia-Mendoza i sar., 2015).

2.2. Čaga (*Inonotus obliquus*)

Inonotus obliquus (Fr.) Pilát. Je, poznata kao Čaga, je crno-braon parazitska gljiva koja pripada porodici *Hymenochaetaceae* (He i Dai, 2012). Rod *Inonotus* rasprostranjen je u umerenim i borealnim regionima severne hemisfere, uključujući hladne klimatske regione Severne Amerike, Azije, centralne i severne Evrope, obuhvata oko 100 vrsta u širem smislu i sve su identifikovane kao biljni paraziti (Slika 1) (Abu-Reidah i sar., 2021; Zhou i Wang, 2015). Ovaj rod je u Evropi zastupljen samo sa 4 vrste, a jedna od njih je *I. obliquus* (Szychowski i sar., 2018). Ova parazitska gljiva izaziva razgradnju živih stabala domaćina na kojima raste (Slika 2). Glavni domaćin Čage su razne vrste breza (*Betula* spp.), i drugi retki domaćini kao što su bukva (*Fagus* spp.), jova (*Alnus* spp.), hrast (*Quercus* spp.), javor (*Acer* spp.) i topola (*Populus* spp.) (Lee i sar., 2008). Čaga uglavnom živi na višim nadmorskim visinama gde, zbog izuzetno niskih temperatura, veoma sporo raste (Luo i sar., 2021). Ova gljiva inficira koru stabla koja su stara oko 30 - 50 godina i može da raste na stablu još 30 - 80 godina, bez znakova propadanja domaćina (Zheng i sar., 2010). Na zaraženim stablima gljiva formira nepravilane sterilne čepiće koji liče na ugalj, sa tamno braon pulpom koja je nastala od isprepletanog veoma gustog micelijuma (Lee i sar., 2008). Zbog prisustva melanina, pseudosklerocijum i micelijum su uglavnom tamno obojeni (Babitskaya i sar., 2000). Pseudosklerocija raste veoma sporo, tek nakon 10 – 15 godina dostiže prečnik veći od 10 cm, dok na starim stablima izrasline mogu biti veće od 50 cm (Zheng i sar., 2010). Infekcija se širi bazidiosporama koje proizvodi pseudosklerocija u toplom periodu godine, dok su insekti i vetar glavni vektori za širenje spora *I. obliquus* (Cha i sar., 2011).



Slika 1. Globalna geografska rasprostranjenost gljive *I. obliquus* u borealnim regionima



Slika 2. *I. obliquu* na stablu breze
<https://www.shutterstock.com/search/inonotus-obliquus>

2.3. Bioaktivna jedinjenja *I. obliquus*

I. obliquus je gljiva kojoj odgovaraju hladni klimatski uslovi sa čestim temperaturnim oscilacijama (Bolwell i sar., 2001). Kao odgovor na brojne abiotičke i biotičke faktore, poput smrzavanja, UV zračenja, bakterijskih i virusnih infekcija *I. obliquus* je razvila složene odbrambene mehanizme koji uključuju proizvodnju raznovrsnih bioaktivnih komponenti: polisaharide, proteine, polifenolna jedinjenja, masne kiseline, terpenoide, melanin i druga

jedinjenja (Peng i Shahidi, 2022; Duru i sar., 2019). Njihova svojstva su uglavnom nedovoljno istražena uprkos vekovima staroj primeni, a klinički podaci su relativno oskudni. Različita istraživanja su pokazala da jedinjenja poreklom iz Čage imaju farmakološka svojstva, poput antioksidativnog, antitumorskog, antimikrobnog, antifungalnog, antiparazitskog, antivirusnog, antidijabetskog, imunomodulatornog, antiinflamatornog, neurodegenerativnog, a od nedavno je dokazan i efekat protiv umora (Szychowski i sar., 2018; Wang i sar., 2015; Han i sar., 2019; Zhang i sar., 2020).

2.3.1. Polisaharidi

Polisaharidi su dugi, složeni lanci velikog broja monosaharida povezanih glikozidnim vezama i uključeni su u brojne biološke procese, poput embrionalnog razvića, stvaranja ćelijskog imuniteta i dr. (Zhao i sar., 2016). Gljive sadrže mnogo različitih polisaharida, poput heteropolisaharida bogatih fruktozom, galaktozom, manozom i ksilozom, zatim glukane, kao i polisaharide ćelijskog zida (Smiderle i sar., 2017). Ćelijski zid gljiva sastoji se od dva glavna tipa polisaharida, krutih fibrilarnih struktura sastavljenih od celuloze ili hitina i strukture nalik matriksu koju čine α - i β -glukani i glikoproteini (Zhu i sar., 2014). Najšire proučavani polisaharidi iz gljiva su β -glukani čije se strukturne karakteristike i biološke aktivnosti razlikuju u zavisnosti od izvora (Morales i sar., 2019). Najnovija istraživanja pokazuju da mnoge vrste polisaharida poreklom iz gljiva imaju obećavajuću farmakološku i terapijsku primenu. Mnogi faktori utiču na njihovu bioaktivnost, kao što su molekulska težina, monosaharidni sastav, primarna struktura, rastvorljivost u vodi, vrsta i stepen grananja, naelektrisanje polimera, prostorna konfiguracija, glikozidna veza i dr. (Wang i sar., 2018). Generalno, polisaharidi veće molekulske mase imaju bolji biološki efekat i antitumorsku aktivnost (Su i sar., 2017). Sa druge strane, polisaharidi male molekulske mase su poželjni za određene terapijske primene, posebno zbog njihove sposobnosti da lako difunduju kroz biološke barijere (Kit i sar., 2021). Dokazano je da su mnogi prirodni polisaharidi i proteinski polisaharidni kompleksi dobijeni iz gljiva netoksični i nemaju štetne efekte (Hu i sar., 2017). Zbog brojnih bioloških aktivnosti koje polisaharidi imaju, neohodno je više pažnje usmeriti na razvoj novih tehnika za ekstrakciju polisaharida iz gljiva.

U poslednjoj deceniji, interesovanje za *I. obliquus* stalno raste posebno zbog činjenice da je ova gljiva veoma bogata raznolikim polisaharidima. Istraživanja su pokazala da polisaharidi iz ove gljive imaju širok spektar farmakoloških i medicinskih svojstava, antitumorska, antioksidativna, hipoglikemijska i efekat jačanja imuniteta (Diao i sar., 2014). Iako se polisaharidi *I. obliquus* potencijalno smatraju dobrim antioksidativnim kandidatom, ograničeni prirodni resursi i teško veštačko uzgajanje pseudosklerocije ove gljive onemogućavaju dobijanje velike količine prirodnih polisaharida (Hu i sar., 2017). Isti autori su otkrili da su prečišćeni polisaharidi iz Čage pokazali odličan efekat protiv hroničnog pankreatitisa kod miševa. Pored toga, Diao i sar. (2014) su utvrdili da su polisaharidi dobijeni iz *I. obliquus* imali antihipoglikemijski efekat kod miševa, što je ukazalo na potencijalnu terapiju dijabetesa. Nešto ranije Huang i sar. (2012) su ekstahovali i prečistili pet polisaharida iz vodenih ekstrakata *I. obliquus* i otkrili da su polisaharidi sa najvećim sadržajem uronske kiseline i proteinskih supstanci imali najsnažnije antioksidativno dejstvo. Takođe, u ovom istraživanju je primećeno da su glukoza i manoza bili glavni monosaharidi izolovani iz Čage zajedno sa galaktozom i ramnozom, koji su pronađeni u manjim količinama.

2.3.2. Polifenolna jedinjenja

Polifenoli su biološki aktivni sekundarni metaboliti koji imaju aktivne grupe kao što su fenol hidroksil, alkoholni hidroksil i karboksil u svojoj molekularnoj strukturi (Yano i sar., 2006). Oni poseduju značajne fiziološke efekte kao jedna od najprisutnijih grupa fitohemikalija. Imaju vitalnu ulogu u hemijskoj odbrani, pigmentaciji, odbrani od patogena i predatora, pa čak u izgradnji struktura i rastu organizama. Na osnovu brojnih analiza utvrđeno je da su fenolne kiseline dominantna grupa polifenolnih jedinjenja koja se nalaze u višim gljivama (Karaman i sar., 2010). Biološka aktivnost fenolnih kiselina zavisi od broja hidroksilnih grupa i njihove pozicije u aromatičnom prstenu (Balik i sar., 2020). Uloga fenolnih kiselina kod arborealnih vrsta gljiva je povezana sa proizvodnjom enzima. Tokom procesa raspadanja drveta na čijoj kori se nalaze gljive koje su pričvršćene za svog domaćina dolazi do povećane proizvodnje slobodnih radikala kiseonika. Kako bi izbegle oksidativna oštećenja arborealne gljive su tokom evolucije razvile sposobnost sinteze antioksidanasa, a u ovom procesu se fenolne kiseline izdvajaju kao glavni predstavnici (Heleno i sar., 2015).

Poslednjih godina naučnici su izolovali polifenole iz medicinskih/jestivih gljiva, koji imaju značajne efekte u smislu antioksidativnog, antiinflamatornog i antitumorskog delovanja (Khan i sar., 2017). Kao efikasan i niskotoksičan narodni lek, *I. obliquus* se koristi za lečenje mnogobrojnih bolesti zahvaljujući prisustvu mnoštva fenolnih kiselina i flavonoida (Zheng i sar., 2009). Polifenoli pokazuju antioksidativna svojstva na različite načine, uključujući inhibiciju stvaranja slobodnih radikala, neutralizaciju reaktivnih vrsta kiseonika, inaktivaciju metala i zaštitu ćelija od oštećenja (Sánchez, 2017).

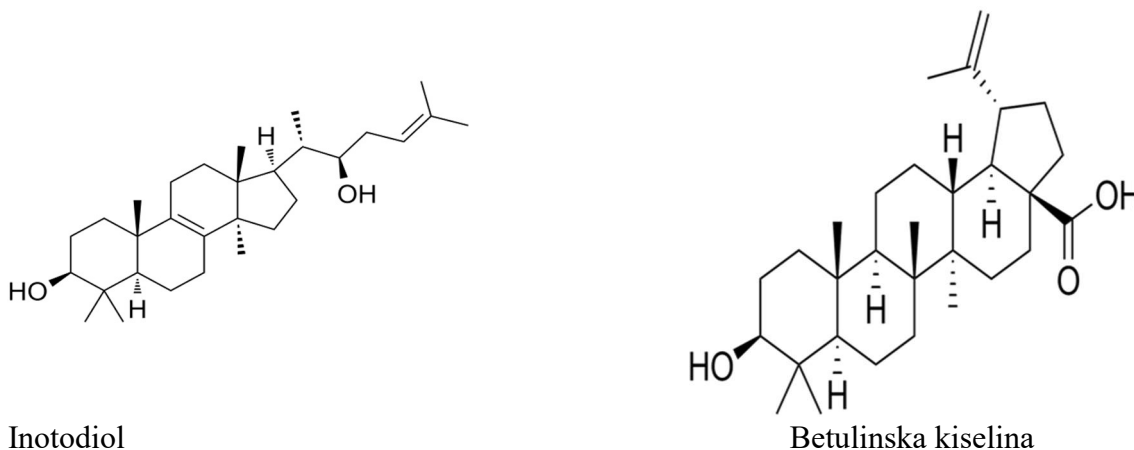
Polifenolna jedinjenja mogu se rastvoriti u alkoholima ili etrima zbog prisustva fenolnih hidroksilnih grupa u njihovoj strukturi. Najčešće se kao ekstraktant koristi etanol zbog lakšeg prodiranja u biološki materijal, visokog stepena ekstrakcije i manje toksičnosti za ljudski organizam (Wang i sar., 2021). Najčešće ekstrahovane fenolne kiseline iz različitih ekstrakata *I. obliquus* su p-hidroksibenzojeva, galna, protokatehinska, p-kumarinska, vanilinska, ferulna, cimetna, kafeinska, hlorogena, elaginska i siriginska kiselina (Peng i Shahidi, 2022; Sułkowska-Ziaja i sar., 2023). Za neke od ovih kiselina potvrđena je biološka aktivnost, kafeinska kiselina ima antioksidativno, antitumorsko, antimikrobno, p-kumarinska i p-hidroksibenzojeva imaju antimikrobnu aktivnost, dok je za protokatehinsku dokazana antifungalna, antiinflamatorna, antioksidativna i neuroprotektivna aktivnost (Balik i sar., 2020).

Veoma važan antioksidans gljive *I. obliquus* je pigment melanin koji je široko rasprostranjen u prirodi i čija uloga je da zaštiti organizam od različitih štetnih uticaja iz spoljašnje sredine, kao što su UV zračenje, ekstremne temperature, slobodni radikali, toksični metali i enzimske degradacije (Wang i sar., 2018). Po poreklu je fenolno jedinjenje i nastaje transformacijama iz aminokiseline - tirozina. Prirodni melanin je polimerizovan sa aminokiselinama preko C-C veze, pa su obzirom na to definisani različiti oblici melanina (eumelanin, feomelanin). Takođe, kod gljiva se mogu naći forme melanina koje u svojoj strukturi ne sadže azotalomelanin, piomelanin) i nastaju oksidacijom polifenola npr. katehola ili 1,8-dihidroksinaftalena (Ahmad i sar., 2016). Poznato je da melanin iz *I. obliquus* pokazuje antioksidativnu aktivnost, međutim, u poslednje vreme sve su više proučavane i njegove probiotičke, antihemolizne, antiinflamatorne i hepatoprotektivne aktivnosti (Chen i sar., 2011; Mu i sar., 2012; Wang i sar., 2018). Istraživanja pokazuju da melanin dobijen iz *I. obliquus* pokazuje aktivnost prema virusu HIV-a, virusu Zapadnog Nila i virusu gripa (H1N1) (Tepljakova i sar., 2020).

2.3.3. Terpeni

Terpeni su klasa sekundarnih metabolita koji se nalaze u živim organizmima i deluju kao zaštitni agensi biljaka i gljiva od predatora i napada mikroba, kao signalni molekuli i kao ključne strukturne komponente biomembrana (Sharma i sar., 2017). Terpeni se obično dele na različite klase zasnovane na broju izoprenskih jedinica. Terpeni izolovani iz gljiva su najčešće triterpenoidi (Jia i sar., 2019). U jednom od istraživanja ukupno je identifikovano 103 triterpenoida iz Čage (Peng i Shahidi, 2022). Neki od njih posebno privlače pažnju, poput inotodiola i betulinske kiseline zbog citotoksičnog potencijala na neke ćelijske linije tumora. Inotodiol se nalazi samo u *I. obliquus* u niskoj koncentraciji (oko 0,2%) i slabo je rastvorljiv u vodi (Slika 3) (Minh i sar., 2018). Privlači veliko interesovanje prehrambene i farmaceutske industrije zbog svojih moćnih bioloških aktivnosti (Nguyen i sar., 2023). Utvrđeno je da ima izuzetna antikancerogena (Zhang i sar., 2019), antioksidativna (Yan i sar., 2018), antiinflamatorna (Nguyen i sar., 2022), antialergijska svojstva (Nguyen i sar., 2020) kao i potencijal usporavanja procesa starenja (Peng i Shahidi, 2022).

Betulinska kiselina izolovana je iz različitih vrsta biljaka, a njeno ime potiče od srodnog triterpenoida betulina koji je prisutan u kori breze, domaćina *I. obliquus* (Slika 3) (Scheffler, 2019). Evropska agencija za lekove, odobrila je preparat koji sadrži oko 80% betulina i koji se koristi za lečenje površinskih rana kože i opekotina drugog stepena jer pokazuje superiorne efekte u odnosu na druge tretmane (Scheffler, 2019). Poznato je da betulinska kiselina ima citotoksični i citostatički efekat na neke ćelijske linije tumora, da ispoljava antibakterijsku, antivirusnu, antifungalnu i antioksidativnu aktivnost (Fradj i sar., 2019). Pored toga, pospešuje sintezu kolagena i elastina, i tako sprečava opuštanje kože (Sułkowska-Ziaja i sar., 2023).



Slika 3. Inotodiol i betulinska kiselina, dva važna triterpenoida iz gljive *I. obliquus*
<https://wildalaskachaga.com/benefits/sterols/>

Zbog brojnih medicinskih i nutritivnih vrednosti gljive *I. obliquus*, danas postoji sve veći broj komercijalnih proizvoda koji su dostupni, prvenstveno kao sušeni i u prahu. Međutim, za proizvodnju većine komercijalnih proizvoda koristi se Čaga ubrana sa breze, pošto se zna da je bogata korisnim bioaktivnim jedinjenjima (Thomas i sar., 2020). Intenzivno interesovanje za proizvode od Čage može da dovede do ozbiljnih ekoloških uticaja zbog prekomerne komercijalne berbe. Veštačka kultivacija *I. obliquus* pokazala se kao uspešna na krompir-dekstroznom agaru; primećeno je da je sadržaj bioaktivnih jedinjenja lanosterola, ergosterola

i inotodiola sličan sadržaju kod Čage iz prirode (Sun i sar., 2008). Takođe je uspešno realizovana i inokulacija stabala breze, pri čemu je gljiva spremna za berbu tri godine nakon inokulacije (Miina i sar., 2021).

2.4. Primena *I. obliquus* u tradicionalnoj medicini

U mnogim siromašnim zemljama gde nema mogućnosti pristupa sintetičkim komercijalnim lekovima, kako bi se poboljšalo zdravlje ljudi, neophodno je pronalažanje supstanci u prirodnom okruženju, a koje će ublažiti simptome bolesti (Szychowski i sar., 2018). Jedan od najstarijih dokumenata koji potvrđuje upotrebu Čage je rad Hipokrata, oca medicine, koji je koristio infuzije od ove vrste gljive za ispiranje spoljašnjih rana (Szczepkowski i sar., 2013). Od 16. veka *I. obliquus* se koristio kao narodni lek u Sibiru, Rusiji i drugim zemljama Istoka kao napitak (čaj) ili kao lek (mast) za lečenje bolesti želuca, crevnih parazita, tuberkuloze, dermatomikoze ili protiv bolova u zglobovima (Shikov i sar., 2014). Narodi Hanta u zapadnom Sibiru koristili su Čagu za lečenje bolesti srca i jetre, ali i za detoksikaciju organizma (Saar, 1991). Oni su mleli Čagu i dodavali je u svakodnevna pića, supe i jela. Tradicionalna upotreba ove gljive u medicinske svrhe, pre svega za lečenje kožnih iritacija i artitrisa, zabeležena je i u Severnoj Americi, na Aljasci (Scerbak i sar., 2016). Autohtoni narod Severne Amerike, Metisi, koriste Čagu za lečenje raka dojke, jetre, kože, debelog creva, grlića materice i pluća (Barkwell, 2018). Takođe, u severnoj i srednjoj Rusiji od Čage su pravljene tinkture koje su korišćenje za profilaksu i lečenje želudačnih problema. Tinkture su se pokazale kao netoksične i kod pacijenata se nisu javljale kontraindikacije, time se dodatno povećala upotreba *I. obliquus* kao terapijskog agensa. Zabeleženo je da su finski vojnici Čagu koristili kao zamenu za kafu u Drugom svetskom ratu koristeći je kao čaj (Baek i sar., 2018). U savremenoj Rusiji je često koriste lovci i stočari kako bi povećali svoju snagu i izdržljivost (Shikov i sar., 2014). Čaga se prvobitno koristila kao čaj, seckana je na sitne komade a potom kuvana, nešto kasnije je korišćena u obliku infuzija, sirupa, vodenog rastvora injekcija ili inhalacija, a takođe su od nje pravljene i antiseptički sapuni za spoljašnju upotrebu (Saar, 1991). Žene su se kupale ovim sapunima nakon menstruacije i porođaja i verovalo se da nikada nisu bile bolesne, a često su novorođenčad kupana vodom od Čage. Kasnije se antioksidativna aktivnost *I. obliquus* pokazala kao važna za prevenciju savremenih bolesti koje su povezane sa slobodnim radikalima, poput ubrzanog starenja, degenerativnih bolesti centralnog nervnog sistema, karcinoma (Park i sar., 2005). Da bi savremena medicina prihvatila bilo koju terapiju, sva zapažanja iz tradicionalne (narodne) medicine ili narodnih predanja moraju da ispune odgovarajuće kriterijume kroz naučna istraživanja koja će ili opovrgnuti ili potvrditi premise. Danas vlada veliko interesovanje za *I. obliquus* i njena lekovita svojstva. Pored priznate nutritivne vrednosti i upotrebe za lečenje raznih bolesti, domorodački narodi su je predstavili i kroz različite mitove. U Anishinaabe kulturi, domoroci su je dodavali u svećane lule za pušenje jer proizvodi slatko mirisni tamjan (Zmitrovich i sar., 2020). Sa druge strane, neki istoričari tvrde da je "Wisakecak" (mitološki lik) otkrio drvo breze sa Čagom (Rogers, 2016). Šetajući šumom, postao je pospan i okačio je suvo meso na koru drveta. Dok je spavao meso je počelo da truli a na brezi su se stvorile kraste. Kada je probao da jede shvatio je da je to čvrst komad, odlučio je da ostavi Čagu na drvetu za dobrobiti čovečanstva, što se kasnije ispostavilo kao dobra odluka zbog svih bioloških aktivnosti koje poseduje (Peng i Shahidi, 2022).

2.5. Savremena istraživanja – biološka aktivnost *I. obliquus*

Do sada je pokazano da *I. obliquus* sadrži brojna farmakološki aktivna jedinjenja sa oko 130 medicinskih svojstava, a neka od njih su predstavljena u Tabeli 1. Zahvaljujući različitim hemijskim komponentama koje sadrži *I. obliquus* i brojnim istraživanjima pokazano je da blagotvorno utiču na zdravlje ljudi (Thomas i sar., 2020).

Tabela 1. Glavne hemijske komponente *I. obliquus* i njihove biološke aktivnosti

hemijske komponente	biološka aktivnost	reference
polisaharidi	antiitumorsko, antiinflamatorno, antivirusno, antioksidativno, imunomodulatorno, hipoglikemijsko, hipolipidemijsko, hepatoprotektivno	(Zhao i Zheng, 2021) (Yu i Xiang, 2021) (Lu i sar., 2021) (Li, i sar. 2021) (Xu, i sar. 2020)
polifenoli	antioksidativno	(Wang i sar., 2021)
triterpenoidi (triterpeni)	antitumorsko, antiinflamatorno, antivirusno i antioksidativno	(Du i sar., 2021) (Yn i sar., 2021) (Lin i sar., 2020)
melanin	antioksidativno, antiinflamatorno, antiviralno, hipolipidemijsko i imunomodulatorno	(Teplyakova i sar., 2020) (Mu i sar., 2012)

2.5.1. Antioksidativna aktivnost

Kod aerobnih organizama kiseonik je neophodan za efikasan energetski metabolizam, sa druge strane, dolazi i do stvaranja ROS (reaktivnih vrsta kiseonika) i slobodnih radikala (Kozarski i sar., 2023). Štetni faktori iz spoljašnje sredine, poput zračenja i toksina, kao i loš san, napetost, hiperglikemija i gojaznost mogu prekomerno da indukuju stvaranje slobodnih radikala. Slobodni radikali mogu da dovedu do hroničnih inflamatornih reakcija i oštećenja u ćelijama, koja dalje izazivaju širok spektar bolesti, posebno dijabetes i karcinom (Zhang i sar., 2013). Endogeni antioksidativni enzimi kao što su katalaza, superoksid dismutaza, glutation peroksidaza i antioksidansi poput askorbinske kiseline, katehina, tokoferola, fenola i dr. igraju ključnu ulogu u sprečavanju *in vivo* oksidativnog oštećenja izazvanog slobodnim radikalima. Fenolna jedinjenja mogu se koristiti u direktnim interakcijama sa radikalskim

vrstama kao pojačivači antioksidativne odbrane ćelije i za uspostavljanje redoks ravnoteže (Siddeeg i sar., 2021). Značaj fenolnih jedinjenja povezan je sa njihovom koncentracijom i reaktivnošću (Kozarski i sar., 2015). Slično kao i druge medicinske gljive, ekstrakti *I. obliquus* su u više istraživanja ispoljili intezivnu antioksidativnu aktivnost. Štaviše, istraživanja pokazuju da ekstrakti Čage imaju jaku antioksidativnu moć i da mogu efikasno da se suprostave štetnim radikalima (Mu i sar., 2012; Song i sar., 2013; Jiang i sar., 2020). Fenoli i flavonoidi su odgovorni za antioksidativnu aktivnost ekstrakata *I. obliquus*, a utvrđeno je da hidrofilni fenoli poput 2,3-dihidroksibenzaldehida, salicilne, protokatehinske, vanilinske, p-kumarinske, ferulne, siriginske i kafeinske kiseline značajno doprinose antioksidativnoj aktivnosti ekstrakata (Abu-Reidah i sar., 2021). Takođe, Hao i sar., (2023) su dokazali da fenolna jedinjenja, pored izrazite aktivnosti ukljanjanja slobodnih radikala, imaju afinitet prema enzimu superoksid dismutazi, što ukazuje na njihovu ulogu u pojačavanju aktivnosti enzima. U istraživanju koje su sprovedi pokazano je da fenolna jedinjenja ispoljavaju dozno-zavisnu aktivnost uklanjanja DPPH radikala kao i da štite DNK molekul od oštećenja (Hwang i sar., 2016). Primećeno je da se aktivnost neutralizacije DPPH radikala povećava sa porastom sadržaja ferulne kiseline, katehina i naringina, što ukazuje na izrazitu korelaciju između prisustva flavonoida i antioksidativne aktivnosti ekstrakata *I. obliquus*. Takođe, dokazano je da polisaharidi ekstrahovani iz *I. obliquus* imaju odličnu aktivnost uklanjanja DPPH i hidroksilnih radikala (Du i sar., 2013; Hu i sar., 2016), i superoksidnih anjona (Huang i sar., 2012) i H₂O₂ (Du i sar., 2013). Važno je napomenuti da fizičke i hemijske modifikacije polisaharida utiču na antioksidativna svojstva, posebno kisela i alkalna hidroliza, termički tretmani, ultrazvučno, mikrotalasno ili ekstrahovanje subkritičnom vodenom ekstrakcijom, jer pojačavaju njihove antioksidativne sposobnosti (Fordjour i sar., 2023).

2.5.2. Antitumorska aktivnost

Karcinom se smatra drugim vodećim uzročnikom smrti posle kardiovaskularnih bolesti i predstavlja veliku pretnju kako u visoko razvijenim bogatim zemljama tako i u siromašnim društvima (Bray i sar., 2018). U održavanje homeostaze ćelija uključeni su proliferacija i ćelijska smrt, međutim, kod ćelija tumora homeostaza je često narušena usled poremećaja ćelijskog ciklusa (Lee i sar., 2015). Kod sisara, ćelijski ciklus je strogo regulisan ciklinima, odnosno ciklin zavisnim kinazama i inhibitorima. Prekomerna ekspresija ciklin zavisnih kinaza i ciklina prisutna je pri razvoju većine tumora (Duru i sar., 2019). Antitumorski efekat se može pripisati promenama u biohemijskim mehanizmima, kao što su inhibicija proliferacije, indukcija zaustavljanja ćelijskog ciklusa na kontrolnim tačkama, indukcija apoptoze, regulisanje signalnih puteva i izmenjena ekspresija ključnih enzima (Jiang i sar., 2020). Rezistencija na hemioterapeutike i toksičnost na neizmenjene ćelije kod pacijenata su glavne prepreke u lečenju karcinoma (Haider i sar., 2020). Novi lekovi protiv karcinoma trebalo bi da imaju važnu ulogu u razvoju efikasnijih i sigurnijih agenasa za inhibiciju početnih faza karcinoma (Duru i sar., 2019). Međutim, vrlo važna je i prirodna hemoprevencija zasnovana na sekundarnim metabolitima poreklom iz biljaka i gljiva, pošto poseduju izraziti potencijal da inhibiraju kancerogeneze u različitim fazama (Nowacka-Jechalke i sar., 2018). Epidemiološke i farmakološke studije su otkrile da prirodna jedinjenja pokazuju inhibitornu aktivnost tokom proliferacije ćelija karcinoma ili metastaza, što ukazuje da su u stanju da deluju kao blokirajući agensi (Nowak i sar., 2014; Kaur i sar., 2018). *I. obliquus* je još od davnina korišćena za lečenje karcinoma u nekoliko regiona sveta (Saar, 1991). Bogati širokim spektrom bioaktivnih sekundarnih metabolita, ekstrakti gljive *I. obliquus* su pokazali aktivnost prema različitim ćelijskim linijama tumora (Fan i sar., 2012; Song i sar., 2013). Ekstrakti Čage mogu da izazovu apoptozu adenokarcinoma dojke (Zhang i

sar., 2018), kolorektalnog karcinoma (Song i sar., 2013), limfoma (Nakajima i sar., 2009), leukemije (Nomura i sar., 2008), adenokarcinoma pluća (Zhang i sar., 2018), HT-29 ćelija karcinoma debelog creva (Lee i sar., 2015) i ćelija melanoma B16–F10 (Youn i sar., 2009). Ranije je dokazano da se ekstrahovani heteropolisaharidi i glukani iz Čage sa stabla breze i endopolisaharidi iz micelijuma razlikuju po mehanizmu antitumorske aktivnosti. Polisaharidi Čage deluju direktno na tumorske ćelije, dok endopolisaharidi deluju indirektno aktivacijom imunskog sistema (Kim i sar., 2006). Kasnije je potvrđeno da polisaharidi izolovani iz *I. obliquus* imaju direktan antitumorski efekat jer inhibiraju sintezu proteina u tumorskim ćelijama i aktiviraju imunski sistem (Staniszewska i sar., 2017). Fenolna jedinjena ekstrahovana iz *I. obliquus* su takođe pokazala citotoksičnost prema tumorskim ćelijama. Među njima, protokatehinska kiselina, 3,4-dihidrobenzil aldehid i kafeinska kiselina inhibiraju rast ćelija humanog karcinoma jajnika, limfoma, kao i ćelije humanog adenokarcinoma pluća. Protokatehinski aldehid dodatno inibira rast ćelija adenokarcinoma pluća, dok siriginska kiselina dovodi do inhibicije rasta ćelija leukemije (Nakajima i sar., 2009). Kafeinska kiselina i 3,4-dihidro benzil aldehid pokazali su citotoksični efekat protiv glioblastoma, ćelija karcinoma dojke MCF-7 i humanih ćelija hepatoma (Wang i sar., 2017; Huang i sar., 2010). Među triterpenima se izdvaja inotodiol koji je pokazao najjače antiproliferativno dejstvo na karcinom dojke na Walker 256 eksperimentalnom modelu, takođe jedinjenja kao što su betulini i betulinska kiselina poznata su po svojoj antikancerogenoj aktivnosti (Géry i sar., 2018). Od sterolnih jedinjenja izdvaja se ergosterol peroksid koji deluje antikancerogeno prema ćelijskim linijama tumora debelog creva, a ima i imunosupresivno dejstvo (Géry i sar., 2018). *I. obliquus* je lekovita gljiva koja može da se koristi kao terapeutsko sredstvo pri tretiranju karcinoma ili kao dodatni prirodni lek za ublažavanje toksičnih efekata nakon hemo- ili radioterapije ili čak kao sredstvo za prevenciju tumora (Géry i sar., 2018). Interesantno je i to da su Softa i sar., (2019) testirali biološku aktivnost *I. obliquus* i dokazali da su ova gljiva i sok breze visokovredni sastojci pogodni za razvoj kozmetičkih proizvoda sa foto-zaštitnom aktivnošću. Ova prirodna jedinjenja pokazuju izrazitu zaštitu i stimulišu reparaciju DNK na keratinocitima i fibroblastima izloženim UV zračenju *in vitro*.

2.5.3. Antimikrobna aktivnost

Infektivne bolesti su i dalje vodeći uzrok oboljevanja i smrtnosti širom sveta, a u stalnom su porastu zbog otpornosti patogena na antimikrobne lekove, kao što su antibiotici (Pal i sar., 2021). Prekomerna i neodgovorna upotreba antibiotika, prvenstveno klinička upotreba, ali i loši higijenski uslovi, loša kontrola infekcija u bolnicama, akumulacija antibiotika u životnoj sredini, njihova upotreba u veterinarskoj medicini i u prehrambenoj industriji, doprineli su povećanju otpornosti mikroorganizama na antimikrobne lekove, odnosno javila se antimikrobna rezistencija (AMR) (Gu i sar., 2021; Prestinaci i sar., 2015). Jedan od najvećih globalnih problema u 21. veku je AMR zbog širenja infekcija i nedostatka novih antimikrobnih lekova (Llor i Bjerrum, 2014). Prema procenama, broj smrtnih slučajeva direktno povezanih sa AMR-om porastao je na više od 1,2 miliona u 2019. godini na svetskom nivou i procenjuje se da će do 2050. postati primarni uzročnik smrti, ukoliko se ne preduzmu mere kontrole (Wah i sar., 2023). Najveći procenat smrtnih ishoda je u Aziji, potom sledi Afrika, uglavnom zbog velikog broja stanovnika i nedostatka regulative povezane sa AMR (Wah i sar., 2023). Sa druge strane, Australija je imala najnižu stopu mortaliteta od AMR u 2019. godini (Murray i sar., 2022). Antibiotici su jedno od najvažnijih otkrića koji su poboljšali kvalitet zdravlja i smanjili stopu smrtnosti uzrokovanu infekcijama. Sa medicinskog aspekta, uvođenje antimikrobnih lekova značajno je smanjilo stopu smrtnosti uzrokovanu infekcijama. Aleksandar Fleming, jedan od najvećih lekara u 20. veku pokrenuo

je „zlatnu eru” otkrićem antibiotika penicilina (Hutchings i sar., 2020). Od tada je razvijeno preko 150 novih antibiotika ali je njihova prekomerna upotreba dovela do razvoja veće otpornosti, pa čak i nastanka multirezistentnih sojeva (Lobanovska i Pilla, 2017). AMR kod bakterijskih sojeva je posebno problematična zbog brze stope razvijanja rezistencije na mnoge nove antibiotike koji se koriste za lečenje bakterijskih infekcija. Termin „antibiotik“ definisan je kao supstanca koju proizvode mikroorganizmi i koja inhibira rast ili ubija druge mikroorganizme“ (Clardy i Fischbach, 2007). Danas je definicija antibiotika šira i obuhvata jedinstvenja prirodnog i sintetičkog porekla sa širokim spektrom delovanja (Leisner, 2020). Najčešći mehanizmi delovanja antibiotika uključuju: inhibiciju sinteze ćelijskog zida bakterija, narušavanje strukture ćelijske membrane, inhibiciju formiranja nukleinskih kiselina ili sintezu proteina i ometanje različitih metaboličkih procesa (Uluseker i sar., 2021). Do danas je otkriveno mnogo mehanizama otpornosti bakterija na antibiotike, uključujući modifikaciju ciljnog mesta antibiotika, promene u permeabilnosti ćelijske membrane, ispumpavanje antibiotika iz ćelije (efluks sistem) i enzimsku inaktivaciju (Peterson i Kaur, 2018).

Najvirulentniji, bolnički, multirezistentni patogeni od kliničkog značaja čine grupu koja se naziva „ESKAPE“. Ova grupa uključuje vrste kao što su *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* i *Enterobacter* spp. (Albericio, 2019). Izveštaj Svetske zdravstvene organizacije za 2021. godinu (World Health Organization, WHO) pokazuje da je sve veći broj mikroorganizama otpornih na više antibiotika u negativnoj korelaciji sa brojem efikasnih antibiotika, te da veliki problem predstavlja neuvođenje novih antimikrobnih agenasa u kliničku praksu. Prvi put je 2017. godine objavljena lista bakterija koje predstavljaju najveću pretnju za ljudsko zdravlje i za koje je potrebno hitno pronalaženje novih antimikrobnih agenasa (Terreni i sar., 2021). Patogeni uključeni u najkritičniju grupu su bakterije otporne na više antibiotika, u bolnicima, gde izazivaju teške, a vrlo često fatalne infektivne bolesti, a u tu grupu spadaju *P. aeruginosa*, *A. baumannii* i neke bakterije iz porodice *Enterobacteriaceae*. Ključni korak u razvoju novih antimikrobnih lekova u borbi protiv AMR je razumevanje mehanizama rezistencije ovih patogenih bakterija.

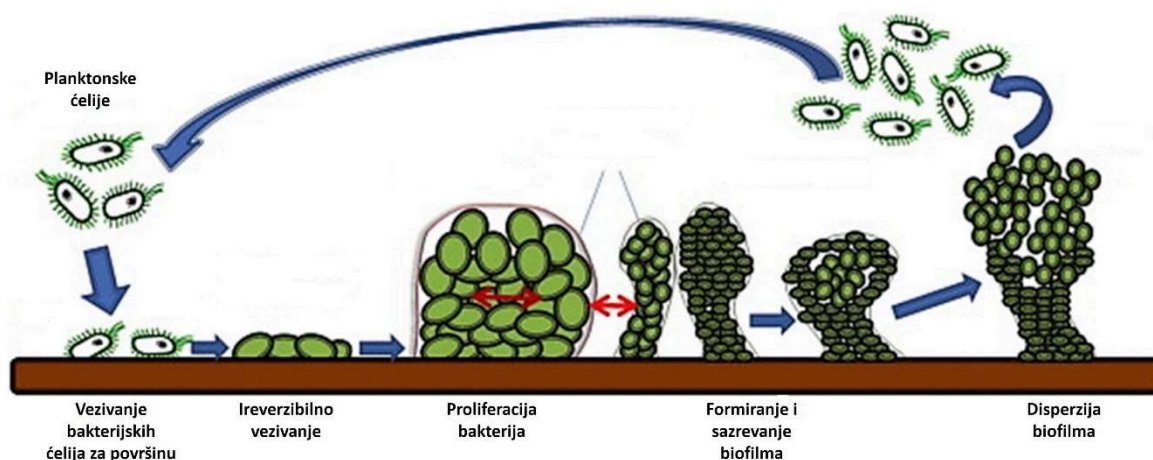
Brojni literaturni podaci pokazuju da ekstrakti gljive *I. obliquus* ispoljavaju antivirusno dejstvo (Szychowski i sar., 2021). Sa druge strane, imaju antibakterijsko dejstvo koje je mnogo slabije. U jednom od istraživanja utvrđeno je da su vodeni i etanolni ekstrakti *I. obliquus* pokazali inhibitornu i baktericidnu aktivnost prema testiranim Gram pozitivnim i negativnim bakterijama (Glamočlija i sar., 2015). Milyuhina i sar. (2021) su otkrili da je antibakterijska aktivnost ekstrakata *I. obliquus* dobijenih mikrotalasima bila bolja u odnosu na klasičnu ekstrakciju. Ovo se može pripisati bogatijem fenolnom sadržaju ekstrakata dobijenih pod dejstvom mikrotalasa.

2.6. Biofilm

U prirodnom okruženju, mikroorganizmi se mogu naći u slobodnoživućoj, planktonskoj formi, mada pretežno žive u višecelijskim zajednicama zvanim biofilmovi (Pal i sar., 2021). Biofilmi predstavljaju strukturnu zajednicu miliona ćelija mikroorganizama koji su imobilisani u supstratu i obmotani matriksom ekstraćelijskih polimernih supstanci (EPS) koji proizvode članovi zajednice (Gupta i sar., 2016). Biofilmovi su jedan od najrasprostranjenih i najuspešnijih načina života na Zemlji. Mogu se formirati skoro svuda, naseljavaju medicinske implantate i uređaje, živa tkiva, vodene kanale i cevi, pogone za preradu hrane i druge abiotičke i biotičke površine (Flemming i sar., 2016; Donelli i Vuotto, 2014). Biofilmovi predstavljaju jedan od većih problema u savremenoj medicini jer su odgovorni za više od 80% bakterijskih infekcija i više od 60% svih bolničkih infekcija (Hassett i sar., 2014).

Infekcije koje se dovode u vezu sa biofilmom obuhvataju karijes na zubima, parodontitis, upale srednjeg uva, hroničnu upalu sinusa, infekcije rana, osteomijelitis, infektivni endokarditis, infekcije pluća kod cistične fibroze i dr. (Vestby i sar., 2020).

Formiranje biofilma je složen proces koji počinje vezivanjem planktonskih mikroorganizama za površine, reverzibilno i ireverzibilno vezivanje, nakon čega sledi deoba bakterija kako bi se formirale mikrokolonije (Slika 4). Treći korak je sazrevanje biofilma koga karakteriše specifičan sastav, oblik i arhitektura. Poslednji korak je disperzija biofilma koja je neophodna kako bi se obezbedio rast i širenje biofilma (Ahmad i sar., 2021). Na proces formiranja biofilma utiču spoljašnji uslovi kao što su temperatura, pH, gravitaciona sila, hidrodinamičke sile, priroda naseljenih površina, međucelijska komunikacija bakterija (Quorum Sensing - QS), sekundarni glasnici i drugi signalni molekuli (Jamal i sar., 2015; Zhao, 2017). Heterogena struktura biofilma uglavnom se sastoji od bakterijskih ćelija (10 – 25%) i ekstracelularnog matriksa (75 – 90%). Voda se smatra najdominantnijom komponentom EPS-a. Štaviše, vodeni kanali u biofilmu su neophodni da bi se mikrokolonije međusobno odvojile (Flemming i sar., 2016). EPS, koji je u vidu gela, pored vode sastoji se od egozopolisaharida, proteina, lipida, ekstracelularne DNK (eDNK) i RNK molekula poreklom od samih mikroorganizama (Flemming i sar., 2016). EPS pomaže u kruženju hranjivih materija, ćelijskoj komunikaciji održavajući dostupnost DNK za horizontalni transfer gena, deluje kao zaštitna barijera protiv antimikrobnih agenasa, UV zračenja, isušivanja i od imunološkog odbrambenog sistema domaćina (Ahmad i sar., 2021). Uloga polisaharida jeste da deluju kao molekularni lepak za povezivanje bakterija međusobno i za biotičke i abiotičke površine, pored toga imaju zaštitnu ulogu protiv imunskog sistema domaćina i antimikrobnih agenasa (Fong i Yildiz, 2015). Ekstracelularni proteini su u interakciji sa egzopolisaharidima i pomažu u održavanju matriksa, površinskoj kolonizaciji i održavanju strukture biofilma (Fong i Yildiz, 2015). Neki proteini pomažu u degradaciji i disperziji matriksa biofilma poput proteaza koje razgrađuju proteine matriksa. eDNK obezbeđuje održavanje strukturne stabilnosti matriksa, važna je za ćelijsku adheziju mikroorganizama, povećava otpornost na antibiotike i patogenost, štiti od imunog sistema domaćina (Ahmad i sar., 2021; Okshevsky i Meyer, 2013).



Slika 4. Proces formiranja biofilma (Tran i sar., 2020).

Unutar biofilma, bakterije se prilagođavaju nižoj koncentraciji kiseonika, ograničenoj količini hranljivih materija pokazujući izmenjene metaboličke aktivnosti, smanjenu ekspresiju gena i proizvodnju proteina što može dovesti do usporavanja metabolizma i deobe ćelija (Hall-Stoodley i Stoodley, 2009). Pored toga, ova adaptacija čini bakterije otpornim na antimikrobne agense tako što se inaktiviraju receptori za vezivanje agenasa ili usporavaju ćelijske funkcije koje antimikrobni lekovi ometaju. Faktori koji još doprinose otpornosti biofilma na antibiotike uključuju ograničenu penetraciju antimikrobnih agenasa, enzima koji modifikuju antibiotike u matriksu, eDNK, efluks pumpe, Quorum Sensing i dr. (Hall i Mah, 2017). Bakterije u formi biofilma otporne su na mnoge konvencionalne antibiotike te je neophodno što pre naći alternativna terapijska rešenja za inhibiciju i ometanje nastanka biofilma, kako bi se poboljšala zdravstvena zaštita, bezbednost hrane i efikasnost industrijskih sektora. Za borbu protiv biofilma kao potencijalna rešenja su različiti prirodni proizvodi kao što su ekstrakti biljaka, gljiva, med, etarska ulja; Quorum Sensing inhibitori; inhibični enzimi; bakteriocini (Sadekuzzaman i sar., 2015).

2.6.1. Međućelijska komunikacija bakterija - Quorum Sensing

Formiranje biofilma, produkcija faktora virulencije, bioluminiscencija, sporulacija, genetička kompetentnost, apoptoza kao i proizvodnja antibiotika regulisana je putem procesa međućelijske komunikacije bakterija, odnosno Quorum Sensing (QS) sistemom. QS je proces ćelijskog prepoznavanja i komunikacije koji se zasniva na sintezi i oslobađanju malih signalnih molekula, „autoinducera” (Harmsen i sar., 2010). Ovi mali signalni molekuli pri velikoj gustini populacije mogu da stupe u interakciju sa receptorima i da indukuju ekspresiju različitih gena odgovornih za proizvodnju faktora virulencije, adheziju, pokretljivost, formiranje biofilma (Liu i sar., 2018; Lee i Zhang, 2015). Danas se zna da je međućelijska komunikacija bakterija karakteristika gotovo svih do sada poznatih bakterijskih vrsta i može se definisati kao globani regulatorni sistem koji koordiniše ekspresiju gena kao odgovor na promene gustine bakterijske populacije (Saxena, 2019).

QS igra ključnu ulogu u patogenezi *Pseudomonas aeruginosa* počevši od kolonizacije domaćina do invazije, infekcije, širenja i rezistencije na antibiotike (Kumar i sar., 2009). Tokom infekcije *P. aeruginosa* oslobađa različite faktore virulencije kao što su elastaze, proteaze, piocijanin, cijanovodonik, egzotoksin A, alkalne proteaze, lektini i ramnoziltransferaze koji olakšavaju širenje bakterija izbegavanjem fagocitoze i modifikuju imunski sistem domaćina (Wang i sar., 2018). QS mreža *P. aeruginosa* je jedna od najsloženih ali i najbolje proučenih i do sada opisanih. Tri najvažnija međusobno povezana QS sistema kod *P. aeruginosa* nazivaju se *las*, *rhl*, *pqs* koji su usko u interakciji jedan sa drugim i organizovani su na hijerarhijski način (Sharma i sar., 2013; Hendiani i sar., 2019). Ovako kompleksna i višekomponentna QS mreža omogućava *P. aeruginosa* da se prilagođava različitim uticajima i stresu iz životne sredine. Sistem *las* reguliše ekspresiju gena za sintezu hemolizina, proteaza, elastaza i gena za proizvodnju egzotoksina A koji pomažu za formiranje biofilma (Sharma i sar., 2013;). Drugi sistem *rhl* odgovaran je za ekspresiju gena za sintezu ramnolipida koji su važni za formiranje biofilma i drugih egzoprodukata poput cijanovodonika, piocijanina, lektina, elastaze i proteaze (Reiser, 1995; Lin i Cheng, 2019). Treći QS sistem je *pqs* koji je uključen u razvoj biofilma i oslobađanje molekula eDNK koji je neophodan za formiranje stabilnih i zrelih biofilmova (Allesen-Holm i sar., 2006), zatim za sintezu elastaza, piocijanina, lektina i ramnolipida (Lee i Zhang, 2015).

Kao što je već istaknuto, zbog rastuće rezistencije bakterija na antibiotike neophodno je naći alternativne antimikrobne terapije. Dok velike farmaceutske kompanije i dalje oklevaju da

ulažu u nova istraživanja antibiotika, mali industrijski pogoni i univerziteti prednjače u načinu da se razviju alternativni pristupi. Jedan od načina je pronalazak novih malih molekula koji inhibiraju međucelijsku komunikaciju bakterija (QSI) i smanjuju produkciju faktora virulencije. Utišavanje QS može se realizovati na tri načina: blokiranjem sinteze signalnih molekula, degradacijom signalnih molekula i sprečavanjem vezivanja signalnih molekula za proteinske receptore u QS mreži (Lade i sar., 2014). Takođe, Kalia (2013) je utvrdio nekoliko kriterijuma koji mogu pomoći istraživačima u potrazi za efikasnim QSI molekulima. QSI molekuli bi trebalo da budu niske molekulske težine i hemijski stabilne strukture, da su visoko specifični u prepoznavanju i inhibiranju određenih „autoinducera” i kao najvažnija karakteristika se ističe da su necitotoksični na ćelije domaćina. QS inhibitori mogu biti mali molekuli ekstrahovani iz prirodnih resursa ili dobijeni hemijskom sintezom sa jedne strane (Kalia, 2013; Paluch, 2020), dok su sa druge strane to enzimi koji inhibiraju QS sistem (laktonaze, acilaze, oksidoreduktaze) (Czajkowski i Jafra, 2009; Fetzner, 2014). Prirodni QSI privlače veliku pažnju jer prirodni resursi poseduju ogroman potencijal sa visokom efikasnošću, takođe ekološki su prihvatljivi što daje mogućnost za razvoj novih lekova. U dosadašnjim istraživanjima identifikovano je dosta QSI molekula poreklom iz prokariota i eukariota i obuhvataju kako kopnene biljke, životinje, gljive, mikroorganizme, tako i morske organizme (Tang i Zhang, 2014). Lekovite biljke i gljive proizvode širok spektar sekundarnih metabolita kao što su flavonoidi, fenoli, fenolne kiseline, kumarini, tanini, kinoni, terpenoidi i alkaloidi koji potencijalno mogu inhibirati QS. Neki od QSI molekula ekstrahovani su iz biljaka: narginin, kvercetin, kempferol, vanilinska, elaginska, taninska kiselina i dr. (Bouyahya i sar., 2017). Pošto metali igraju važnu ulogu u procesima virulencije i održavanja biofilma, upotreba prirodnih jedinjenja koja heliraju metale bila bi takođe efikasan način u sprečavanju formiranja biofilma (Paluch i sar., 2020).

3. Ciljevi istraživanja

Lekovite gljive zauzimaju značajno mesto na savremenom tržištu dijetetskih suplemenata. Ovaj ogranak velnes industrije i istraživanja sve je popularniji među potrošačima što se odražava na primarnu proizvodnju i preradu gljiva. Povećanje obima potrošnje znači povećanje potrebe za sirovinama odgovarajućeg kvaliteta i biološke potentnosti. Kako bi se odgovorilo navedenim zahtevima nauka i industrija rade na razvoju metoda prerade, prevenstveno ekstrakcije, kojima bi se ostvario viši prinos za kraće vreme, dobile čistije i biološki potentnije aktivne komponente, uz posvećivanje pažnje zaštiti životne sredine. Predmet istraživanja ove doktorske disertacije je ispitivanje mogućnosti upotrebe različitih zelenih tehnika ekstrakcije, u vezi sa postizanjem maksimalne antimikrobne, antioksidativne i antitumorske potentnosti dobijenih ekstrakata tradicionalno poznate lekovite gljive *I. obliquus* (Čaga). Kako su biofilmovi u osnovi savremene antimikrobne rezistencije i antibiotske krize, posebna pažnja je posvećena antiadhezivnom i antibiofilmskom potencijalu ekstrakata navedene gljive.

Postavljeni ciljevi ovog istraživanja bili su sledeći:

- Dobijanje ekstrakata medicinski važne gljive *I. obliquus* primenom takozvanih zelenih tehnika ekstrakcije: mikrotalasa, ultrazvuka, subkritične H₂O i superkritičnog CO₂;
- Određivanje hemijskog sastava dobijenih ekstrakata;
- Ispitivanje antioksidativne sposobnosti dobijenih ekstrakata;
- Utvrđivanje antimikrobnog potencijala dobijenih ekstrakata prema ATCC i kliničkim sojevima mikroorganizama i praćenje kinetike rasta ovih sojeva u prisustvu najaktivnijih ekstrakata;
- Određivanje tipova interakcija i potencijalnih sinergističkih efekata kombinacija odabranih ekstrakata gljive *I. obliquus* i etanolnog ekstrakta kantariona prema odabranim ATCC i kliničkim sojevima mikroorganizama;
- Ispitivanje sposobnosti adhezije i formiranja biofilma odabranih ATCC i kliničkih sojeva patogenih bakterija;
- Utvrđivanje uticaja pojedinačnih ekstrakata gljive *I. obliquus*, kao i kombinacija različitih koncentracija, na sposobnost adhezije, formiranje biofilma i razaranje biofilma odabranih ATCC i kliničkih sojeva patogenih bakterija;
- Određivanje uticaja dobijenih ekstrakata na sposobnost produkcije ekstracelularne polimerne supstance (EPS) odabranih ATCC i kliničkih sojeva patogenih bakterija;
- Ispitivanje citotoksičnosti i genotoksičnosti ekstrakata gljive *I. obliquus* prema odabranim tumorskim ćelijskim linijama i poređenje sa neizmenjenim ćelijskim linijama.

4. Materijal i metode

4.1. Gljive korišćene u eksperimentalnom radu

Pseudosklerocijum *I. obliquus* sakupljen je sa stabala breze (*Betula* spp.) u jesen 2017. godine, iz šumskog područja Mongolije i na planini Vlasini, Srbija. Identifikacija materijala izvršena je pomoću ključa (Breitenbach i Kränzlin, 1986) na osnovu ispitivanja makro i mikromorfoloških karakteristika. Pseudosklerocijum *I. obliquus* je očišćen, osušen u sušnici na 40°C do konstantne mase, a zatim samleven u fini prah u mlinu Cyclotech (Tecator, Hoganas, Sweden) koristeći sito od 0,5 mm. Materijal je čuvan u mraku, na hladnom i suvom mestu do analize. Reprezentativni primerci pseudosklerocijuma *I. obliquus* deponovani su u zbirci Katedre za Tehnološku mikrobiologiju, Poljoprivrednog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Kulture micelijuma ovih gljiva su takođe čuvane u zbirci iste Katedre na 4°C.

4.1.1. Priprema ekstrakata

Savremene ekstrakcione tehnike primenjene u ovom istraživanju su: ultrazvučna, mikrotalasna, ekstrakcija subkritičnom H₂O i ekstrakcija superkritičnim CO₂. Radi lakšeg praćenja teksta u Tabeli 2. date su skraćenice za poreklo materijala, tip i uslove ekstrakcije.

Tabela 2. Oznake srpskih i mongolskih ekstrakata *I. obliquus* dobijenih različitim zelenim tehnikama ekstrakcije

	oznake ekstrakata	tip ekstrakcije	poreklo materijala
1	IS MW 96% EtOH	mikrotalasna ekstrakcija	
2	IS MW 50% EtOH	mikrotalasna ekstrakcija	
3	IS MW H ₂ O	mikrotalasna ekstrakcija	
4	IS VAE 96% EtOH	ultrazvučna ekstrakcija	
5	IS VAE 50% EtOH	ultrazvučna ekstrakcija	srpska Čaga
6	IS VAE H ₂ O	ultrazvučna ekstrakcija	
7	IS SWE 200 °C	ekstrakcija subkritičnom H ₂ O	
8	IS SWE 120 °C	ekstrakcija subkritičnom H ₂ O	
9	IS SFE	ekstrakcija superkritičnim CO ₂	
10	IM MW 96% EtOH	mikrotalasna ekstrakcija	
11	IM MW 50% EtOH	mikrotalasna ekstrakcija	
12	IM MW H ₂ O	mikrotalasna ekstrakcija	
13	IM VAE 96% EtOH	ultrazvučna ekstrakcija	
14	IM VAE 50% EtOH	ultrazvučna ekstrakcija	mongolska Čaga
15	IM VAE H ₂ O	ultrazvučna ekstrakcija	
16	IM SWE 200 °C	ekstrakcija subkritičnom H ₂ O	
17	IM SWE 120 °C	ekstrakcija subkritičnom H ₂ O	
18	IM SFE	ekstrakcija superkritičnim CO ₂	

4.1.1.1. Ultrazvučna ekstrakcija

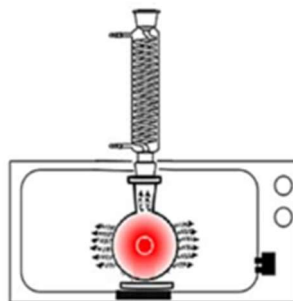
Ekstrakcija uz pomoć ultrazvuka izvedena je u ultrazvučnom kupatilu (EUP540A, Euinstruments, Francuska). Kupatilo se sastoji od pravougaone posude, (Slika 5), sa konstantnom frekvencijom od 40 kHz. U svim eksperimentima odmereno je 10 g *I. obliquus* u erlenmajer (250 mL) i zatim dodato 100 mL odgovarajućeg rastvarača. Ultrazvučna ekstrakcija izvedena je sa 96% i 50% etanolom i vodom, na temperaturi od 30°C. Ultrazvučna snaga (60 W/L) i vreme ekstrakcije (60 min) održavani su konstantnim. Nakon ekstrakcije, ekstrakti su profiltrirani kroz filter papir pod vakuumom, liofilizovani (Christ BETA 2- 8 LD plus liofilizator, Osterode, Nemačka), sakupljeni u staklene bočice i čuvani na 4 °C do analize.



Slika 5. Ultrazvučno kupatilo

4.1.1.2. Mikrotalasna ekstrakcija

Ekstrakcija uz pomoć mikrotalasa urađena je u modifikovanoj kuhinjskoj mikrotalasnoj pećnici (NN-E201W, Panasonic, Kadoma, Japan, Slika 6) u koju je postavljen stakleni balon sa kondenzatorom. U svim eksperimentima odmereno je 10 g *I. obliquus* u erlenmajer (250 mL) i zatim dodato 100 mL rastvarača. Ekstrakcije su izvršene sa 96% i 50% etanolom i vodom, pri snazi mikrotalasa od 470 W. Vreme ekstrakcije (30 min) i frekvencija (50 kHz) bili su konstantni u svim ekstrakcijama. Po završetku, ekstrakti su odmah profiltrirani kroz filter papir pod vakuumom, liofilizovani (Christ BETA 2- 8 LD plus liofilizator, Osterode, Nemačka), preneti u staklene bočice i čuvani na 4 °C do analize.



Slika 6. Šema modifikovane mikrotalasne pećnice za MW (Quiroz i Ramirez, 2019)

4.1.1.3. Ekstrakcija subkritičnom vodom

Ekstrakcija subkritičnom vodom je izvršena u diskontinualnom ekstraktoru, sa regulatorom temperature (Parr 4520 Instrument Company, Hillsboro, OR, SAD) pod visokim pritiskom, zapremine 450 mL, sa maksimalnim radnim pritiskom od 200 bar i temperaturom 350 °C. Šematski prikaz aparature sa glavnim delovima uređaja dat je na Slici 7.



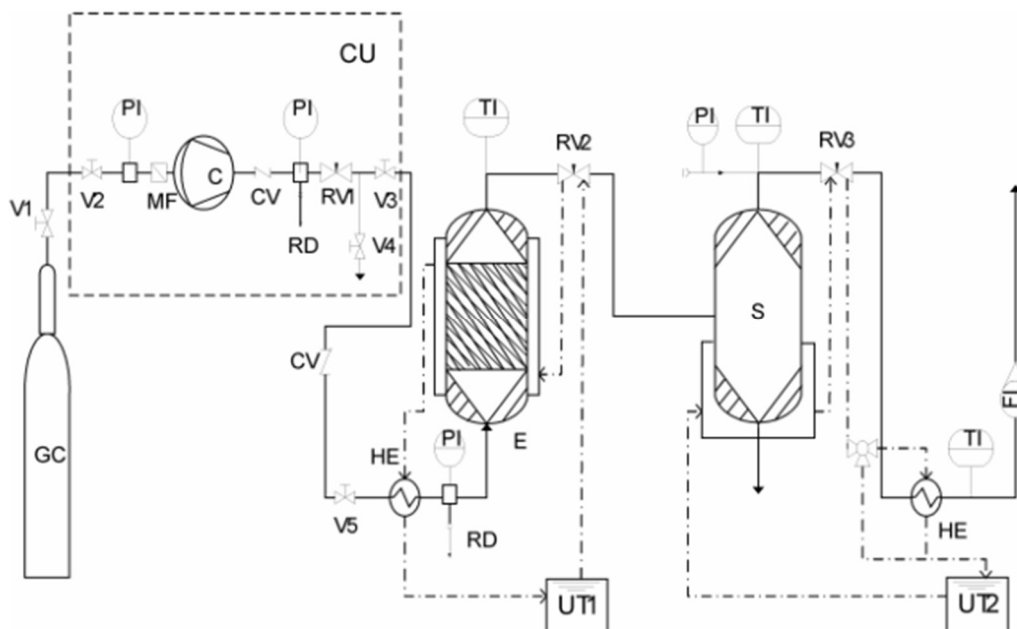
Slika 7. Model uređaja za ekstrakciju subkritičnom vodom (autor slike Jovana Vunduk, Lazić i sar., 2024)

U svim eksperimentima, 10 g fino usitnjenog materijala *I. obliquus* pomešano je sa 100 mL destilovane vode. Za postizanje radnog pritiska korišćen je azot kako bi se sprečila moguća oksidacija na visokim temperaturama do koje može doći zbog prisustva kiseonika u vazduhu. Zagrevanje ekstraktora vršeno je električnom grejnom oblogom. Magnetna mešalica (1000 rpm) korišćena je za ubrzavanje prenosa mase i toplote, kao i za sprečavanje pregrevanja materijala na zidovima ekstraktora. Ekstrakcije su sprovedene na temperaturi od 120 i 200 °C, dok je pritisak (30 bar) održavan konstantnim tokom vremena ekstrakcije od 20 min. Nakon ekstrakcije, ekstraktor je ohlađen u vodenom kupatilu sa ledom do 30 °C a azot ispušten. Ekstrakti su profiltrirani kroz filter papir pod vakuumom, liofilizovani (Christ BETA 2- 8 LD plus liofilizator, Osterode, Nemačka), preneti u staklene bočice i čuvani na tamnom mestu i temperaturi od 4 °C do sledećih analiza.

4.1.1.4. Ekstrakcija superkritičnim ugljendioksidom

Ekstrakcija superkritičnim ugljendioksidom urađena je u laboratorijskom uređaju High Pressure Extraction Plant (HPEP- High Pressure Extraction Plant, NOVA Swiss, Effretikon, Švajcarska), čija je šema prikazana na slici 8. (Filip i sar., 2014, Slika 8). Prvo je ekstraktor (E) napunjen sprasenom gljivom *I. obliquus* (40 g). Testirani materijal u ekstraktoru oslobađa se prisutnog vazduha produvavanjem CO₂ iz boce (GC), zatim se zatvore ventil V5 i regulacioni ventil (RV2). Ultratermostatima (UT1) i (UT2) se regulišu radne temperature u ekstraktoru (E) i separatoru (S) pri zatvorenom ventilu (V1) boce sa CO₂. Potom se, nakon otvaranja ventila od V1 do V5 (V4 je zatvoren), kompresor na kome je grubo podešen radni pritisak pusti u pogon i regulacionim ventilom (RV1) se podesi radni pritisak. Ugljendioksid

prolazi kroz izmenjivač toplote (HE) otvaranjem ventila (V5) i uvodi u ekstaktor, pri čemu je regulacioni ventil (RV2) zatvoren. Otvaranjem i podešavanjem regulacionih ventila (RV2) i (RV3) postiže se željeni pritisak u separatoru, kao i održavanje radnog protoka rastvarača (Filip, 2014).



Slika 8. Šema uređaja za ekstrakciju superkritičnim ugljendioksidom

GC-boca sa CO₂, C-kompresor sa dijafragmom, CU-kompresorska jedinica, E-ekstaktor, HE-izmenjivač toplote, S-separator, UT-ultratermostat, RV-regulacioni ventil, V-ventil, MF-mikrofilter, CV-nepovratni ventil, RD-rupturni disk, PI-merač pritiska, TI-merač temperature, FI-merač protoka.

Ekstrakcija *I. obliquus* je vršena 3 h pri sledećim uslovima: CO₂ od 300 bar, na temperaturi od 40 °C, pri konstantnom protoku ugljendioksida od 0,194 kg/h. Uslovi separatora su održavani konstantnim na pritisku od 15 bar i temperaturi od 23 °C. Dobijeni ekstrakti su preneti u staklene bočice koje su čuvane na tamnom mestu i na temperaturi od 4 °C do dalje analize.

4.2. Hemijska karakterizacija ekstrakata

4.2.1. Određivanje sadržaja ukupnih proteina

Modifikovana metoda po Bradfordu koju su opisali Doroški i sar. (2021) izvodi se u mikrotitracionim pločama sa 96 bunarića (BioTek ELx808 microplate reader, Inc., Winooski, VT, USA). Uzorci su rastvoreni u 5% DMSO (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) (25 µL, 10 mg/mL) i pomešani s Bradford-ovim reagensom (230 µL), da bi nakon 30 min bila očitana apsorbanca min na 595 nm. Koncentracija proteina u uzorcima određena je na osnovu kalibracione krive, koja se dobija pomoću albumina goveđeg seruma (Bovine Serum Albumin, BSA, Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, USA). Rezultati su izraženi kao ekvivalenti BSA u miligramima po gramu suve mase ekstrakta (mg BSA/g).

4.2.2. Analiza polisaharida

Polisaharidi su analizirani određivanjem sadržaja ukupnih šećera, ukupnih glukana, α -glukana i β -glukana, kao pomoću visoko-efikasne jonske hromatografije sa pulsno-amperimetrijskom detekcijom (HPAEC/PAD).

4.2.2.1. Određivanje sadržaja ukupnih šećera

Sadržaj ukupnih šećera određen je fenol-sumpornom metodom (Dubois i sar., 1956). Uzorci su rastvoreni u 5% DMSO (5 mg/mL). Uzeto je po 400 μ l svakog rastvorenog ekstrakta, a potom je dodato 400 μ l 5% fenolnog reagensa i 2 ml koncentrovane H₂SO₄. Uzorci su inkubirani 40 min na sobnoj temperaturi, a zatim su očitane apsorbance na talasnoj dužini od 490 nm na spektrofotometru (Shimadzu UV-1800, Kyoto, Japan). Koncentracija ukupnog sadržaja šećera u uzorcima izračunata je u odnosu na kalibracionu krivu, koja je dobijena pomoću D-glukoze (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, USA). Rezultati su izraženi kao ekvivalenti D-glukoze u miligramima po gramu suve mase ekstrakta (mg GLU/g).

4.2.2.2. Određivanje ukupnih, α - i β -glukana

Sadržaj ukupnih, α - i β -glukana u različitim ekstraktima *I. obliquus* određen je pomoću enzimskog kita Mushroom and Yeast β -glucan Assay Procedure K-YBGL 09/2009 (Megazyme Int., Wicklow, Ireland). Kit sadrži: egzo-1,3- β -glukanazu, β -glukozidazu, amiloglukozidazu, invertazu, reagens za determinaciju glukoze (GOPOD - glukoza oksidaza, peroksidaza, 4-aminoantipirin) kao i standardni rastvor glukoze. Za određivanje ukupnih glukana odmeren je ekstrakt *I. obliquus* (50 mg), a potom je izvršena hidroliza sa 60% H₂SO₄ na 100 °C u trajanju od 2 h. Nakon neutralizacije sa 2 M KOH izvršena je hidroliza do glukoze dodatkom mešavine enzima egzo-1,3- β -glukanaze i β -glukozidaze u trajanju od 60 min na 40 °C. Ekstrakti *I. obliquus* su zatim tretirani GOPOD-ovim reagensom i inkubirani na 40 °C tokom 20 min, apsorbance je merena spektrofotometrijski na 510 nm (Shimadzu UV-1800, Kyoto, Japan). Sadržaj α -glukana je određen enzimskom hidrolizom ekstrakata sa mešavinom amiloglukozidaze i invertaze. Sadržaj β -glukana je dobijen kao razlika sadržaja ukupnih glukana i sadržaja α -glukana. Rezultati su izraženi kao ekvivalenti D-glukoze na g/100 g suve mase ekstrakta (g GLU/100 g).

4.2.2.3. Analiza šećera primenom visoko-efikasne jonske hromatografije sa pulsno-amperimetrijskom detekcijom (HPAEC/PAD)

Šećerni profil različitih ekstrakata Čage određen je korišćenjem jonske hromatografije visokih performansi opremljene pulsno-amperometrijskim detektorom (HPAEC/PAD), prema metodologiji koju su predhodno opisali Gašić i sar. (2015). Naime, za analizu šećera je korišćen DIONEX ICS 3000 DP uređaj (Dionex, Sunnyvale, CA, USA) koji je opremljen sa kvaternom gradijent pumpom (Dionex), ICS AS-DV 50 autosemplerom (Dionex) i Carbo Pac®PA100 selektivnom anjon-izmenjivačkom kolonom (4×250 mm; veličina čestica 8,5 μ m; veličina pora-mikropora 10 angstrema (Dionex), korišćen je za analizu šećera na 30 °C. Elektrohemijski detektor se sastoji od Au kao radne i Ag/AgCl kao referentne elektrode. Mobilna faza se sastojala od sledećih reagenasa: 600mM NaOH (A), 500mM NaCH₃COO (B), ultraprečišćena voda (C). Brzina protoka mobilne faze je bila 0,7 mL/min. Linearni gradijent je bio: 0–5,0 min, 15 % A, 85 % C; 5,0–5,1 min, 15 % A, 2 % B, 83 % C; 5,1–12,0 min, 15 % A, 2 % B, 83 % C; 12,0–12,1 min, 15 % A, 4 % B, 81 % C; 12,1–20,0 min 15 % A, 4 % B, 81 % C; 20,0–20,1 min 20 % A; 20 % B; 60 % C; 20,1–30,0 min 20 % A; 20 % B; 60 % C. Pre analize, sistem je kondicioniran mobilnom fazom koja je sadržala 15% A i 85% C, 15 min. Zapremina ubrizganog uzorka je bila 25 μ L. Kvantifikacija rastvorljivih šećera

detektovanih u uzorcima je dobijena korišćenjem standardnih rastvora šećera i formiranih kalibracionih krivih kao što su predhodno opisali Gašić i sar. (2015). Rezultati su izraženi kao g/kg suve mase ekstrakta. Standardi šećera nabavljeni su od Tokyo Chemical Industry, TCI (Belgija).

4.2.3. Analiza fenola

Fenoli su analizirani određivanjem ukupnih fenola kao i UHPLC–DAD–MS/MS analizom.

4.2.3.1. Određivanje sadržaja ukupnih fenolnih jedinjenja

Sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja je određen pomoću Folin-Ciocalteu reagensa metodom prilagođenom mikrotitracionim pločama sa 96 bunarića (Tissue Culture Plate, Sarstedt, Nümbrecht, Nemačka) (Kozarski i sar., 2020). Uzorci su rastvoreni u 5% DMSO, svakom od ekstrakta (25 μ L, 1 mg/mL) dodato je 125 μ L Folin-Ciocalteu reagensa (razblaženog 10 puta) i rastvor je dobro pomešan korišćenjem vorteksa. Nakon 5 min rastvoru je dodato 100 μ L 20% rastvora Na₂CO₃. Ploče su ostavljene na sobnoj temperaturi u mraku 2 h, a zatim očitane na apsorbanici od 630 nm na spektrofotometru (BioTek ELx808 microplate reader, Inc., Winooski, VT, USA). Galna kiselina je korišćena kao standard i na osnovu različitih koncentracija konstruisana je kalibraciona kriva, a rezultati sadržaja ukupnih fenola su izraženi kao ekvivalenti galne kiseline (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, USA) u miligramima po gramu suve mase ekstrakta (mg GAE/g).

4.2.3.2. Fenolni profil

Identifikacija fenolnih komponenti izvedena je pomoću Dionex Ultimate 3000 UHPLC uređaja koji je opremljen sa DAD (diode array detector) detektorom i TSQ Quantum Access Max masenim spektrometrom sa trostrukim kvadrupol analizatorom (ThermoFisher Scientific, Bazel, Švajcarska), prema metodi koju su opisali Gašić i sar. (2015). Radni rastvori fenolnih standarda (0,01; 0,05; 0,10; 0,25; 0,50; 0,75; 1,00 mg/L) su dobijeni razblaživanjem osnovnog rastvora (1000 mg/L) pripremljenog u metanolu. Mobilnu fazu su činili sledeći reagenasi: voda + 0,1% sirćetna kiselina (A) i 100% acetonitril (MS čistoće) (B) i čuvani su u mraku na 4 °C. Izvršena je hromatografija na 40 °C na Synchronis C18 koloni (100×2.1 mm, 1.7 μ m veličina pora) na sledeći način: 5% B, 0.0-1.0 min; 5–95% B, 1.0–16.0 min; 95-5% B, 16.0–16.1 min; i 5% B tokom 4 min. Brzina protoka mobilne faze je bila podešena na 0,3 mL/min, a detekcione talasne dužine su bile 254 nm i 280 nm. Injektovana zapremina uzorka je bila 5 μ L. TSQ Quantum Access Max tripl-kvadrupol maseni spektrometar je opremljen sa elektrosprej jonskim izvorom (HESI) i podešeni su mu sledeći parametri: temperatura isparivača 200°C, napon spreja 5 kV, pritisak N₂ 40 AU, pritisak jonskog gasa 1 AU, pritisak pomoćnog gasa 8 AU, i temperature kapilara 300°C. Maseni spektrometar je snimao mase u negativnom modu, u opsegu od 100 do 1000 m/z. Za kvalitativnu analizu ciljanih fenolnih jedinjenja su korišćeni višestruki maseno spektroskopski modusi skeniranja, kao što su poptuno skeniranje (FS) i skeniranje produkt jona (PIS). Kolizionoindukovana fragmentacija je izvedena korišćenjem argona kao kolizionog gasa, dok je energija sudara varirala u zavisnosti od jedinjenja. Kvantifikacija polifenola je izvedena tako što je za svaki standard snimljen molekulski jon i dva karakteristična MS² fragmenta, koji su predhodno definisani kao dominantni u PIS eksperimentima. Xcalibur softver (verzija 2.2.) korišćen je za kontrolu instrumenta. Fenolna jedinjenja su identifikovana direktnim poređenjem sa komercijalnim standardima. Ukupna

količina svakog fenolnog jedinjenja je izračunata iz kalibracionih krivih, a izražena je kao mg/kg suve mase ekstrakta.

4.2.4. Profil masnih kiselina

Sadržaj masnih kiselina dobijen je primenom gasne hromatografije sa masenom spektrometrijom (GC-MS), definisanim prema Micić i sar., (2021). Ova analiza izvedena je upotrebom Thermo Fisher Focus GC polaris Q sistema sa TR-WAXMS kapilarnom kolonom (Carlsbad, USA). Korišćena je kapilarna HP-88 kolona (0,20 µm debljina filma, 30 m dužina kolone i prečnik 0,25 mm), a temperaturni program pećnice bio je sledeći: početna temperatura 50 °C (1 min), zatim 25 °C/min do 200 °C i na kraju 3 °C/min do 230 °C (18 min). Temperature injektora, transfer linije i jonskog izvora bile su: 250 °C, 260 °C i 260 °C, redom. Zapremina injektovanog uzorka bila je 1 µL, injektor je bio u split modu (50:1). Helijum sa brzinom protoka 1 mL/min je korišćen kao noseći gas. Vreme analize bilo je 35 min. Jedinjenja su identifikovana poređenjem dobijenih masenih spektara uzoraka i standarda sa onima u bazi podataka. Rezultati sadržaja masnih kiselina u uzorcima Čage izraženi su kao g/100 g suve mase ekstrakta.

4.3. Biološka karakterizacija ekstrakata

4.3.1. Antioksidativna aktivnost

Za ispitivanje antioksidativnih svojstava uzoraka u *in vitro* uslovima, korišćene su različite metode koje odgovaraju različitim nivoima antioksidativne aktivnosti. Primenom spektrofotometrijskih testova poređene su sposobnost hvatanja slobodnih 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil radikala (DPPH[•]), sposobnost neutralizacije radikal katjona 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonske kiseline) (ABTS^{+•}), sposobnost redukcije jona bakra (Cu²⁺) i sposobnost heliranja jona gvožđa (Fe²⁺).

4.3.1.1. Sposobnost neutralizacije slobodnih DPPH[•]

Sposobnost neutralizacije slobodnih DPPH[•] ispitana je pomoću modifikovane spektrofotometrijske metode koju su opisali Kozarski i sar. (2011). Metoda je zasnovana na promeni boje ljubičasto obojenog radikala u redukovanu formu koja je žute boje. Prvo je svakom uzorku *I. obliquus* koji je rastvoren u 5% DMSO (0.156 – 10 mg/mL, 2 mL) dodato po 1,0 mL sveže pripremljenog 0,2 mM rastvora DPPH[•] (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, USA) u DMSO. U sledećem koraku svakom uzorku je dodato po 1 mL rastvora DMSO. Ovako pripremljeni rastvori su mešani na vorteksu, a potom ostavljeni u mraku na sobnoj temperaturi 40 min. Absorbanca rastvora očitana je na UV/VIS spektrofotometru (Shimadzu UV-1800, Kyoto, Japan) na 517 nm. Kao kontrolni uzorak (slepa proba) korišćen je rastvor koji je sadržao sve komponente bez ekstrakta. Sposobnost hvatanja slobodnih DPPH[•] radikala računata je prema sledećoj formuli:

Sposobnost neutralizacije slobodnih DPPH[•] (%) = $[1 - (A_i - A_j) / A_c] \times 100$

A_i – apsorbanca 2 mL ekstrakta sa dodatkom 1 ml rastvora DPPH[•]; A_j – apsorbanca 2 mL

ekstrakta sa dodatkom 1 mL rastvora DMSO; A_c – apsorbanca kontrolnog rastvora 2 mL DMSO i 1 mL DPPH[•].

Kao pozitivna kontrola korišćen je katehin (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, USA).

4.3.1.2. Sposobnost neutralizacije ABTS⁺

Metoda je zasnovana na neutralizaciji ABTS⁺ koji se formira hemijskom oksidacijom rastvora ABTS⁺ sa K₂S₂O₄ nekoliko sati pre analize (Re i sar., 1999), adaptirana je za izvođenje u mikrotitracionim pločama sa 96 bunarića. Radni rastvor K₂S₂O₄ se priprema mešanjem 0,378 g ovog reagensa sa 10 mL destilovane vode. Reakcija oksidacije rastvora ABTS⁺ (0,0192 g u 5 mL odgovarajućeg rastvarača) se inicira dodatkom radnog rastvora K₂S₂O₄. Ovako pripremljen rastvor se zatim ostavi da stoji na sobnoj temperaturi u mraku od 12-16 h, pri čemu je rastvor tamno plave boje. Potom se razblažuje vodom do finalne koncentracije ABTS⁺ od 1%. Nakon pripreme reagenasa, svi analizirani uzorci (0,5 – 4 mg/mL) su rastvoreni u 5% DMSO. Serijska razblaženja uzoraka pomešana su sa rastvorom ABTS⁺ (200 µL) i posle 20 min inkubacije u mraku apsorbancu (As) je očitana na spektrofotometru na 630 nm (BioTek ELx808 microplate reader, Inc., Winooski, VT, SAD). Smeša rastvarača i rastvora ABTS⁺ predstavljala je apsorbancu kontrolnog rastvarača (Ac). Izračunat je procenat neutralizacije ABTS⁺ za sve ispitane koncentracije uzoraka koristeći sledeću formulu:

$$\text{Sposobnost neutralizacije ABTS}^{+} (\%) = [(Ac - Auz)/Ac] \times 100$$

Kao standard je korišćena askorbinska kiselina (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, USA).

4.3.1.3. Sposobnost redukcije jona bakra

Sposobnost ekstrakata da redukuju metalne jone ispitana je na jonima bakra (Cu²⁺) metodom CUPRAC (CUPric Ion Reducing Antioxidant Capacity) (Özyürek i sar., 2014). Alikvoti rastvora CuCl₂ (10 mM), neokuproina (7,5 mM), CH₃COONH₄ pufera (1 M, pH 7,0) i serijska razblaženja uzoraka (40µL, 0,156-10 mg/mL) pripremljenih u 5% DMSO dodati su u mikrotitar ploče sa 96 bunarića: reakcione smeše su inkubirane 1 h u vodenom kupatilu na 30 °C. Apsorbancu je merena na spektrofotometru, na 450 nm (BioTek ELx808 microplate reader, Inc., Winooski, VT, SAD). Kao pozitivna kontrola je korišćena askorbinska kiselina.

4.3.1.4. Sposobnost heliranja jona gvožđa

Sposobnost heliranja Fe²⁺ je određena u skladu sa modifikovanom metodom koju su opisali Dinis i sar., (1994). Ekstraktima gljive *I. obliquus* (0,156 – 10 mg/mL, 1,0 mL) koji su pripremljeni u 5% DMSO dodato je 3,7 mL DMSO i 0,1 ml 2 mM ferohlorida (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, USA). Reakcija je inicirana dodatkom 0,2 mL 5 mM ferozina Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, USA). Apsorbancu ispitivanih ekstrakata je merena na UV/VIS spektrofotometru (Shimadzu UV-1800, Kyoto, Japan) na 562 nm, posle 10 min na sobnoj temperaturi. Kontrolni rastvor sadržao je ferohlorid i ferozin, koji učestvuju u formiranju kompleksa ali bez ispitivanih ekstrakata. Niža apsorbancu je ukazivala na jaču sposobnost heliranja. Sposobnost heliranja jona gvožđa je računata po sledećoj formuli:

$$\text{Sposobnost heliranja Fe}^{2+} (\%) = [(Abl - Auz)/Abl] \times 100$$

Abl - apsorbancu kontrolnog rastvora; Auz - apsorbancu rastvora sa uzorkom

Etilen diamin tetra sirćetna kiselina (EDTA) (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, USA) je korišćena kao pozitivna kontrola.

4.3.2. Antimikrobna aktivnost

4.3.2.1. Bakterijski sojevi, odžavanje i priprema

Antimikrobna svojstva ekstrakata *I. obliquus* ispitivana su na 8 mikroorganizama, od kojih su 4 iz američke tipske kolekcije kultura, ATCC (American Type Culture Collection, Rockville, Maryland), dok su 4 klinički izolati dobijeni iz Gradskog instituta za Javno zdravlje (Beograd, Srbija), Instituta Torlak (Beograd, Srbija) i Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Univerziteta u Beogradu. Testirani bakterijski sojevi čuvani su u Miler-Hinton bujonu (MHB) (Biolife, Milan, Italy), sa dodatkom 20% glicerola, na -20 °C. Čiste kulture mikroorganizama održavane su na 4 °C na kosim agarima i presejavane na svakih 15 dana. Pregled korišćenih sojeva i podloga za njihovo održavanje dat je u Tabeli 3.

Tabela 3. Bakterijski sojevi

Bakterijski sojevi	Poreklo	Kolekcija
Gram pozitivne bakterije		
<i>Staphylococcus aureus</i> 25923	ATCC	Katedra za tehnološku mikrobiologiju, Poljoprivredni fakultet (Beograd)
<i>Enterococcus faecalis</i> 29212	ATCC	
Meticilin-rezistentni <i>Staphylococcus aureus</i> MRSA	klinički izolat	Gradski institut za Javno zdravlje (Beograd)
<i>Enterococcus faecalis</i>	klinički izolat	Institut Torlak (Beograd)
Gram negativne bakterije		
<i>Esherichia coli</i> 25922	ATCC	Katedra za tehnološku mikrobiologiju Poljoprivredni fakultet (Beograd)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 35032	ATCC	
<i>Esherichia coli</i>	klinički izolat	Institut Torlak (Beograd)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> MMA83	klinički izolat	Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo (Beograd)

Antimikrobna svojstva ekstrakata *I. obliquus* u *in vitro* uslovima utvrđena su mikrodilucionom metodom i praćenjem kinetike rasta mikroorganizama merenjem optičke gustine.

4.3.2.2. Utvrđivanje minimalne inhibitorne (MIC) i minimalne baktericidne koncentracije (MBC) testiranih ekstrakata

Mikrodiluciona metoda, opisana ranije od strane Klaus i sar. (2015), je korišćena za određivanje minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) i minimalne baktericidne koncentracije (MBC) testiranih ekstrakata za odabrane ATCC i kliničke sojeve patogenih

bakterija (Tabela 2). Korišćene su mikrotitar ploče sa 96 bunarića (Tissue Culture Plate, Sarstedt, Nümbrecht, Nemačka). Vršeno je dvostruko serijsko razblaživanje uzoraka u MHB medijumu u koncentracionom rangu 20 – 0,625 mg/mL. Finalna gustina ćelija bakterija je iznosila 10^5 CFU/mL. Pored bunara sa ispitivanom supstancom, postavljena je i negativna kontrola (kontrola rasta bakterija) i kontrola sterilnosti (blank). Uzorci ekstrakata gljive *I. obliquus* su rastvarani u 5% DMSO pa je pripremljena i kontrola rastvarača, po istom principu serijskog razblaživanja kao u slučaju testiranih supstanci. Finalna koncentracija DMSO, kao rastvarača u kome su rastvoreni testirani ekstrakti u najvišim koncentracijama (prvi bunarići u mikrotitar pločama) iznosila je 5%. Kao pozitivna kontrola korišćen je antibiotik gentamicin, maksimalna testirana koncentracija bila je 5 mg/mL. Uzorci ekstrakata gljive, kontrola rastvarača i antibiotska kontrola analizirani su u triplikatu. Nakon serijskih razblaženja i postizanja finalne zapremine od 100 μ L, u svaki bunarić dodavano je 10 μ L boje TTC (2,3,5- trifeniltetrazolijum hlorid, Sigma Chemical Co.) (za Gram negativne bakterije) ili 22 μ L resazurina (Sigma Chemical Co.) (za Gram pozitivne bakterije) i mikrotitracione ploče su inkubirane 24 h na 37 °C. Nakon inkubacije praćena je promena boje. Resazurin je plava redukujuća boja koja se obično koristi kao indikator hemijske citotoksičnosti u kulturi ćelija. Odgovor se zasniva na sposobnosti živih, metabolički aktivnih ćelija da redukuju resazurin do rezorufina (jedinjenje roze boje) i konačno do bezbojnog dihidrorezorufina (Karuppusamy and Rajasekaran, 2009). Što se tiče TTC-a ova boja se koristi takođe za razlikovanje metaboličkih aktivnih ćelija od inaktivnih tj. neživih. Žive ćelije poseduju enzim dehidrogenazu koji redukuje TTC, pri čemu ovaj indikator iz bezbojnog prelazi u roze obojeno jedinjenje. Najniža koncentracija na kojoj nije došlo do promene boje tumači se kao MIC vrednost. Iz svih bunara u kojima nije došlo do promene boje, vršeno je zasejavanje na hranljivu podlogu Mueller-Hinton agar (MHA). Nakon inkubacije od 24h na 37 °C posmatran je rast bakterija. Ako je uočen rast ta koncentracija ekstrakata je proglašavana za MIC, odnosno ako do rasta ne dolazi za MBC vrednost. MBC je definisana kao najniža koncentracija pri kojoj je ubijeno 99,9 % bakterijskih ćelija.

4.3.2.3. Određivanje kinetike rasta odabranih bakterija merenjem optičke gustine (OD)

Kinetika rasta odabranih ATCC sojeva i kliničkih sojeva patogenih bakterija u prisustvu ekstrakata određena je u mikrotitar pločama sa 96 bunarića (Tissue Culture Plate, Sarstedt, Nümbrecht, Nemačka), a po metodi Barbolina i sar., (2016). Koncentracije ekstrakata u opsegu od 0,625 do 20 mg/mL korišćene su za analizu. Mikrotitar ploče sa uzorcima ekstrakata, kao i negativna i pozitivna kontrola pripremljene su na isti način kao i za mikrodilucionu metodu. Čitač mikrotitracionih ploča (BioTek ELx808 microplate reader, Inc., Winooski, VT, SAD) kontrolisan Gen5™ softverom je korišćen za merenje optičke gustine (engl. optical density, OD) na svakih 60 minuta tokom 24 h na talasnoj dužini od 630 nm. Tokom analize ploče su inkubirane na 37 °C, a sadržaj automatski mešan 10 sekundi pre svakog očitavanja apsorbance.

4.3.2.4. Utvrđivanje tipa interakcije između odabranih ekstrakata metodom šahovske table (eng. checkerboard assay)

Metoda šahovske table predstavlja dvodimenzionalnu mikrodilucionu metodu pomoću koje je moguće utvrditi tip interakcije između test supstanci u mikrotitar pločama sa 96 bunarića (Schwermer i sar., 2008). Serijska razređenja pojedinačnih ekstrakata vršena su u mikrotitar ploči sa 96 bunarića (Tissue Culture Plate, Sarstedt, Nümbrecht, Nemačka) u zapremini od 200 μ L pri čemu je gradijent test supstanci pravljen u dva pravca – vertikalno i horizontalno. Vertikalna serija razblaženja (ekstrakt Čage) je pravljen u samoj ploči, dok je horizontalna

serija (ekstrakt kantariona) pripremana u ependorf kivetama i naknadno dodata bunarićima. Test supstance su ispitivane u opsegu koncentracija $1/32 \times \text{MIK} - 4 \times \text{MIK}$.

Kao i u MIC testu finalna gustina ćelija bakterija je iznosila 10^5 CFU/mL. U svaki bunarić je dodato 20 μL bakterijske suspenzije. Pored test supstanci ploče su sadržale i kontrolu sterilnosti, kontrolu rasta bakterija, kontrolu rastvarača kao i gradijent pojedinačnih supstanci. Na kraju, praćena je promena boje na prethodno opisani način i nakon 24 h inkubacije na 37 °C, kombinacije koncentracija bez promene boje su definisane kao MIC vrednost za određene testirane kombinacije ekstrakata. Kako bi se definisao efekat (tip) interakcije pojedinačne i u različitim kombinacijama MIC vrednosti se pretvaraju u frakcione inhibitorne koncentracije (eng. Fractional Inhibitory Concetracion, FIC) na sledeći način:

$$\text{FIC}_{(A)} = \frac{\text{MIC (A u prisustvu B)}}{\text{MIC (A)}}; \text{ FIC jedinjenja A}$$

$$\text{FIC}_{(B)} = \frac{\text{MIC (B u prisustvu A)}}{\text{MIC (B)}}; \text{ FIC jedinjenja B}$$

Frakcioni inhibitorni koncentracioni indeks (FICI) predstavlja zbir dve FIC vrednosti i računa se prema formuli:

$$\text{FICI} = \text{FIC}(A) + \text{FIC}(B)$$

Na osnovu FICI vrednosti definiše se tip interakcije između supstanci prema sledećoj šemi: kada je $\text{FICI} \leq 0,5$ onda se interakcija ocenjuje kao sinergizam; za FICI između 0,5 i 1 kao aditivni efekat; kao indiferentan efekat za FICI između 1 i 2 i kao antagonizam za vrednosti veće od 2 (EUCAST, 2000).

4.3.3. Antiadhezivni i antibiofilmski potencijal ekstrakata gljive *I. obliquus*

4.3.3.1. Utvrđivanje produkcije biofilma

Za određivanje produkcije biofilma odabranih ATCC sojeva i kliničkih sojeva patogenih bakterija korišćene su mikrotitar ploče sa 96 bunarića (Tissue Culture Plate, Sarstedt, Nümbrecht, Nemačka). Praćenje produkcije biofilma za svaki testirani mikroorganizam je vršeno u triplikatu i u dva ponavljanja. Na svakoj mikrotitar ploči bila je postavljena i negativna kontrola koja je sadržala samo medijum za rast. Finalna zapremina u svakom bunariću iznosila je 100 μL , dok je finalna gustina ćelija bakterija iznosila 10^5 CFU/mL. Ploče su inkubirane, a inicijalna adhezivnost i produkcija biofilma očitavana je nakon 24 h, odnosno 48 h na 37 °C u aerobnim uslovima. Kvantifikacija biomase biofilma urađena je bojenjem kristal violetom po protokolu Stepanović i sar., (2000) uz male modifikacije. Nakon bojenja i sušenja ploča u svaki bunarić dodato je 150 μL 96% etanola kako bi se rastvorio vezani kristal violet, nakon toga OD vrednost je očitavana na 630 nm (BioTek ELx808 microplate reader, Inc., Winoosci, VT, SAD). Nakon očitavanja OD izračunate su srednje vrednosti triplikata u dva ponavljanja za sve testirane mikroorganizme, kao i za negativne kontrole. Da bi se odredila kategorija produkcije biofilma, za svaku mikrotitracionu ploču je definisana "cut off" vrednost (OD_c) koja predstavlja srednju vrednost apsorbance negativnih kontrola uvećane za vrednost od 3SD (srednja vrednost OD negativne kontrole + 3 Standardne Devijacije).

“Cut off” vrednosti se preračunavaju prema sledećoj šemi (Stepanović i sar., 2000):

- OD ≤ OD_c – nema produkcije biofilma (kategorija 0 ili -);
- OD ≤ OD_c ≤ 2 × OD_c – slaba produkcija biofilma (kategorija 1 ili +);
- 2 × OD_c ≤ OD ≤ 4 × OD_c – umerena produkcija biofilma (kategorija 2 ili ++);
- 4 × OD_c ≤ OD – izražena produkcija biofilma (kategorija 3 ili +++).

4.3.3.2. Uticaj pojedinačnih ekstrakata kao i kombinacija različitih koncentracija na fomiranje biofilma

Analiza uticaja na formiranje biofilma pojedinačnih ekstrakata i njihovih kombinacija ispitivana je u predtretmanu na odabrane ATCC sojeve i kliničke sojeve patogenih bakterija, korišćene su mikrotitar ploče od 96 bunarića (Tissue Culture Plate, Sarstedt, Nümbrecht, Nemačka). U prvi red bunarića dodati su medijum i test supstanca različite koncentracije ekstrakata (20 – 0,625 mg/mL), a potom je vršeno dvostruko serijsko razblaženje uzoraka na prethodno opisani način. Svi bunarići su dopunjeni do zapremine od 200 µL bakterijskom suspenzijom (2 x 10⁵ CFU/mL). Takođe, ispitivan je uticaj odgovarajućih kombinacija ekstrakata na formiranje biofilma odabranog mikroorganizma i to kombinacija ekstrakta Čage sa ekstraktom kantariona. Na osnovu FIC_i vrednosti i ostvarenih interakcija određena je srednja MIC koncentracija odgovarajućih kombinacija ekstrakta. Kao pozitivna kontrola korišćen je antibiotik gentamicin početne koncentracije od 5 mg/mL. Negativna kontrola predstavljala je pojedinačne ekstrakte i razblažene medijumom u istom koncentracionom opsegu, bez bakterija. Praćenje uticaja na formiranje biofilma za svaki testirani mikroorganizam je vršeno u triplikatu i u dva ponavljanja. Ploče su inkubirane, a zatim je iz ploča pažljivo izvučen medijum kako se ne bi oštetio formirani biofilm, bunarići su isprani destilovanom vodom, bojenje 2% kristal violetom (HiMedia Labs Pvt. Ltd., Indija) izvršeno je istom metodologijom kao prilikom utvrđivanja produkcije biofilma. Redukcija inicijalne adhezivnosti i produkcije biofilma očitavana je nakon 24 h odnosno 48 h na 37 °C u aerobnim uslovima na 630 nm (BioTek ELx808 microplate reader, Inc., Winooski, VT, SAD). Kako je apsorbance proporcionalna debljini biofilma, ukoliko dođe do inhibicije formiranja biofilma u tretmanu očekuje se i manja vrednost apsorbance. Iz tog razloga preračunata je i vrednost redukcije inicijalne adhezivnosti biofilma i izražena u procentima. Procenat inhibicije bakterijske adhezije je izražen pomoću sledeće formule (Vunduk i sar., 2023):

$$\% \text{ inhibicije} = \frac{A1 - A2}{A1} \times 100\%,$$

gde je A1, vrednost apsorbance kontrole, dok je A2, vrednost apsorbance tretmana.

4.3.3.3. Uticaj na već formirani biofilm – razaranje biofilma

Za razaranje već formiranog biofilma odabranih ATCC sojeva i kliničkih sojeva patogenih bakterija korišćene su mikrotitracione ploče sa 96 bunarića i zapreminom od 200 µL. Prvog dana eksperimenta, u ploče je dodato 200 µL bakterijske suspenzije u finalnoj koncentraciji 2×10⁵ CFU/mL u MHB medijumu. Nakon inkubacije od 24 h, na 37 °C medijum sa planktonskim bakterijama je uklonjen, dodat je svež sa dodatkom test supstanci u opsegu koncentracija 1/2×MIK – 4×MIK i nastavljena je inkubacija narednih 24 h. Sledećeg dana, uklonjen je medijum, ploče su isprane vodom i biomasa je kvantifikovana kao što je opisano odeljku 4.3.3.2.

4.3.3.4. Kvantifikacija ekstraćelijskih polimernih supstanci (EPS)

Određivanje uticaja odabranih ekstrakata na sposobnost produkcije ekstracelularne polimerne supstance (EPS) odabranog soja *P. aeruginosa* MMA83 ćelije, urađeno je po metodi Croxatto i sar., (2007). MHB medijum (5 ml) je inokulisan sa prethodno pripremljenom bakterijskom suspenzijom (2×10^5 CFU/mL) uz dodatak uzoraka (5 mg/mL), te je sve zajedno inkubirano 24 h. Potom je uzeto 4 ml suspenzije i centrifugirano 15 min na 2000 rpm/min. Odvojeno je 300 ml supernatanta i pomešano sa 1200 ml Alcian blue reagensa (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD). Sve je inkubirano 1 h na sobnoj temperaturi, a zatim još jednom centrifugirano 10 min na 8000 rpm/min. Izdvojen je supernatant te mu je dodato 1200 μ L etanola. Ponovo je centrifugirano 10 min i uzet je precipitat koji je suspendovan u 2 ml SDS-a (sodium dodecyl sulfate, ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD) nakon čega je očitana apsorbancija na 620 nm. Kao uporedni uzorak (pozitivna kontrola) korišćena je suspenzija *P. aeruginosa* MMA83 bez dodatka ekstrakata.

4.3.4. Fluorescentna mikroskopija (*Fluorescence microscopy*)

Uticaj odabranih ekstrakata na dekompoziciju formiranog biofilma kliničkog izolata *P. aeruginosa* MMA83 je praćen upotrebom fluorescentne mikroskopije. Za posmatranje biofilmova korišćene su SYTO9 (ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD) i propidijum jodid (*propidium iodide*, PI; Sigma-Aldrich, Misuri, SAD) fluorescentne boje (Malešević i sar., 2019).

P. aeruginosa MMA83 ćelije (2×10^5 CFU/mL) tretirane su sa ekstraktima (5 mg/mL) i inokulisane u MHB medijumu upotrebom mikrotitar ploča sa 24 bunarića (Tissue Culture Plate, Sarstedt, Nümbrecht, Nemačka). Na dno bunarića stavljena su sterilna pokrovnostakla mikroskopska stakla prelivena sa 1 mL prethodno pripremljene suspenzije. Po završetku inkubacije (24 h, na 37 °C), planktonske ćelije su tri puta oprane sa PBS puferom, a zatim je usledilo bojenje dodavanjem 200 μ L PBS pufera u kome su rastvorene fluorescentne boje u finalnoj koncentraciji od 2,5 μ M. Bojenje je vršeno 30 min na sobnoj temperaturi bez prisustva svetlosti (usled fotosenzitivnosti fluorescentnih boja). Višak boje je uklonjen ispiranjem PBS puferom i spremljen je preparat za mikroskopiranje prebacivanjem pokrovnog stakla na mikroskopsku pločicu. Kako bi se eliminisao biološki uticaj DMSO u eksperimentu, netretiranim ćelijama dodata je ista količina DMSO koja je prisutna u svim testiranim ekstraktima (5 mg/mL).

U cilju praćenja uticaja ekstrakata na razaranje formiranog biofilma, test soj *P. aeruginosa* MMA83 kultivisan je 24 h, na 37°C, u mikrotitar pločama sa sterilnim mikroskopskim staklom. Nakon isteka inkubacije, suspenzija je odlivena i usledilo je pranje PBS puferom (tri puta), a zatim su dodati željeni ekstrakti (5 mg/mL). Nakon narednih 24 h inkubacije (ukupno 48 h), ćelije su oprane i bojenje je izvršeno po prethodno opisanom protokolu.

Nakon pripreme preparata, obojene bakterijske ćelije posmatrane su na Olympus BX51 fluorescentnom mikroskopu (Applied Imaging Corporation, San Jose, Kalifornija, SAD) pod uveličanjem od 20000 uz korišćenje adekvatnih filtera za detekciju SYTO9 i PI boja. Maksimum ekscitacije/emisije za SYTO9 je 480/500 nm, a za PI 490/635 nm. Mikrografije koje su dobijene analizirane su upotrebom softverskog paketa Cytovision verzija 3.1 (Applied Imaging Corporation, San Jose, Kalifornija, SAD).

4.3.5. Skenirajuća elektronska mikroskopija (*Scanning Electron Microscopy*) - SEM

Morfološke promene biofilma nastale pod dejstvom odabranih ekstrakata gljive *I. obliquus* posmatrane su pomoću skenirajućeg elektronskog mikroskopa (SEM). *P. aeruginosa* MMA83 ćelije (2×10^5 CFU/mL) tretirane su sa ekstraktima (5 mg/mL) i inokulisane u MH medijumu

upotrebom mikrotitar ploča od 12 bunarića. Na dno bunarića stavljena su sterilna pokrovnost mikroskopska stakla i prelivena su sa 1 ml prethodno pripremljene suspenzije. Pozitivna kontrola je bila bez ekstrakta, ali je tretirana istom količinom DMSO koja je prisutna u svim testiranim ekstraktima (5 mg/mL). Tako pripremljene suspenzije su inkubirane 24 h, na 37°C. Nakon inkubacije suspenzija je odlivena i usledilo je pranje destilovanom vodom, a zatim fiksacija sa 2,5% glutaraldehidnim rastvorom koji je pripremljen u PBS puferu (pH 7,2) u trajanju od 2 h. Nakon fiksacije, pokrovnost stakla sa uzorcima dehidratirana su u rastućim koncentracijama etanola 25, 50, 75, 90 i 2 x 100%, po 15 minuta. Nakon toga uzorci su dobro osušeni i zalepljeni u tankom sloju na dvostranu provodnu ugljeničnu pločicu i presvučeni zlatom pomoću uređaja Baltec scd 005. Morfološka analiza biofilma je ispitivana na skenirajućem elektronskom mikroskopu, model JEOL JSM-6390LV (JEOL USA, Inc.).

4.3.6. Molekularne analize – metode rada sa RNK molekulima bakterija

4.3.6.1. Gajenje bakterija za potrebe izolacije RNK

Model sistem *P. aeruginosa* MMA83 tretiran je odabranim ekstraktima (5 mg/ml) inokulisan je u MH medijumu i kultivisan 12 h (do dostizanja stacionarne faze rasta) na 37°C, uz intenzivnu aeraciju. Ista zapremina DMSO (sadržana u koncentraciji ekstrakta od 5 mg/mL) dodata je u netretiranu kontrolu. Po isteku kultivacije, ćelije su oborene centrifugiranjem (15871 × g, 2 min; Eppendorf 5424, Hamburg, Nemačka) i potom korišćene za izolaciju RNK.

4.3.6.2. Izolacija RNK iz bakterijskih ćelija

Izolacija RNK iz bakterijskih ćelija vršena je upotrebom komercijalnog kita "RNeasy Mini Kit" (Qiagen, Hilden, Nemačka) uz manje izmene protokola. Nakon sakupljanja ćelijskog taloga, urađena je enzimaska liza resuspendovanjem u 100 µl TE pufera (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7,6), uz dodatak lizozima (15 mg/ml; Serva, Heidelberg, Nemačka) i proteinaze K (20 mg/ml; Sigma-Aldrich, Misuri, SAD), uz inkubaciju od 1 h na 37°C. Po dodavanju 96% etanola (250 µl), ćelijski lizat je prebačen u kolone i oboren (15871 × g, 15 s; Eppendorf 5424, Hamburg, Nemačka). RNK vezana za membranu kolone oprana je dodavanjem 700 µl RW1 pufera (15871 × g, 15 s; Eppendorf 5424, Hamburg, Nemačka), a potom dodavanjem 500 µl RPE pufera dva puta (prvo centrifugiranje 15 s, drugo centrifugiranje 2 min, 15871 × g; Eppendorf 5424, Hamburg, Nemačka). RNK je eluirana sa membrane kolone dodavanjem 30 µL dejonizovane vode bez RNaza i centrifugiranjem (15871 × g, 1 min; Eppendorf 5424, Hamburg, Nemačka).

4.3.6.3. Prečišćavanje bakterijske RNK od DNK molekula

RNK izolovana iz bakterijske ćelije prečišćena je od zaostale DNK upotrebom komercijalnog kita "Ambion DNA-free™ Kit" (ThermoFisher Scientific, Waltham, Masačusets, SAD). Degradacija zaostale DNK vršena je inkubacijom RNK uzoraka u rastvoru 1 × DNaza I pufera i 1 µl DNaze I, 1 h na 37°C. Nakon završetka inkubacije, dodato je 1/10 volumena DNaza i inaktivacionog reagensa, uz lagano mešanje a zatim centrifugiranje (15871 × g, 90 s; Eppendorf 5424, Hamburg, Nemačka). Supernatant sa RNK prebačen je u nove mikrotube.

4.3.6.4. Reverzna transkripcija RNK

Prečišćena bakterijska RNK prevedena je u komplementarnu DNK (cDNK) upotrebom komercijalnog kita "RevertAid RT Reverse Transcription Kit" (ThermoFisher Scientific, Waltham, Masačusets, SAD).

U prvom koraku reverzne transkripcije pripremljena je smeša koja je sadržala RNK kao matricu (500 ng), nasumične heksamere (1 μ L) i dejonizovanu vodu bez RNaze (finalna zapremina 12,5 μ l). U cilju denaturacije potencijalnih sekundarnih struktura RNK, smeša je inkubirana 5 min na 65°C, korišćenjem uređaja Eppendorf 5345/5340 Mastercycler (Eppendorf, Hamburg, Nemačka).

U drugom koraku u smešu je dodat 1 \times reakcioni pufer, RNazni inhibitor (20 U/ μ l, Ribolock), smeša dNTP (1 mM) i reverzna transkriptaza (200 U/ μ l), do finalne zapremine od 20 μ l. Reverzna transkripcija izvršena je u sledećim uslovima reakcije: 10 min na 25 °C, 60 min na 42 °C, 10 min na 70 °C (Eppendorf 5345/5340 Mastercycler, Hamburg, Nemačka). Istovremeno je postavljena kontrolna reakcija koja sadrži sve prethodno navedene komponente izuzev reverzne transkriptaze, u cilju provere potencijalne kontaminacije uzorka sa DNK.

4.3.6.5. Provera prevođenja bakterijske RNK u cDNK i izostanka DNK PCR metodom

Uspešnost prevođenja bakterijske RNK u cDNK, kao i potvrda odsustva DNK u uzorcima, proverena je PCR metodom (eng. Polymerase Chain Reaction) za konstitutivno eksprimiran gen *rpsL* (*P. aeruginosa*). PCR reakciona smeša sadrži sledeće komponente: ukupnu DNK izolata *P. aeruginosa* MMA83 kao matricu (0,1-1 μ g), 1 \times PhusionTM HF reakcioni pufer (sadrži 1,5 mM MgCl₂; ThermoFisher Scientific, Waltham, Masačusets, SAD), smešu dNTP (svaki dNTP u koncentraciji od 0,2 mM), prajmere (2,5 mM), 1 μ l DMSO, PhusionTM High-Fidelity DNK polimerazu (finalna koncentracija 0,02 U/ μ l; ThermoFisher Scientific, Waltham, Masačusets, SAD) i bidestilovanu vodu (finalna zapremina do 25 μ l). Reakciona smeša koja je sadržala sve komponente izuzev DNK matrice korišćena je kao negativna kontrola. PCR produkti dobijeni su korišćenjem uređaja Eppendorf 5345/5340 Mastercycler (Eppendorf, Hamburg, Nemačka).

Sekvence prajmera gena od interesa predstavljane su u Tabeli 4. Za umnožavanje *rpsL* sekvenci, u cilju provere uspešnosti prevođenja bakterijske RNK u cDNK i odsustva zaostale DNK u uzorcima primenjen je sledeći program: inicijalna denaturacija 5 min na 95 °C; 30 ciklusa sukcesivne denaturacije 30 s na 95 °C; hibridizacije 30 s na 53 °C i elongacije 30 s na 72 °C; poslednji ciklus elongacije 7 min na 72°C (Eppendorf 5345/5340 Mastercycler, Hamburg, Nemačka).

Tabela 4. Spisak prajmera za RT-qPCR analizu korišćenih u ovom istraživanju

Gen	Naziv prajmera	Sekvenca (5'-3')	Dužina (bp)	Referenca
<i>lasI</i>	<i>lasI</i> Fw	GCGTGCTCAAGTGTTCAAGG	125	Malešević i sar., 2019
	<i>lasI</i> Rev	GGGCTTCAGGAGTATCTTCCTGG		
<i>lasR</i>	<i>lasR</i> Fw	CTGTGGATGCTCAAGGACTAC	133	Malešević i sar., 2019
	<i>lasR</i> Rev	AACTGGTCTTGCCGATGG		
<i>rhlI</i>	<i>rhlI</i> Fw	CCATCCGCAAACCCGCTACATC	151	Malešević i sar., 2019
	<i>rhlI</i> Rev	CTCCCAGACCGACGGATCGCTCGGC		
<i>rhlR</i>	<i>rhlR</i> Fw	GGGCGTGTTCCGCCGTCCTGG	143	Malešević i sar., 2019
	<i>rhlR</i> Rev	GGTATCGCTCCAGCCAGGCCTTG		
<i>pqsA</i>	<i>pqs</i> Fw	GACCGGCTGTATTCGATTC	74	Malešević i sar., 2020
	<i>pqs</i> Rev	GCTGAACCAGGGAAAGAAC		
<i>mvfR</i>	<i>mvfR</i> Fw	GTCGGGACGGCTACAAGGTCG	121	Malešević i sar., 2020
	<i>mvfR</i> Rev	GATTGCGCGGACCCTTGTTGAG		
<i>pqsH</i>	<i>pqsH</i> Fw	AGGCGAACGAGGGTATTCCT	149	Ćurčić i sar., 2024
	<i>pqsH</i> Rev	TCAGTGGGAATCGCCCTG		
<i>lasB</i>	<i>lasB</i> Fw	CGCAGCGTGGAGAACGCCTA	183	Ćurčić i sar., 2024
	<i>lasB</i> Rev	GTCGGAGAACGCTTCGTTCA		
<i>phzM</i>	<i>phzM</i> Fw	CCGCGACATGGTGCTGTTCTA	170	Ćurčić i sar., 2024
	<i>phzM</i> Rev	TTCATCGCCAGCAGGAAGCG		
<i>rhlC</i>	<i>rhlC</i> Fw	TTCCTGCCGGCCATCCATCTCG	139	Ćurčić i sar., 2024
	<i>rhlC</i> Rev	AAGTGGCCGAGGCGCTGGTAG		
<i>pvdS</i>	<i>pvdS</i> Fw	TACCTGTTCCAGATCGTCCGC	136	Ćurčić i sar., 2024
	<i>pvdS</i> Rev	TTGATGTGCGAGGTTTCCGGC		
<i>algK</i>	<i>algK</i> Fw	GGCAAGTGGCTGGCGGCCAA	178	Ćurčić i sar., 2024
	<i>algK</i> Rev	ACTGGTCGATGCGCTGCTGCG		

4.3.6.6. Kvantitativni PCR u realnom vremenu - RT-qPCR

Transkripciona analiza gena uključenih u QS sistem *P. aeruginosa* kao i u ekspresiju odgovarajućih faktora virulencije vršena je kvantitativnim PCR-om u realnom vremenu (eng. *Real Time quantitative Polymerase Chain Reaction*, RT-qPCR).

Analizirani geni uključeni u QS sistem *P. aeruginosa* MMA83 deo su tri QS mreže *las*, *rhl* i *pqs* (*las* - *lasI*, *lasR*; *rhl* - *rhlI*, *rhlR*; *pqs* - *pqsA*, *pqsH*, *mvfR*), kao i geni odgovorni za virulenciju kod *P. aeruginosa* MMA83 (*lasB*, *phzM*, *rhlC*, *pvdS*, *algK*). Prajmeri za umnožavanje ciljnih cDNK prikazani su u Tabeli 4.

Za RT-qPCR analizu korišćen je komercijalni kit "FastGene IC Green 2 × qPCR Universal Mix" (Nippon Genetics, Dueren, Nemačka). Reakcionu smešu činile su sledeće komponente: 1 µl sintetisane cDNK, 20 ng svakog od odgovarajućih prajmera, 1 µl Rox Low referentne boje, 1 × IC Green 2 × qPCR Universal Mix, i bidestilovana voda do finalne zapremine od 10 µl. Analiza je vršena upotrebom aparata 7500 Real-Time PCR System Thermocycler (Applied Biosystems, Waltham, Masačusets, SAD) prema sledećim uslovima reakcije: inicijalna denaturacija na 95°C/2 min i 40 ciklusa sukcesivne denaturacije na 95°C/5 s; hibridizacije i elongacije na 60°C/32 s. Apsolutnom kvantifikacijom utvrđena je efikasnost

korišćenih prajmera kao i odgovarajuća koncentracija cDNK. Vrednosti relativne transkripcije ciljnih gena utvrđene su 2^{-ΔΔCt} metodom (Livak i Schmittgen, 2001).

Dobijene vrednosti normalizovane su u odnosu na endogenu kontrolu - gen *rpsL* koji kodira protein ribozoma (*P. aeruginosa* MMA83). Kao kalibrator koristi se netretirana kontrola za *P. aeruginosa* MMA83. Eksperimenti su urađeni u triplikatu.

4.3.7. Ispitivanje biološkog potencijala ekstrakata gljive *I. obliquus* na ćelijskim kulturama

4.3.7.1. Procedura čuvanja, održavanja i zamrzavanja ćelijskih linija

Testirane ćelijske linije su čuvane zamrznute na -196 °C u tečnom azotu što omogućava da vijabilnost ćelija bude skoro neograničena. Pored toga, ćelijske linije je moguće čuvati u zamrzivaču (Deep Freez) na -80 °C određeni vremenski period (do 6 meseci). Ćelije su gajene na malim (25 cm²) ili srednjim flaskovima (75 cm²), pri sledećim uslovima u inkubatoru (Binder, Holandija): 100 % vlažnosti, na temperature od 37 °C i sa 5 % zasićenosti CO₂. Po dostizanju eksponencijalne faze rasta (do 80% konfluentnosti) ćelije su tripsinizovane i zamrznute (broj ćelija koji se zamrzavao iznosio je 5×10⁶/mL). Vršeno je postepeno zamrzavanje ćelija, kriotube su prvo ohlađene u frižideru na 4 °C, zatim prebačene na -20 °C i na kraju na -80 °C ili u tečni azot.

4.3.7.2. Oživljavanje zamrznutih ćelijskih kultura, njihovo gajenje i tripsinizacija

Kriotube sa zamrznutim ćelijama su otopljene i sadržaj je prebačen u epruvete za centrifugiranje sa 3 mL odgovarajućeg medijuma i centrifugiran 10 minuta na 1000 rpm (Eppendorf 5424, Hamburg, Nemačka). Nakon uklanjanja supernatanta ćelije su resuspendovane u 1 mL medijuma, zatim su prebačene u mali flask (25cm²) i gajene su do pojave monosloja. U zavisnosti od potrebe, ćelijama je menjan medijum i ispirane su u 1xPBS. Nakon dostizanja 80% konfluentnosti (utvrđeno je posmatranjem na invertnom svetlosnom mikroskopu (Boeko, Nemačka), ćelije su pripremane za tripsinizaciju i presejavanje u novi flask. Tripsinizacija ćelija podrževala je uklanjanje medijuma i ispiranje ćelija sa 1xPBS, a potom je dodavana određena količina rastvora 0,1% tripsina. Nakon inkubacije na 37 °C par minuta, flaskovi su snažno izlupkani kako bi se ćelije odlepile. Dodavanjem duplo veće zapremine medijuma, zaustavljena je reakcija tripsinizacije. Sadržaj je prebačen u epruvete, centrifugiran, zatim je uklonjen supernatant a talog resuspendovan u 1-2 mL odgovarajućeg medijuma. U zavisnosti od potreba određivan je broj ćelija bojenjem tripan plavim ili je urađeno novo presejavanje.

4.3.7.3. Procena broja i vijabilnosti ćelija

Da bi se odredio broj ćelija korišćen je hemocitometar (Bürker komora) i 0,4% rastvor tripan plavog (omogućava razlikovanje živih i mrtvih ćelija tako što žive ćelije ostaju nebojene, a u mrtve prolazi boja i postaju plave). Hemocitometar čine dve komore podeljene na 9 velikih kvadrata i svaki od kvadrata je podeljen na 16 manjih. Kako bi se odredio broj i vijabilnost ćelija pomešano je 10 μL ćelijske suspenzije i 20 μL tripan plavog, a broj ćelija je izračunat prema formuli:

$$\text{Broj ćelija/mL} = \text{broj ćelija u 4 vidna polja} \times 4 \times 3 \times 10^4.$$

Broj ćelija u 4 vidna polja pomnožen je sa 4 zbog broja kvadratića na hemocitometru (16). Pošto je suspenzija ćelija pomešana sa bojom u odnosu 1:2, množi se sa 3, a usled toga što u polje sa 16 kvadratića staje $0,1 \text{ mm}^3$, tj. 10^{-4} , množi se sa 10^4 .

4.3.7.4. Određivanje citotoksičnosti testiranih ekstrakata primenom MTT testa

Citotoksično dejstvo odabranih ekstrakata gljive *I. obliquus* ispitano je MTT testom, koji podrazumeva procenu metaboličke aktivnosti ćelije. MTT (3-(4,5-dimetil(tiazol-2-il)-3,5-difenil-tetrazolijum-bromid) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) je žuta tetrazolijum boja koja se u metabolički aktivnim ćelijama redukuje do nerastvorljivih ljubičastih kristala formazana (Stockert i sar., 2018). Kako bi se kristali formazana rastvorili neophodno je koristiti odgovarajući rastvarač (DMSO). Očitavanje rezultata je spektrofotometrijsko, određuje se intenzitet boje koji je proporcionalan broju metabolički aktivnih ćelija.

Nakon tripsinizacije i određivanja broja ćelija, u mikrotitracione ploče sa 96 bunarića sa ravnim dnom, zasejano je 2×10^4 ćelija po bunariću u DMEM medijumu (Dulbecco's modified eagle's medium) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) 2 mM L-glutaminom i dodatkom fetalnog goveđeg seruma (FBS, Fetal bovine serum) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany). Ploče su ostavljene na inkubaciju 24 h, na $37 \text{ }^\circ\text{C}$, u prisustvu 5 % CO_2 da bi došlo do formiranja monosloja. Narednog dan, iz bunarića je uklonjen medijum, ćelije su isprane 1xPBS-om (phosphate-buffered saline; Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany), dodat je svež medijum sa uzorcima ekstrakata koji su testirani u koncentracionom opsegu od 0,3125–10 mg/mL, u dva odvojena eksperimenta, koristeći po šest bunara mikrotitracione ploče za svaku tačku tretmana. Nakon toga ploče su inkubirane još 24 h. Pored bunarića sa testiranim ekstraktima, svaka ploča je sadržala i bunariće sa kontrolom rastvarača (5% DMSO), kontrolom rasta i kontrolom sterilnosti. Nakon završene inkubacije, dodat je rastvor MTT boje (20 μL rastvora MTT u 200 μL DMEM medijuma) i dodatna inkubacija je trajala 3h. Kada je završen inkubacioni period pažljivo je izvučen medijum a formirani kristali formazana su rastvoreni dodavanjem DMSO. Apsorbance su očitane spektrofotometrijski (Multiscan FC, Thermo Scientific, Šangaj, Kina) na talasnoj dužini od 570 nm i izračunati su procenti preživljavanja (P) prema sledećoj formuli:

$$(\%) = 100 * (OD570_{\text{test supstance}} / OD570_{\text{kontrola rastvarača}})$$

Citotoksičnost je ekstrakata *I. obliquus* ispitana je na fetalnim fibroblastima pluća čoveka (MRC-5, poreklo: Evropska kolekcija ćelijskih kultura, kataloška oznaka ECACC 84101801), melanocitama (Hs 294T, ATCC HTB-140) i ćelijama kolorektalnog adenokarcinoma (SW 620, ATCC CCL-227) i to u opsegu koncentracija 0,312 – 10 mg/mL za ekstrakte IS SWE $200 \text{ }^\circ\text{C}$, IS SWE $120 \text{ }^\circ\text{C}$, IM SWE $120 \text{ }^\circ\text{C}$, IM SWE $200 \text{ }^\circ\text{C}$.

Za sve testirane ekstrakte konstruisane su krive preživljavanja u odnosu na procenat preživljavanja koji je određen za svaku ispitanu koncentraciju. Krive su konstruisane kako bi se procenila koncentracija koja inhibira 50% preživljavanja (IC_{50}). Takođe, određen je indeks selektivne citotoksičnosti (SI_{50}) za testirane ekstrakte prema ćelijskim linijama tumora, tako što je urađeno poređenje IC vrednosti za neizmenjene i tumorske, a potom izračunat SI_{50} prema formuli:

$$\text{SI} = \text{IC}_n(\text{MRC-5}) / \text{IC}_n(\text{HCT116}) \text{ (Bézivin i sar., 2003), gde indeks } n \text{ predstavlja stopu inhibicije preživljavanja za koju je izračunat SI indeks.}$$

Citotoksičnost je procenjena na osnovu procenta preživljavanja za sve testirane koncentracije ekstrakta u odnosu na netretiranu kontrolu. Za ispitivanje genotoksičnosti korišćene su

koncentracije ekstrakata koje su dovele do smanjenja vijabilnosti ćelija za maksimalno 20%, ranije su (Cvetković i sar., 2023) postavili prag za slabu citotoksičnost od 80% preživljavanja.

4.3.8. Ispitivanje genotoksičnosti ekstrakata gljive *I. obliquus* alkalnim komet testom

Alkalni komet test (Single Cell Gel Electrophoresis, SCGE) je metoda koja služi da detektuje oštećenja DNK molekula kod pojedinačnih eukariotskih ćelija. SCGE test omogućava detektovanje jednonančanih i dvanančanih prekida, kao i labilnih mesta (Singh i sar., 1988). Negativno naelektrisani fragmenti DNK kreću se kroz agarozni gel od katode ka anodi, pri čemu fragmenti koji imaju oštećenja formiraju „komete“, dok neoštećena DNK ostaje u kompaktnoj formi.

Alkalni komet test sproveden je prema metodi koju su prethodno opisali Cvetković i sar., (2023). U ploče sa 12 bunarića zasejane su ćelije u koncentraciji 3×10^5 ćelija/mL. Nakon isteka inkubacionog perioda (24 h, na 37°C u prisustvu 5% CO₂), medijum je zamenjen i dodat je novi sa ili bez odgovarajuće koncentracije testiranih ekstrakata. Odgovarajuće koncentracije odabrane su na osnovu rezultata koji su dobijeni u MTT testu. Kao pozitivna kontrola korišćen je 4-nitrohinolin 1-oksidi (4NQO) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) (koncentracije 2 µg/mL).

Kako bi se pripremile ćelije neophodno je da se nakon tretmana izvuku iz bunarića i isperu 1×PBS-om, a potom da se doda 600 µL 0,1% tripsina. Dodavanjem 600 µL odgovarajućeg medijuma prekinuta je reakcija tripsinizacije, sav sadržaj prebačen je u odgovarajuće Eppendorf kivete i centrifugiran 1000 rpm (Eppendorf 5424, Hamburg, Nemačka), 10 min. Nakon centrifugiranja uklonjen je supernatant, dok je talog resuspendovan u medijumu. Mikroskopske pločice su dobro oprane i na njih je naneto 80 µL 1% NMP (normal melting point agarose, Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) i prekriveno pokrovnim staklom. Pločice su pripremljene u duplikatu i stavljene u frižider kako bi se gel stegao. Na pločice je naneto 30 µL ćelijske suspenzije pomešane sa 1% LMP (low melting point agarose, Sigma-Aldrich Steinheim, Germany) i na ovaj način ćelije su bile spremne za liziranje. Proces lize ćelija izvršen je potapanjem pločica u pufer za lizu ćelija (pH 10) u trajanju od 1h, u mraku na 4 °C. Ovim procesom DNK se oslobađa uklonjanjem membrana i narušavanje citoplazme i nukleoplazme. Po završetku liziranja, pločice su prebačene u kadicu za elektroforezu sa puferom (pH 13). U ovom puferu prvo je urađena denaturacija u trajanju 20 min (4 °C u mraku) gde došlo do raskidanja vodoničnih veza u molekulu DNK, a potom je usledila elektroforeza pri istim uslovima, jačini struje od 300 mA i naponu od 25. Pločice su potopljene u pufer za neutralizaciju (pH 7,5) u toku 15 min na 4 °C. Pločice su čuvane u vlažnoj posudi na 4 °C do analize.

Na dan analize gelovi su bojeni fluorescentnim interkalirajućim agensom akridin oranžom (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) (koncentracije 2 µg/mL). Na svaki gel naneto je po 20 µL ove boje i prekriveno pokrovnom ljušpicom, zatim su analizirani pomoću fluorescentnog mikroskopa (Leica, DMLS, Beč, Austrija), pod uvećanjem 400x, upotrebom emisionog filtera 590 nm, ekscitacionog filtera (510–560 nm) i softvera Comet IV Computer (Perceptive Instruments, Edmunds, UK). Nasumično je odabrano po 100 nukleusa (50 po gelu) i analizirano. Kako bi se pratio nivo oštećenja DNK molekula intezitet repa komete (Tail intensity, TI) je uzet kao pokazatelj oštećenja DNK.

4.4. Statistička analiza podataka

Za sve statističke analize, izuzev MTT i alkalnog komet testa, korišćen je SPSS Statistics 17.0. Statistička analiza urađena je primenom jednofaktorske analize varijanse (one-way ANOVA). Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm standardna devijacija. Naknadna poređenja sprovedena su korišćenjem *Tukey post hoc* testa, na nivou statističke značajnosti $*p < 0,05$. Pomoću GraphPad Prism 6.01 softvera (Software, Inc), rezultati dobijeni u MTT testu analizirani su jednofaktorskom one-way ANOVA korišćenjem Dunnettovim *post hoc* testa, sa nivoom statističke značajnosti $*p < 0,05$; $**p < 0,01$; $***p < 0,001$. Pomoću Statistica 7.0 softvera (StatSoft, Inc), podaci dobijeni alkalnim komet testom analizirani su pomoću neparametarskih testova Kolmogorov-Smirnov i Mann-Whitney U testa, sa nivoom statističke značajnosti $*p < 0,05$; $**p < 0,01$; $***p < 0,001$.

Analiza glavnih komponenti (Principal Component Analysis - PCA) je urađena korišćenjem Rstudio v2022.07.2 (R Studio team) u odnosu na prinos i 51 hemijski parametar (23 fenolna jedinjenja sa ukupnim sadržajem fenola i 22 šećera i njihov ukupan sadržaj) dobijena pomoću tri tipa ekstrakcija.

5. Rezultati i diskusija

5.1. Zelene ekstrakcije

Carstvo gljiva (posebno Basidiomycota) izuzetno je raznovrsno, ali još uvek nedovoljno istraženo. Dosadašnja istraživanja ukazuju da mnogi predstavnici ovog carstva mogu biti dobar izvor novih lekova i biološki aktivnih jedinjenja sa primenom u medicini, kao hrana za ljude i životinje, ali i kao dijetski suplementi (Kozarski i sar., 2023). Sa jedne strane, postoji sve veći broj istraživanja koja opisuju različite vrste Basidiomycota i njihovu biološku aktivnost *in vitro*, dok sa druge strane raste i broj kliničkih ispitivanja baziranih na prečišćenim jedinjenjima kao što su β -glukani. Broj zabeleženih lekovitih efekata iznosi više od 130 (Thomas i sar., 2020). Zbog brojnih zdravstvenih prednosti gljive su sve traženije kao hrana ili dijetski suplementi, ali je neophodno obezbediti i odgovarajući kvalitet i kvantitet. Put do efikasnog proizvoda je dug i spor, neophodno je da proizvodni ciklus smanji upotrebu štetnih hemikalija i ukupnu količinu emitovanih gasova koji izazivaju efekat staklene bašte (ugljenični otisak). Kao jedna od opcija koja istovremeno povezuje i ispunjava navedene kompleksne zahteve jesu zelene tehnologije. U ovom radu, ispitano je nekoliko tipova zelenih ekstrakcija u skladu sa globalnim zahtevima.

Da bi se procenilo koliko različiti tipovi zelenih ekstrakcija utiču na hemijski sastav, kao i na različite biološke odgovore pripremljeni su različiti ekstrakti komercijalno značajne lekovite gljive Čage, poreklom iz Mongolije i Srbije. Primenjene su sledeće ekstrakcije: ekstrakcija ultrazvukom i mikrotalasima gde su kao rastvarači korišćeni voda ili etanol, subkritična vodena ekstrakcija na različitim temperaturama i ekstrakcija superkritičnim ugljendioksidom.

5.1.1. Prinos ekstrakata *I. obliquus* ostvaren zelenim ekstrakcijama

Ekstrakti *I. obliquus* koji su ispitivani u ovom radu dobijeni su različitim tehnikama ekstrakcije te je prinos bio direktno zavisao od primenjene tehnike. Prosečan prinos za svaki ekstrakt izračunat je i predstavljen u Tabeli 5. Najveći prinos dobijen je subkritičnom vodenom ekstrakcijom za sledeće uzorke: IM SWE 120 °C ($33,7 \pm 1,10$ g/100 g), IM SWE 200 °C ($21,27 \pm 2,46$ g/100 g), IS SWE 120 °C ($20,52 \pm 0,79$ g/100 g), i SWE 200 °C ($18,93 \pm 0,23$ g/100 g). Za Čage sa oba područja subkritična vodena ekstrakcija dala je veći prinos na nižoj temperaturi (120 °C) u poređenju sa svim ostalim tehnikama ekstrakcije. Ovo se slaže sa prethodnim istraživanjima prema kojima se najveći prinos dobija kada se voda kombinuje sa visokim temperaturama i pritiskom, kao što je bio slučaj kod SWE. Tako su ranije Wontcheu Fotso i sar., (2023) objavili da je prinos ekstrakata Čage bio u rasponu od 0,02-0,03 g/g kada su koristili etanol, a da je voda znatno poboljšala prinos istog materijala (10x) na 0.2-0.3 g/g. Sve ovo ukazuje da je u Čagi prisutno više hidrofilnih jedinjenja. Takođe, Ma i sar., (2023) su pokazali da su optimalni uslovi SWE (200 °C i vreme ekstrakcije od 13 min) obezbedili najveći prinos (16,2 g/100 g), a da je dalje povećanje temperature na 220 °C dovelo do značajnog smanjenja prinosa. Najniži prinos dobijen je ekstrakcijama sa 96% EtOH (ultrazvučna i mikrotalasna) i to: IS MW ($0,3 \pm 0,10$ g/100 g), IM VAE ($0,9 \pm 0,34$ g/100 g), IS VAE ($1,06 \pm 0,26$ g/100 g) i IM MW ($2,17 \pm 0,31$ g/100 g). Nizak prinos zapažen je i kod ekstrakata dobijenih superkritičnim ugljendioksidom, IM SFE ($0,18 \pm 0,09$ g/100g) i IS SFE ($0,62 \pm 0,03$ g/100g). U većini slučajeva nije bilo statistički značajne razlike između prinosa Čage poreklom iz Mongolije i Srbije kada je primenjena ista tehnika ekstrakcije.

Kako su ranije Simić i sar. (2021) naveli, značajne razlike u prinosu ekstrakata postoje zbog primene različitih tehnika, porekla sirovine, klimatskih uslova kao i izbora rastvarača. Kod subkritične vodene ekstrakcije temperatura je najvažniji faktor (Hu i sar., 2017). Povišena

temperatura ekstrakcije može da promeni karakteristike rastvarača, da poveća brzinu difuzije i rastvorljivost uz smanjenje viskoziteta i površinskog napona što olakšava ekstrakciju željenih jedinjenja (Thirugnanasambandham i sar., 2015). Međutim, ekstremno visoke temperature tokom procesa ekstrakcije mogu da izazovu oštećenja i degradaciju različitih jedinjenja. Rastvarač takođe igra važnu ulogu kod subkritične vodene ekstrakcije. Voda, kao zeleni rastvarač, pogodan je molekul za industriju zbog svoje nezapaljivosti, netoksičnosti, niske cene i dostupnosti. Dielektrična konstanta i polaritet mogu se modifikovati pod kritičnim uslovima i na taj način omogućavaju vodi da deluje kao rastvarač za nepolarna jedinjenja i da se ponaša slično organskim rastvaračima kao što su etanol ili metanol (Fraterrigo Garofalo i sar., 2021).

5.2. Hemijska karakterizacija ekstrakata gljive *I. obliquus*

5.2.1. Sadržaj proteina u ekstraktima gljive *I. obliquus*

Proteini su važne funkcionalne komponente u gljivama, sve interesantnije zbog svog farmaceutskog potencijala i upotrebe u razvoju funkcionalne hrane (González i sar., 2020). U ovom istraživanju, ukupan sadržaj proteina bio je u opsegu $7,08 \pm 0,13 - 26,82 \pm 1,71$ mg BSA/g (Tabela 5). Ekstrakti sa najvišim sadržajem proteina dobijeni su upotrebom vode ili 50% EtOH, takođe, i SWE uzorci bez obzira na temperature imaju visok nivo ukupnih proteina. Polarna priroda vode omogućava da se korisiti kao rastvarač za ekstrakciju jedinjenja rastvorljivih u vodi kao što su proteini, šećeri i organske kiseline (Fraterrigo Garofalo i sar., 2021). Najmanji prinos ukupnih proteina određen je u uzorcima MW i VAE kada je korišćen 96% EtOH kao rastvarač. Poreklo materijala nije imalo uticaj na prinos proteina. Pošto je korišćena visoka koncentracija etanola dolazi do povećanja elektrostatičkih interakcija između polarnih delova različitih molekula proteina i to dovodi do njihovog taloženja. Ranije su Al Azad i Ai Ping, (2021) objavili da je voda bila bolji rastvarač od alkohola prilikom ekstrakcije proteina iz gljiva. U oba SFE ekstrakta nisu detektovani proteini zbog loše rastvorljivosti uzoraka (dobijene su negativne vrednosti).

5.2.2. Ukupan sadržaj šećera u ekstraktima gljive *I. obliquus*

Ukupan sadržaj šećera pokazao je najveći stepen variranja u zavisnosti od načina dobijanja ekstrakata (Tabela 5). Najveći prinos utvrđen je kod SWE (200 °C) IS ($536,15 \pm 39,54$ mg GLU/g) i IM ($580,28 \pm 4,23$ mg GLU/g) uzoraka. Ekstrakcijom superkritičnim ugljendioksidom dobijen je najniži sadržaj (IS $36,35 \pm 0,13$ i IM $32,58 \pm 0,18$). Takođe, mikrotalasna ekstrakcija u kombinaciji sa 96% EtOH dala je znatno niži prinos ukupnih šećera kod obe Čage IS ($183,95 \pm 17,28$ mg GLU/g) i IM ($146,90 \pm 6,66$ mg GLU/g) u odnosu na sve ostale tipove ekstrakcije. Generalno, voda je bila najbolji rastvarač bez obzira na tehniku ekstrakcije. Slično kao i sa prinosom i ukupnim proteinima, poreklo Čage nije imalo uticaja na sadržaj ekstrahovanih šećera. Kao što se može videti u Tabli 5. sadržaj ukupnih šećera kod SWE uzoraka značajno je rastao sa porastom temperature sa 120 na 200 °C. Taj trend je primećen i kod mongolske i kod srpske Čage. U ranijem istraživanju, Xi i sar. (2017) takođe su pokazali da je povećanje temperature kod subkritične vodene ekstrakcije sa 160 na 190 °C rezultiralo povećanjem sadržaja polisaharida sa 85 mg/g na 132 mg/g, a da je daljim povećanjem temperature (do 200 °C) došlo do smanjenja sadržaja šećera (100 mg/g). Smanjenje sadržaja šećera sa povećanjem temperature može se pripisati razgradnji i hidrolizi ovih polimera kada su izloženi visokim temperaturama tokom dugog vremena ekstrakcije, posebno u subkritičnim uslovima (Yue i sar., 2022). Ma i sar., (2023) su potvrdili da je sadržaj polisaharida SWE ekstrakata *I. obliquus* bio znatno viši (286,06 mg/g) nego kod ekstrakata dobijenih toplom vodom (3,66 mg/g). Kada se voda nađe pri povišenom pritisku i

temperature iznad tačke ključanja rastvaraju se i hidrofobna jedinjenja (Smiderle i sar., 2017). Generalno, niže temperature (ispod 100 °C) povećavaju prinos supstanci koje su rastvorljive u vodi, dok više temperature (iznad 100 °C) podstiču izdvajanje jedinjenja koja su nerastvorljiva i većih molekulske mase (Kit i sar., 2021). Pored vode, etanol se često koristi u ekstrakciji polisaharida kako bi se omogućilo potpuno odvajanje drugih jedinjenja kao što su lipidi, fenoli i terpeni (Rodrigues Barbosa i sar., 2020). Ostale primenjene tehnike ekstrakcije nisu bile dovoljno efikasne u ekstrakciji polisaharida pošto uslovi pri kojima su urađene nisu bili dovoljno intenzivni da razbiju ćelijski zid i raskinu vodonične veze u samoj sirovini.

Tabela 5. Ukupan prinos, sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja (TPC), ukupno ekstrahovanih proteina (TEP), ukupnih polisaharida (TPS), ukupnih glukana (TG), sadržaj α - i β - glukana u ekstraktima gljive *I. obliquus*

Uzorci	Prinos (g/100 g)	Ukupni proteini (mg BSA/g)	Ukupni fenoli (mg GAE/g)	Ukupni polisaharidi (mg GLU/g)	Ukupni glukani (g GLU/100 g)	α (g GLU/100 g)	β (g GLU/100 g)	
IS	MW 96% EtOH	0,30 ± 0,10 ^a	9,45 ± 2,32 ^{ab}	72,79 ± 0,77 ^g	183,95 ± 17,28 ^{ab}	4,85 ± 0,12 ^{ef}	2,32 ± 0,12 ^g	2,51 ± 0,01 ^{cde}
	MW 50% EtOH	9,70 ± 0,09 ^{de}	26,82 ± 1,47 ^f	90,16 ± 1,51 ^h	342,27 ± 49,86 ^{cd}	6,71 ± 0,20 ^{hi}	2,96 ± 0,08 ⁱ	3,75 ± 0,12 ^{fg}
	MW water	11,03 ± 0,63 ^{ef}	19,42 ± 0,95 ^{cd}	69,49 ± 0,75 ^g	385,98 ± 3,96 ^d	6,06 ± 0,01 ^{gh}	2,83 ± 0,09 ⁱ	3,24 ± 0,09 ^{efg}
	VAE 96% EtOH	1,06 ± 0,26 ^{ab}	7,56 ± 0,28 ^a	63,21 ± 0,31 ^{eg}	339,19 ± 30,89 ^{cd}	2,65 ± 0,02 ^{ab}	2,03 ± 0,01 ^{ef}	0,62 ± 0,01 ^a
	VAE 50% EtOH	3,60 ± 0,49 ^{abc}	12,49 ± 0,37 ^b	62,43 ± 0,60 ^{eg}	297,58 ± 9,54 ^{bc}	5,58 ± 0,10 ^{fg}	2,55 ± 0,01 ^h	3,03 ± 0,10 ^{def}
	VAE water	4,45 ± 0,05 ^{bc}	18,18 ± 0,66 ^{cd}	40,45 ± 3,58 ^{cd}	296,19 ± 6,76 ^{bc}	6,11 ± 0,06 ^{ghi}	1,83 ± 0,01 ^d	4,28 ± 0,06 ^g
	SWE 200 °C	18,93 ± 0,23 ^f	17,95 ± 1,88 ^e	89,94 ± 1,58 ^h	536,15 ± 39,54 ^e	20,43 ± 1,09 ⁱ	1,43 ± 0,03 ^c	19,00 ± 1,12 ^h
	SWE 120 °C	20,52 ± 0,79 ^f	20,68 ± 0,18 ^{cde}	70,39 ± 15,09 ^g	349,00 ± 23,84 ^{cd}	7,20 ± 0,16 ⁱ	3,46 ± 0,05 ^j	3,74 ± 0,12 ^{fg}
SFE	0,62 ± 0,03 ^{ab}	nd	nd	36,35 ± 0,13 ^a	nd	nd	nd	
IM	MW 96% EtOH	2,17 ± 0,31 ^{abc}	10,08 ± 0,22 ^{ab}	32,56 ± 0,86 ^{bc}	146,90 ± 6,66 ^{ab}	3,56 ± 0,18 ^{bcd}	1,97 ± 0,05 ^{de}	1,59 ± 0,13 ^{abc}
	MW 50% EtOH	9,20 ± 4,0 ^{de}	26,18 ± 1,71 ^f	55,65 ± 0,88 ^{cf}	400,87 ± 17,29 ^d	3,80 ± 0,35 ^{cde}	1,92 ± 0,07 ^{de}	1,87 ± 0,28 ^{bc}
	MW water	14,63 ± 2,75 ^f	23,66 ± 0,11 ^{ef}	47,81 ± 0,12 ^{de}	306,71 ± 15,90 ^{bc}	4,36 ± 0,13 ^{de}	2,13 ± 0,04 ^f	2,23 ± 0,17 ^{cde}
	VAE 96% EtOH	0,90 ± 0,34 ^{ab}	7,08 ± 0,13 ^a	23,24 ± 3,38 ^{ab}	249,90 ± 16,89 ^b	2,17 ± 0,02 ^a	1,05 ± 0,02 ^a	1,13 ± 0,17 ^{ab}
	VAE 50% EtOH	3,07 ± 0,34 ^{abc}	21,10 ± 2,96 ^{cde}	46,88 ± 0,90 ^{de}	372,37 ± 1,29 ^d	3,88 ± 0,09 ^{cde}	1,27 ± 0,02 ^b	2,61 ± 0,11 ^{cde}
	VAE water	3,80 ± 0,10 ^{abc}	19,76 ± 1,55 ^{cde}	19,47 ± 0,49 ^a	292,41 ± 11,92 ^{bc}	3,20 ± 0,08 ^{abc}	1,21 ± 0,01 ^b	1,99 ± 0,08 ^{bcd}
	SWE 200 °C	21,27 ± 2,46 ^f	22,13 ± 1,09 ^{de}	70,4 ± 0,97 ^g	580,28 ± 4,23 ^f	20,95 ± 0,83 ^j	1,34 ± 0,02 ^{bc}	19,61 ± 0,8 ^h
	SWE 120 °C	33,70 ± 1,10 ^h	20,53 ± 0,48 ^{cde}	55,33 ± 0,74 ^{ef}	354,81 ± 7,65 ^d	4,15 ± 0,13 ^{cde}	2,50 ± 0,01 ^{gh}	1,67 ± 0,13 ^{abc}
SFE	0,18 ± 0,09 ^a	nd	nd	32,58 ± 0,18 ^a	nd	nd	nd	

¹Rezultati su izraženi kao srednja vrednost za tri ponavljanja \pm standardna devijacija (n=3)

²Različita slova u kolonama označavaju statistički različite vrednosti ($p < 0.05$)

³nd - nije definisano

5.2.3. Sadržaj ukupnih, α - i β -glukana u ekstraktima gljive *I. obliquus*

Rezultati su pokazali da je na sadržaj ukupnih glukana u ekstraktima Čage uticao način ekstrakcije, ali i izbor rastvarača (Tabela 5). Najveći sadržaj ukupnih glukana utvrđen je kod SWE uzoraka dobijenih na 200 °C i nije se statistički značajno razlikovao za srpsku ($20,43 \pm 1,09$ g/100 g) i mongolsku Čagu ($20,95 \pm 0,83$ g/100 g). Različite koncentracije etanola značajno su uticale na ekstrahovanu količinu glukana: 50% EtOH povećava koncentraciju ukupnih glukana u poređenju sa 96% EtOH. Pored tipa ekstrakcije i izbora rastvarača na ukupan sadržaj glukana uticalo je i poreklo materijala. Pojedinačne komponente od interesa, poput α - i β -glukana, bile su prisutne u relativno malim količinama. Ekstakti dobijeni subkritičnom ekstrakcijom (200 °C) imali su i do 20 puta viši sadržaj β -glukana u odnosu na ostale tehnike ekstrakcije, nije bilo razlike između IM i IS uzoraka. Veći procenat etanola u kombinaciji sa mikrotalasima i ultrazvukom, rezultirao je najnižim sadržajem β -glukana (IS $0,62 \pm 0,01$ i $1,13 \pm 0,17$ g/100 g). U SWE (120 °C) je izmeren najviši sadržaj α -glukana (IS $3,46 \pm 0,05$ i IM $2,50 \pm 0,01$ g/100 g) i značajno su se razlikovali od uzoraka koji su dobijeni na temperaturi od 200 °C. Svi drugi tipovi ekstrakcija rezultovali su sličnom količinom ovog polisaharida. Ekstakti dobijeni ekstrakcijom superkritičnim CO₂ su imali nizak prinos kao i vrlo malo ukupnih ugljenih hidrata, što je verovatno posledica loše rastvorljivosti, zbog čega nisu korišćeni za dalje analize. Glukani, posebno β -glukani, su prirodni polimeri sa velikim terapeutskim potencijalom zbog svog imunomodulatornog, antiinflamatornog, antioksidativnog, antialergijskog efekta kao i antitrombične aktivnosti (Kozarski i sar., 2023). Međutim, najcenjeniji su zbog svoje imunomodulatorne aktivnosti (Mirończuk-Chodakowska i sar., 2021). Industrija pokazuje veliko interesovanje za glukane, zbog svih navedenih bioloških osobina, te je zbog toga neophodno razviti najefikasniju tehniku za ekstrakciju ovih jedinjenja. Većina glukana iz gljiva su rastvorljivi u vodi, a mnoge tehnike mogu olakšati i poboljšati njihovu ekstrakciju kao npr. ultrazvučna, mikrotalasna, enzimska i subkritična ekstrakcija vodom (Sun i sar., 2022). Ranija istraživanja su pokazala slične rezultate kod ekstrakata zlatne bukovače dobijenih na 200 °C tokom 60 min (Jo i sar., 2013). Sadržaj β -glukana je bio najviši na ovoj temperaturi, a dalje povećanje temperature na 250 i 300 °C izazvalo je njegovu degradaciju. Yoo i sar. (2020) su objavili da duže vreme ekstrakcije i viša temperatura ne samo da ne poboljšavaju ekstrakciju β -glukana nego i ubrzavaju njegovu razgradnju.

5.2.4. Ukupan sadržaj fenola u ekstraktima gljive *I. obliquus*

U slučaju ukupnih fenola, kombinovanje 50% EtOH i mikrotalasa rezultiralo je najboljim prinosom za IS ($90,16 \pm 1,51$ mg/g) i IM ($55,65 \pm 0,88$ mg/g). U Tabeli 5. je pokazano da je značajan uticaj na ukupan sadržaj fenola imalo i poreklo sirovine. Takođe, viši sadržaj ukupnih fenola detektovan je u uzorcima dobijenim subkritičnom vodenom ekstrakcijom, bez obzira na temperaturu ekstrakcije. Međutim, zapažena je značajna razlika između IS i IM uzoraka ekstrahovanih na 120 i 200 °C. Kombinacija vode i ultrazvučnih talasa rezultirala je najnižim sadržajem ukupnih fenola kod sledećih uzoraka: IS ($40,45 \pm 3,58$ mg/g) i IM ($19,47 \pm 0,49$ mg/g). U SFE uzorcima nije detektovano prisustvo ukupnih fenola. Pretpostavlja se da je razlog tome loša rastvorljivost uzoraka. Poreklo materijala je takođe imalo izražen uticaj na sadržaj fenola, te su tako ekstakti srpske Čage u većini slučajeva bogatiji fenolima.

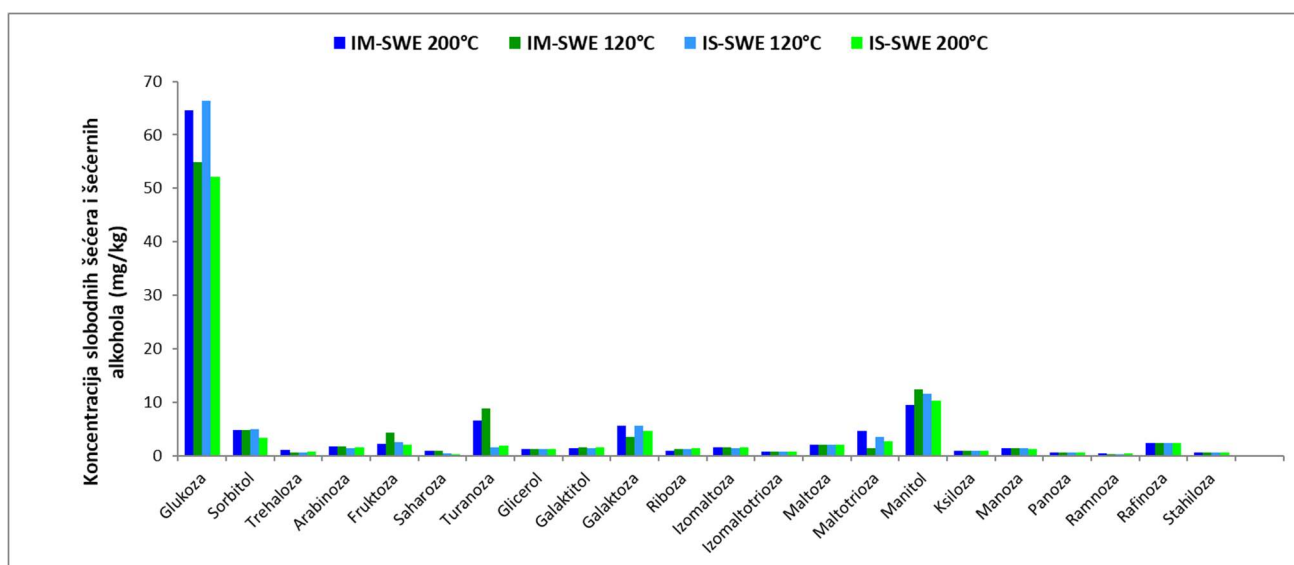
Poznato je da su ekstakti gljiva bogati fenolima koji doprinose zdravlju. Polifenoli su sve popularniji u farmaceutskoj industriji i kozmetičkim proizvodima zbog svoje strukturne

raznolikosti i lekovitih efekata (Janjušević i sar., 2017). Za razliku od drugih gljiva *I. obliquus* je pričvršćena za svog domaćina tokom celog života i apsorbuje polifenole sa drveta na kome raste (Wontcheu Fotso i sar., 2023). U ovom istraživanju kombinovanje 50% EtOH i mikrotalasa dalo je najveći prinos ukupnih fenola, što se slaže i sa prethodnim istraživanjem prema kojima dodavanje vode organskim rastvaračima poboljšava relativni polaritet rastvarača omogućavajući bolju interakciju površine rastvarača i više fenolnih jedinjenja (Luthria, 2012). Boussetta i sar., (2012) su objavili da fenoli pokazuju bolju rastvorljivost u vodenom rastvoru etanola nego u bezvodnom etanolu. Dokazano je i da koncentracija etanola iznad 50% smanjuje količinu polifenola u polisaharidnom ekstraktu *I. obliquus*. U istom istraživanju je pokazano da materijal tretiran SWE ima više fenolnih jedinjenja. Rezultati ovog istraživanja su takođe pokazali da je SWE tehnika efikasna za ekstrakciju fenolnih jedinjenja iz Čage. Ekstrakti dobijeni na temperaturi od 200 °C imali su veći sadržaj fenola u odnosu na one ekstrahovane na 120 °C. To je posledica bolje rastvorljivosti nepolarnih jedinjenja na višim temperaturama, što je rezultiralo i višim sadržajem fenolnih jedinjenja (Ko i sar., 2020). S druge strane, potvrđeno je da ekstrakcija na višim temperaturama pospešuje bolju difuziju rastvarača (u ovom slučaju vode) povećavajući rastvorljivost fenolnih jedinjenja (Seo i Lee, 2010). Isti autori su objavili da je najviši sadržaj ukupnih fenola (10.72 mg/mL) detektovan kod SWE ekstrakata dobijenih na 250 °C tokom 30 min, dok je dostigao samo 0,61 mg/mL kada je ekstrahovan na 50 °C tokom 10 min. U kontekstu dobijanja kombinovanih i popularnih suplemenata, spajanje subkritične i ultrazvučne ekstrakcije bi moglo da obezbedi bolji prinos bioaktivnih jedinjenja (Hwang i sar., 2019).

5.2.5. Kvalitativna i kvantitativna analiza šećera u ekstraktima gljive *I. obliquus*

Profili najrepresentativnijih rastvorljivih šećera kao i njihove količine za SWE ekstrakate srpske i mongolske Čage predstavljani su na Slici 9. Profil šećera za ostale tipove dobijenih ekstrakata priložen je u Prilogu 1 i 2. Na osnovu rezultata dobijenih HPAEC analizom, u svim uzorcima potvrđeno je 22 različita šećera. Monosaharidi su bili prisutni u znatno višim koncentracijama u odnosu na di- i trisaharide, pošto su detektovane glukoza, fruktoza i galaktoza. Najveća količina glukoze je izmerena u SWE uzorcima, posebno onim ekstrahovanim na 200 °C ($64,545 \pm 0,733$ g/kg kod IM uzoraka i $66,308 \pm 0,593$ g/kg kod IS). Poreklo uzoraka nije imalo uticaja, osim u slučaju turanoze. Glukoza je bila prisutna u opsegu od $16,789 \pm 0,316$ do $28,632 \pm 0,416$ g/kg u uzorcima dobijenih pomoću mikrotalasa i ultrazvuka, pri čemu se od svih korišćenih rastvarača voda pokazala kao najbolji izbor. Ostali šećeri koji su ekstrahovani u SWE uzorcima, a da su koncentracije bile veće od nekoliko g/kg, bili su sorbitol, turanoza, galaktoza, maltotriosa i manitol, kao što je prikazano na Slici 9. U poređenju sa svim ekstrakcijama subkritična se izdvojila kao najefikasnija za ekstrahovanje nekoliko pojedinačnih šećera. Veća koncentracija glukoze je bila prisutna u uzorcima dobijenim ekstrakcijom uz pomoć mikrotalasa i ultrazvuka, posebno kada se kao rastvarač koristila voda (IS VAE $16,856 \pm 0,176$ i IM VAE $12,536 \pm 0,221$ g/kg; IS MW $14,653 \pm 0,388$ i IM MW $11,356 \pm 0,168$ g/kg). Generalno, Čaga poreklom iz Srbije imala je znatno veće količine fruktoze. Značajna razlika u sadržaju šećera kod srpske i mongolske Čage zabeležena je u slučaju galaktoze i saharoze. Ovakav trend bio je prisutan kod svih tehnika ekstrakcije izuzev subkritične vodene ekstrakcije. Istovremeno je SWE ekstrakcija dala znatno manje količine saharoze kod oba ekstrakta Čage. Međutim, u Čagi iz Mongolije detektovane količine saharoze bile su u rasponu od 5 do više od 13 g/kg. Poređenja radi, koncentracija saharoze u ekstraktima iz Srbije nije dostigla ni nižu vrednost u odnosu na Mongolske uzorke. Veća koncentracija alkoholnog šećera sorbitola otkrivena je u SWE ekstraktima, oko 5 g/kg i za IM i IS (Slika 9). Drugim tehnikama ekstrakcije dobijene su slične koncentracije sorbitola, uglavnom oko 1,5 do 2,5 g/kg. Još jedan alkoholni šećer, manitol, takođe je bio prisutan u većoj meri u SWE ekstraktima, bez obzira na poreklo i

temperaturu na kojoj je ekstrahovan materijal, njegova najviša koncentracija je bila $12,455 \pm 0,005$ g/kg u Čagi poreklom iz Mongolije. Druge tehnike ekstrakcije nisu se pokazale kao efikasne u ekstrakciji manitola kod Čage iz Srbije, najviša koncentracija je bila nešto iznad 1 g/kg u uzorku VAE kod koga je voda korišćena kao rastvarač. Ista tehnika ekstrakcije i rastvarač dali su najveću koncentraciju manitola u uzorcima iz Mongolije ($10,233 \pm 0,016$ g/kg), značajno višu nego u IS uzorcima ($1,042 \pm 0,006$ g/kg). Glicerol je najefikasnije ekstrahovan mikrotalasima, dok je izbor rastvarača bio manje značajan kod IS nego kod IM. Pored toga, značajno niže količine trehaloze, izomaltoze, maltotrioze, manoze i panoze bile su prisutne ispod 1 g/kg, ili čak manje od 0,1 g/kg u svim ekstraktima, bez obzira koja tehnika ekstrakcije je korišćena.



Slika 9. Sadržaj različitih šećera dobijen u ekstraktima *I. obliquus* dobijenim SWE; IM - mongolska Čaga; IS - srpska Čaga; SWE - subkritična vodena ekstrakcija na 120 i 200°C

Šećeri imaju važnu ulogu u ćelijskom energetskom metabolizmu jer doprinose proliferaciji plodonosnih tela pečurki (Eid i Das, 2020). Brojna korisna svojstva Čage potiču upravo od šećernih komponenti. Xi i sar., (2017) su pokazali da biološka aktivnost *I. obliquus* potiče od nekoliko polisaharida koji se sastoje od sledećih šećera: ramnoze, arabinoze, ksiloze, manoze, glukoze i galaktoze. Dodatno, pokazano je da se polisaharidni ekstrakt *I. obliquus* sastoji uglavnom od glukoze (74,95%) i tragova ramnoze, arabinoze, ksiloze i galakturonske kiseline (Jiang i sar., 2020). Sa druge strane, Ma i sar., (2023) su utvrdili da je monosaharidni sastav SWE uzoraka bio sledeći: ksiloza, fruktoza i arabinoza, mala količina glukoze, manoze, galaktoze. Takođe su zapazili da za razliku od SWE polisaharida, ekstrakti dobijeni toplom vodom uglavnom su sastavljeni od: ramnoze, fruktoze, arabinoze, ksiloze i galaktoze. Ovo je bilo suprotno rezultatima koji su dobijeni u ovom istraživanju koje je pokazalo da je najviša količina glukoze u SWE ekstraktima.

Veći unos fruktoze ishranom ima potencijal da dovede do povećanja telesne težine i da izazove insulinsku rezistenciju, hipertenziju i hiperlipidemiju kod životinjskih modela (Vieira i sar., 2016). Svi SWE uzorci pokazali su nizak sadržaj fruktoze i stoga su pogodni za dijetetske suplemente. Razlozi za razlike u kvantitativnoj analizi šećera nisu jasni ali mogu biti povezani sa različitim geografskim poreklom, okruženjem, posebno zemljištem,

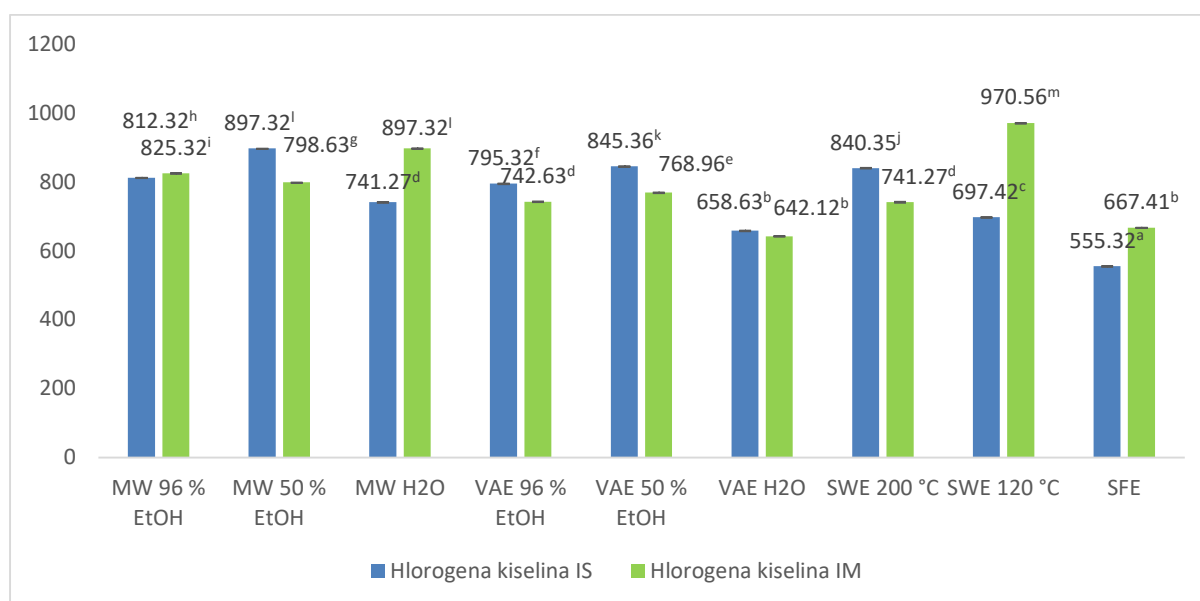
domaćinom na kome raste gljiva, kao i mikro klimom, što sve utiče na metabolizam gljive. Mingaila i sar., (2020) su dokazali da koncentracija Ca i Mg u zemljištu pozitivno utiče na sadržaj monosaharida kao i na ukupan sadržaj rastvorljivih čvrstih jedinjenja u proučavanom soku breze. Oni su pokazali da je najsladi i najhranljiviji sok bio tamo gde je zemljište bilo bogato Ca i Mg a i koje je bilo privremeno poplavljeno. Ranije su Kuka i sar., (2013) pokazali da se sok breze uglavnom sastoji od fruktoze (5,39 g/100 g), glukoze (4,46 g/100 g) i saharoze (0,58 g/100 g). Iako brezin sok nije analiziran u ovom istraživanju, stabla breze iz Srbije i Mongolije kao domaćini bi se verovatno razlikovala po svom hemijskom sastavu zbog izrazito različitih uslova životne sredine. Brezin sok ima uticaja i na sastav šećera Čage, pa je tako ranije dokazano da kod Čage koja potiče iz Francuske, Kanade i Ukrajine postoje razlike u ukupnom sadržaju šećera (Géry i sar., 2018).

5.2.6. Profil fenolnih jedinjenja u ekstraktima gljive *I. obliquus*

Analize fenolnog sastava ekstrakata Čage dobijenih različitim tehnikama zelenih ekstrakcija rezultirale su identifikacijom i kvantifikacijom 23 različita jedinjenja koja su predstavljena u Prilogu 3 i 4. Hlorogena kiselina bila je najzastupljenija, detektovana u znatno višim koncentracijama od bilo kog drugog fenolnog jedinjenja (Slika 10). Količina ove kiseline bila je u koncentracionom rangu 741,27 – 970,56 mg/kg ekstrakta. Njen sadržaj je u velikoj meri zavisio od tehnika ekstrakcije, rastvarača, temperature i porekla materijala. Najviša koncentracija hlorogene kiseline detektovana je u IM uzorcima koji su podvrgnuti SWE na 120 °C, dok u IS uzorcima to nije bio slučaj (697,42 ± 0,93 mg/kg). Ekstrakti dobijeni SFE ekstrakcijom (505,32 ± 0,18; 667,41 ± 0,29), kao i ekstrakti VAE H₂O (658.63 ± 0,22; 642.12 ± 1,28) imali su najnižu količinu ovog fenolnog jedinjenja za obe Čage. Ekstrakcija pomoću mikrotalasa, kao i ekstrakcija ultrazvukom sa 50% EtOH dale su značajne količine hlorogene kiseline, a Čaga iz Srbije bila je bogatija ovim jedinjenjem. Rezultati ove dve korišćene tehnike su bili uporedivi i nije utvrđena značajna razlika. Iako su obe Čage imale isti kvalitativni profil, koncentracije svakog pojedinačnog fenolnog jedinjenja varirale su u zavisnosti od porekla. Ekstrakti dobijeni subkritičnom vodenom ekstrakcijom pri temperaturi od 120 °C bili su bogatiji prokatehinskom, kafeinskom (IS), p-kumarinskom (IS) i cimetnom kiselinom, dok su pri temperaturi od 200 °C bila prisutna ista jedinjenja u znatno nižim koncentracijama. Flavonoid, katehin, bolje je ekstrahovan kada je primenjena ekstrakcija uz pomoć ultrazvuka, u kombinaciji sa etanolom (obe testirane koncentracije bile su skoro podjednako efikasne), dok su iste tehnike u kombinaciji sa vodom dale znatno manje katehina. Značajna razlika u sadržaju katehina primećena je u odnosu na poreklo Čage, ekstrakti mongolske imali su skoro duplo više katehina (IM MW sa 96% EtOH 5,99 ± 0,06 mg katehina po g suvog ekstrakta), dok su ekstrakti srpske kod istog tipa ekstrakcije imali 2,80 ± 0,02 mg/g. S druge strane, SWE nije bio najbolji izbor za katehin, pa su zabeležene količine u ovom slučaju bile znatno niže (1,51 ± 0,05 mg katehina po g suvog ekstrakta). Slično je utvrđeno i za drugi ispitivani flavonoid, kvercetin. Male količine su ekstrahovane kada je izvršena ekstrakcija subkritičnom vodom (kod obe Čage), dok je mikrotalasa ekstrakcija sa 96% EtOH dala značajno više koncentracije u poređenju sa ultrazvučnom. Dakle, redosled efikasnosti je bio MW 50% EtOH > MW 96% EtOH > VAE 50% EtOH > VAE 96% EtOH. Voda kao rastvarač u kombinaciji sa MW i VAE po efikasnosti bila je između VAE 50% EtOH i VAE 96% EtOH. Ekstrakti mongolske Čage sadržali su više kvercetina u odnosu na srpsku.

Kafeinska i cimetna kiselina u većim količinama detektovane su u IM MW i VAE ekstraktima, sa nešto višom koncentracijom kada je korišćen 50% EtOH. Sadržaj p-kumarinske kiseline bio je niži u mongolskoj nego u srpskoj Čagi, bez obzira na tip ekstrakcije. Niska koncentracija p-hidroksibenzojeve i hidroksifenil sirćetne kiseline

primećena je u svim ekstraktima (IS i IM). Vanilinska, siringinska, sinapinska i ferulna kiselina prisutne su u umerenim količinama, između 0,10 i 0,60 mg/kg, bez obzira na tehniku ekstrakcije i poreklo materijala. Galna kiselina je prisutna u ekstraktima IM i IS u koncentracionom rangu od 1-2,69 mg/kg. SWE ekstrakti imali su niži sadržaj galne kiseline, 0,34 – 0,46 mg/kg, dok su VAE ekstrakcije sa 50% EtOH najviše doprinele ekstrahovanju ove kiseline, bez obzira na poreklo materijala. Količine kvercetin 3-O-glukozida, kvercetin 3-O-ramnozida i kempferol 7-O-glukozida su bile značajno ($p < 0,05$) više kod SWE (120 i 200 °C, IM i IS) u poređenju sa drugim tretmanima (MW i VAE), gde su ova jedinjenja bila prisutna u tragovima. Flavonoidi poput floretina i naringenina otkriveni su u minimalnim količinama, dok su rutin i eridiktiol pokazali sličan trend, iako su koncentracije bile još niže.



Slika 10. Sadržaj hlorogene kiseline u ekstraktima srpske i mongolske *I. obliquus* dobijenim različitim zelenim tehnikama ekstrakcije. Srednje vrednosti između različitih ekstrakta sa različitim malim slovima su značajno različite ($p < 0,05$).

Kao što je pokazano IS uzorci u poređenju sa IM, za sve vrste ekstrakcija, sadržali su veću količinu ukupnih fenola. Međutim, ukupan sadržaj nije nužno u korelaciji sa potencijalnim biološkim dejstvom ekstrakata, profil i količina pojedinačnih jedinjenja imaju važniju ulogu. Takođe, Folin-Ciocalteu reagens, koji se godinama koristi za određivanje ukupnih fenola, smatra se nespecifičnim jer nefenolna jedinjenja poput šećera, askrobinske kiseline, aminokiselina mogu ometati merenje ukupnih fenola (Medina, 2011). Brojni izveštaji o fenolnom profilu *I. obliquus* potvrdili su prisustvo sledećih kiselina: protokatehinske, hlorogene, kafeinske, p-hidroksibenzojeve, galne, vanilinske, sirininske i ferulne (Abu-Reidah i sar., 2021; Glamočlija i sar., 2015). Hlorogena kiselina se nalazi u prirodi u mnogim biljkama i gljivama. Ova fenolna kiselina pokazala je nekoliko bioloških aktivnosti, kao što su antioksidativna, antibakterijska, antitumorska, regulacija glukoze i metabolizma lipida, antiinflamatorna, štiti nervni sistem i krvne sudove (Pan i sar., 2022). Količina hlorogene kiseline ekstrahovana različitim tehnikama ekstrakcije bila je relativno slična zbog svoje visoke rastvorljivosti u etanolu i vodi (Oteef, 2022). Međutim, čista voda ili etanol su manje efikasni u ekstrakciji hlorogene kiseline generalno, što su i drugi autori potvrdili (Oteef,

2022). Hlorogena kiselina kao komponenta *I. obliquus* do sada u literaturi nije se posebno izdvajala. Na osnovu ovog istraživanja se pretpostavlja da je Čaga apsorbovala hlorogenu kiselinu iz svog domaćina, breze, koja je verovatno sintetisala u velikim količinama kao odgovor na oštre klimatske uslove i kao mehanizam odbrane od patogena. Hlorogena kiselina je strukturno veoma raznolika jer je estar kafeinske i kininske kiseline (Ncube i sar., 2014). Može se naći i u obliku monomera, dimera ili različitih glikozilovanih oblika u različitim konfiguracijama (Ncube i sar., 2014). Nije jasno kako različiti uslovi životne sredine utiču na nastanak ovih oblika. Rezultati ovog istraživanja ukazuju da je Čaga iz Srbije i Mongolije sadržala različite metaboličke oblike hlorogene kiseline. Primećeno je i da kada je korišćen 50% EtOH kod MW i VAE ekstrakcija posebno za IS Čagu sadržaj hlorogene kiseline je bio visok a to je verovatno zbog oblika hlorogene kiseline koji se lako rastvara u polarnim organskim rastvaračima kao što je etanol (Pan i sar., 2022). Sa druge strane, moguće je da IM Čaga sadrži više glikozidnih oblika hlorogene kiseline i na taj način se smanjuje njena rastvorljivost u etanolu, tako da je SWE lako ekstrahuje. I ranije je pokazano da subkritična vodena ekstrakcija kada se kao polazni material koristila *I. obliquus* na temperaturi od 209 °C dovela do značajnog povećanja prinosa fenolnih jedinjenja (477,58 mg GAL/g) u poređenju sa ekstrakcijom 75% etanolom na 40 °C (121 mg GAL/g) Xi et al. (2017). U istom istraživanju u SWE ekstraktima potvrđeno je prisustvo: galne, epigalokatehina, katehina, hlorogene kiseline, vanilinske, epikatehina i ferulne kiseline.

5.2.7. Profil masnih kiselina u ekstraktima gljive *I. obliquus*

Sadržaj glavnih masnih kiselina detektovanih u različitim tipovima ekstrakata *I. obliquus*, kao i procenti zasićenih masnih kiselina (SFA) i nezasićenih masnih kiselina (UFA) prikazani su u Tabeli 6. U svim uzorcima identifikovano je ukupno 36 masnih kiselina (podaci su dodatno prikazani u Prilogu 5 i 6.). UFA su potvrđene u znatno višim koncentracijama u odnosu na SFA, posebno kod ekstrakata koji su dobijeni mikrotalasnom i ultrazvučnom ekstrakcijom u kombinaciji sa EtOH. Kada je voda korišćena kao rastvarač, prinos UFA bio je znatno niži. Međutim, uzorci SWE na 200 °C sadrže količine UFA koje su bile uporedive sa ekstrakcionim tehnikama kada je kao rastvarač korišćen etanol. Koncentracija EtOH nije imala značajan uticaj na UFA. Takođe, nešto niže prinose dali su SFE ekstrakti, iako se ovaj tip ekstrakcije pokazao kao efikasan za ekstrahovanje termolabilnih jedinjenja. Masne kiseline koje su prisutne u najvišim koncentracijama u IM i IS uzorcima bile su palmitinska (C16:0), stearinska (C18:0) i oleinska kiselina (C18:1 cis). Najviši sadržaj utvrđen je za C18:1 cis, posebno kod ekstrakata koji su dobijeni MW ekstrakcijom, koncentracija etanola nije bila od značaja. Voda se nije pokazala kao adekvatan rastvarač pošto je procenat C16:0, C18:0, i C18:1 cis bio najniži u svim ispitivanim uzorcima (i MW i VAE ekstrakcijama). I IM i IS uzorci sadrže slične količine najzastupljenih masnih kiselina. Ostale masne kiseline bile su zastupljene manjim udelom od 1 mg/100g. Što se tiče SFA, palmitinska kiselina je bila najzastupljenija (21,35 mg/100 g) u SWE (200 °C) uzorcima mongolske Čage. Najbolje opcije za ekstrakciju stearinske kiseline bile su MW i VAE tehnike sa 96% ili 50% EtOH, bez obzira na poreklo materijala. Što se tiče UFA, oleinska kiselina je u većoj meri prisutna u ekstraktima mongolske Čage MW 96% EtOH i 50% EtOH (52,32 i 55,63 mg/100 g, redom), dok su dobijeni ekstrakti srpske Čage MW 96% EtOH i 50% EtOH sadržali 48,63 i 49,21 mg/100 g, redom.

Tabela 6. Profil masnih kiselina (mg/100 g) ekstrakata *I. obliquus* dobijenih različitim zelenim tehnikama ekstrakcije

Ekstrakti	C16:0	C18:0	C18:1 cis	SFA	UFA
MW 96% EtOH	18,32 ± 0,12 ^e	6,58 ± 0,20 ^{ef}	52,32 ± 0,58 ^h	29,4 ± 0,19 ^f	57,96 ± 0,58 ^g
MW 50 % EtOH	16,22 ± 0,15 ^d	6,96 ± 0,30 ^{efg}	55,63 ± 0,79 ⁱ	27,61 ± 0,30 ^e	61,04 ± 0,79 ^h
MW water	15,66 ± 0,10 ^{cd}	3,12 ± 0,10 ^b	12,36 ± 0,13 ^a	20,89 ± 0,10 ^c	15,24 ± 0,13 ^a
VAE 96% EtOH	19,32 ± 0,32 ^e	7,56 ± 0,26 ^{hi}	38,25 ± 0,99 ^{ef}	32,19 ± 0,32 ^h	43,46 ± 0,99 ^e
IS VAE 50 % EtOH	18,88 ± 0,41 ^e	7,99 ± 0,38 ⁱ	34,52 ± 1,50 ^d	32,14 ± 0,41 ^h	39,07 ± 1,49 ^d
VAE water	14,32 ± 0,23 ^b	4,11 ± 0,21 ^c	14,22 ± 0,32 ^a	21,07 ± 0,23 ^c	16,8 ± 0,32 ^a
SWE 200 °C	18,65 ± 0,28 ^e	5,63 ± 0,11 ^d	25,63 ± 0,43 ^c	30,97 ± 0,28 ^g	29,98 ± 0,43 ^c
SWE 120 °C	16,52 ± 0,19 ^d	4,25 ± 0,10 ^c	12,36 ± 0,12 ^a	25,61 ± 0,19 ^d	15,12 ± 0,12 ^a
SFE	12,45 ± 0,18 ^b	1,33 ± 0,18 ^a	17,63 ± 0,37 ^b	18,68 ± 0,22 ^b	20,72 ± 0,83 ^b
MW 96 % EtOH	14,63 ± 0,23 ^{bc}	6,42 ± 0,23 ^c	48,63 ± 1,41 ^g	25,88 ± 0,23 ^d	53,95 ± 1,41 ^f
MW 50 % EtOH	13,89 ± 0,29 ^b	6,56 ± 0,16 ^{ef}	49,21 ± 1,64 ^g	25,93 ± 0,29 ^d	54,59 ± 1,64 ^f
MW water	10,32 ± 0,15 ^a	3,88 ± 0,12 ^c	21,33 ± 0,52 ^b	16,48 ± 0,15 ^a	24,99 ± 0,52 ^b
IM VAE 96 % EtOH	15,63 ± 0,06 ^{cd}	7,01 ± 0,13 ^{fgh}	36,52 ± 1,68 ^{de}	27,69 ± 0,13 ^e	39,44 ± 1,68 ^d
VAE 50 % EtOH	16,01 ± 0,05 ^d	7,23 ± 0,16 ^{gh}	39,78 ± 1,30 ^f	28,2 ± 0,16 ^e	42,76 ± 1,30 ^e
VAE water	10,63 ± 0,14 ^a	4,11 ± 0,08 ^c	14,33 ± 0,16 ^a	17,64 ± 0,14 ^b	16,09 ± 0,16 ^a
SWE 200 °C	21,35 ± 0,08 ^f	2,53 ± 0,05 ^a	35,85 ± 0,88 ^{de}	30,77 ± 0,80 ^g	40,65 ± 0,88 ^{de}
SWE 120 °C	18,63 ± 0,87 ^e	2,11 ± 0,07 ^a	12,23 ± 0,38 ^a	25,58 ± 0,87 ^d	15,45 ± 0,38 ^a
SFE	14,32 ± 0,51 ^b	1,14 ± 0,03 ^a	15,63 ± 0,34 ^a	20,69 ± 0,51 ^c	18,67 ± 0,35 ^a

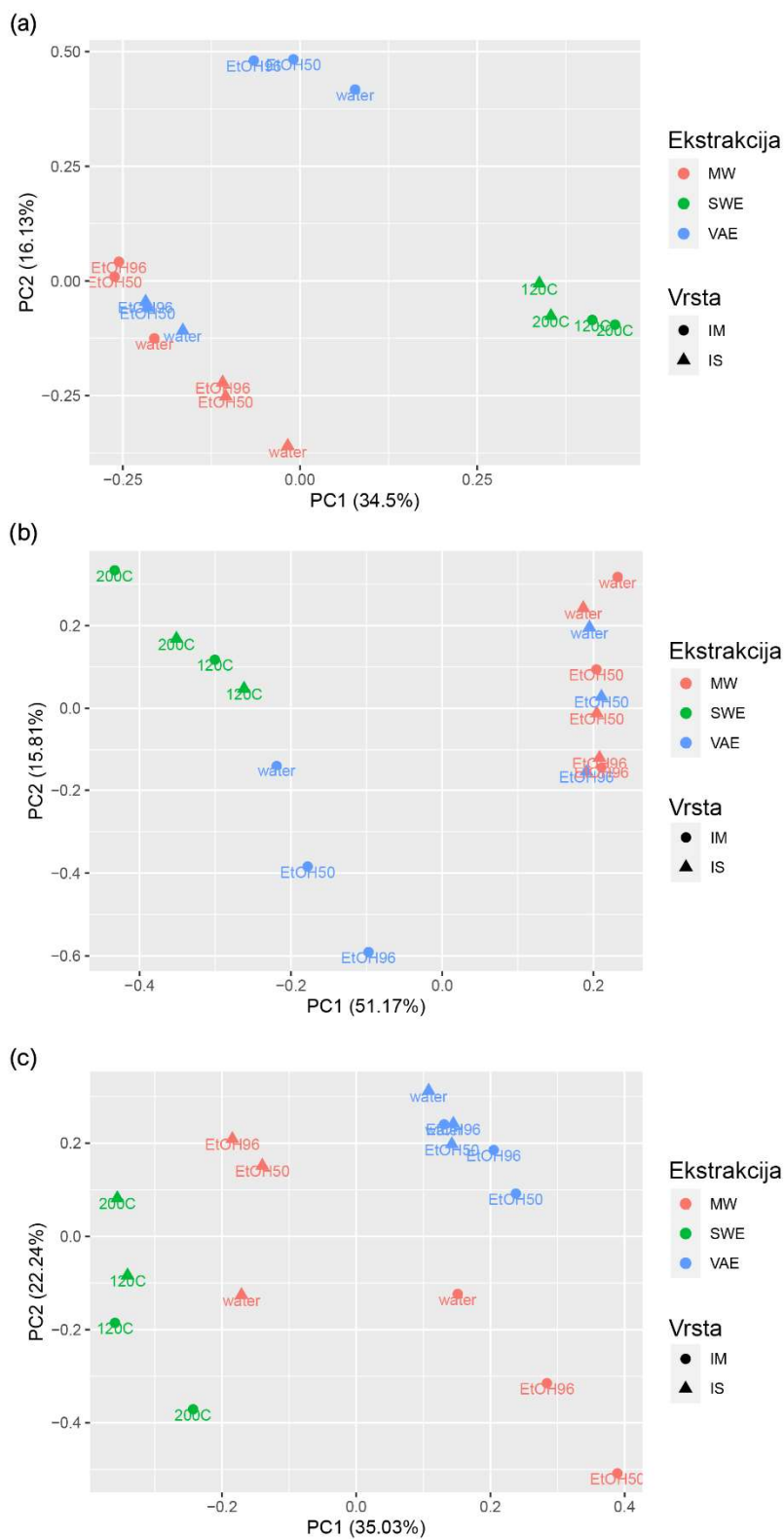
Rezultati su izraženi kao mg/100 g i srednja vrednost za tri ponavljanja ± standardna devijacija (n=3). Različita slova u kolonama označavaju statistički različite vrednosti (p < 0.05). Razlika od 100% odgovara i drugim manje zastupljenim masnim kiselinama (podaci su prikazani u Prilogu 5 i 6.). Palmitinska kiselina (C16:0); Stearinska kiselina (C18:0); Oleinska kiselina (C 18:1 cis); SFA - zasićene masne kiseline; UFA – nezasićene masne kiseline.

Dosadašnje studije o primeni SWE ekstrakcija na gljivama uglavnom su se fokusirale na ekstrakciju fenolnih jedinjenja i polisaharida (Roselló-Soto i sar., 2016). Međutim, prethodna istraživanja su pokazala da ovaj tip ekstrakcije daje odlične rezultate za izdvajanje eteričnih ulja iz biljaka što ukazuje na to da je ekstrakcija masnih kiselina na ovaj način vredna istraživanja (Zakaria i Kamal, 2016). U navedenom istraživanju SWE ekstrakti dobijeni na temperaturi od 200 °C sadržali su značajne količine nezasićenih masnih kiselina, posebno kod mongolske Čage. Peng i Shahidi, (2022) identifikovali su 37 nemodifikovanih zasićenih/nezasićenih masnih kiselina u uzorcima Čage. Potvrdili su prisustvo laurinske, misistinske, palmitoleinske, linoleinske, linolne, stearinske, palmitinske i oleinske kiseline, slično kao u ovom istraživanju. S druge strane, Shcherbakov i sar., (2022) pokazali su kvalitativni i kvantitativni sastav (mg/100g) masnih kiselina, takođe u Čagi: laurinska (0,2), miristinska (0,2), palmitinska (29,1), stearinska (15,1), oleinska (31,5), arahidonska (4,6). Slično kao i u ovom istraživanju, najzastupljenije su bile palmitinska, stearinska i oleinska kiselina. SWE ekstrakcija se trenutno primenjuje u industriji za izdvajanje ulja iz spora *G. lucidum*. Ovo ulje je bogato nezasićenim masnim kiselinama, pa se preporučuje pacijentima sa kardiovaskularnim problemima i bolestima jetre. Rezultati ovog istraživanja ukazuju da se ista tehnologija može primeniti i u slučaju Čage sa mogućnošću kreiranja novog dijetetskog proizvoda.

5.2.8. Analiza glavnih komponenti – PCA (eng. *Principal Component Analysis*)

Analiza glavnih komponenti urađena je na osnovu prinosa i ukupno 51 analiziranog jedinjenja iz različitih tipova ekstrakata Čage. Pokazano je da je prva glavna komponenta objasnila 34,50% varijacije podataka, dok je druga glavna komponenta doprinela ukupnom objašnjenju varijacija od 50,63 % podataka. Ovi podaci su uključivali prinos, ukupne fenole, ukupne polisaharide, ukupne glukane, α - i β - glukane (Tabela 5.); 23 šećera (Prilog 1 i 2.); 22 fenolna jedinjenja (Prilog 3 i 4.), i tri masne kiseline (Tabela 6.). Grafikon analize glavnih komponentata (Slika 11a) pokazuje razdvajanje na tri grupe. SWE uzorci IS i IM Čage, bez obzira na temperature, grupisani su i odvojeni od ostalih uzoraka. Drugu grupu činili su IM ekstrakti dobijeni MW ekstrakcijom. Treću grupu činili su ostali analizirani uzorci (IS MW) i VAE (IS i IM). Ukupni rezultati analize sastava ekstrakata Čage pokazali su da je tip ekstrakcije najviše uticao na razdvajanje grupa, dok su izbor rastvarača i temperatura bili manje značajni.

PCA, na osnovu podataka za ukupne šećere, ukupne glukane, α - i β - glukane i 23 šećera u ekstraktima dobijenim pomoću tri različita tipa ekstrakcija, rezultirala je dvokomponentnim modelom koji je objasnio 66,98% ukupne varijanse među podacima prikazanim na grafikonu (Slika 11b). Uzorci su odvojeni u tri klastera na grafiku rezultata. IS i IM SWE uzorci su u jednom klasteru, IM VAE su posebna grupa i treća grupa su IS VAE, IS i IM MW. PCA na bazi ukupnih fenola i 22 fenolna jedinjenja iz različitih ekstrakata Čage, rezultirala je dvokomponentnim modelom koji je objasnio 52,27% ukupne varijanse (Slika 11c). Na grafikonu se uočavaju četiri klastera. Uzorci VAE (IS i IM Čage) su odvojeni od ostalih uzoraka u jedan klaster. Takođe, SWE uzorci su grupisani posebno. MW uzorci su podeljeni u dve grupe nastale kao posledica porekla materijala. IS ekstrakti su činili jednu grupu, dok su IM bili u drugoj na osnovu porekla Čage.



Slika 11. Analiza glavnih komponenti za (a) prinos i ukupno 51 ispitano jedinjenje (b) ukupne šećere, glukane i kvalitativni sastav šećera i (c) ukupne fenole i fenolna jedinjenja; IM (tačka) i IS (trougao); Različiti tipovi ekstrakcija su predstavljeni različitim bojama, dok nazivi ispod tačke/trougla ukazuju na rastvarač/ temperaturu.

Iz rezultata koji su do sada analizirani može se videti da su zelene ekstrakcije veoma efikasne kada su u pitanju bioaktivna jedinjenja i njihov sastav, i da mogu ponuditi najbolju efikasnost kao i kvalitet ekstrakta, kako za nauku tako i za industriju. Subkrična vodena ekstrakcija, u opsegu temperatura od 120 do 200 °C, pokazala je najbolji efekat. Ovaj tip ekstrakcije omogućio je najviši prinos svih važnih grupa jedinjenja, posebno glukana i fenola. Buduća istraživanja bi trebala da budu usmerena na poboljšanje ekstahovanja bioaktivnih jedinjenja uz zadržavanje njihove efikasnosti. Pored tipa ekstrakcije, temperatura, rastvarač i poreklo su imali važan uticaj na prinos, posebno što Čaga živi na domaćinu brezi i apsorbuje i njene metabolite. Lipofilni profil *I. obliquus* još uvek nije dovoljno proučen. Kao što je u ovom istraživanju predstavljeno, SWE je dobra opcija za ekstrakciju ove grupe jedinjenja koja mogu dati brojne zdravstvene benefite, poput prevencije i lečenja hroničnih bolesti, kao što su rak, dijabetes i kardiovaskularne bolesti.

5.3. Biološka karakterizacija ekstrakata

5.3.1. Antioksidativna aktivnost

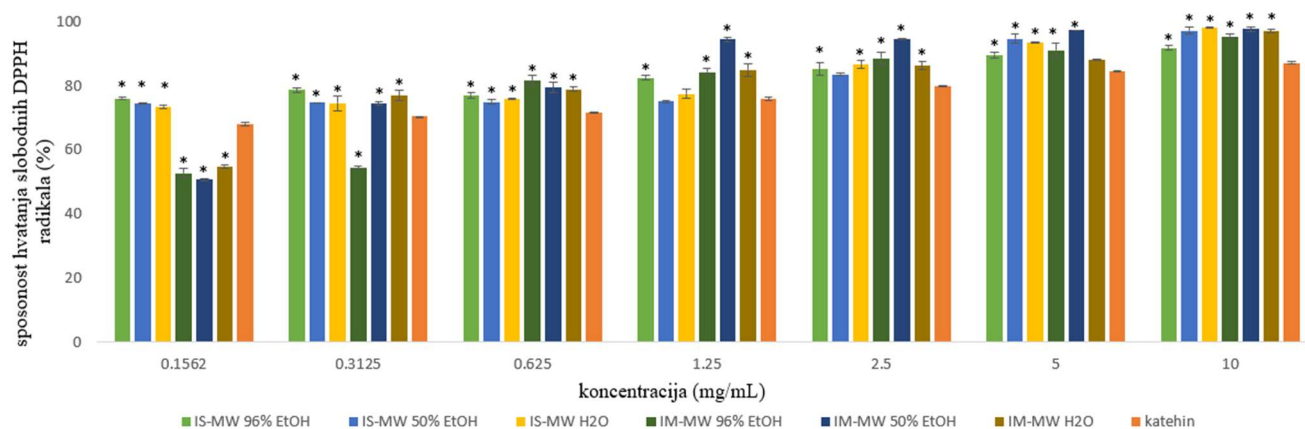
Poslednjih decenija vrlo su intezivna istaživanja koja ukazuju na direktan uticaj reaktivnih oblika kiseonika (ROS) na pojavu i razvoj mnogih poremećaja u oragnizmu (Jayakumar i sar., 2009). Veliki broj egzogenih faktora ali i normalni metabolički procesi u telu mogu dovesti do stvaranja visoko reaktivnih radikala kiseonika koji dovode do ćelijske smrti, oštećenja tkiva i izazivaju maligna oboljenja, cirozu jetre, srčana oboljenja (Ćilerdžić i sar., 2014). Organizmi poseduju sopstveni antioksidativni sistem odbrane, koji pri višim koncentracijama slobodnih radikala postaje neefikasan i potrebna je pomoć antioksidanasa iz prirodnih izvora. Gljive su bogate nutritivnim i medicinskim resursima sa različitim farmakološkim funkcijama i interesantne su za proučavanje kao vredan funkcionalni sastojak hrane (Matsugo i sar., 2022). Čaga je poznata po svom snažnom antioksidativnom dejstvu, prvenstveno jer je bogata polifenolnim jedinjenjima, koji su ključni molekuli sposobni da uklone slobodne radikale (Balandaykin i Zmitrovich, 2015). Polifenoli su sekundarni metaboliti koji imaju aktivne grupe kao što su fenol hidroksilna, alkohol hidroksilna i karboksilna u svojim strukturama i zahvaljujući njima pokazuju antioksidativno dejstvo (Yu Xiang i sar., 2021). Razvijeni su brojni testovi za merenje antioksidativne aktivnosti, a kako svaki ima ograničenja, i uzima u obzir različite slobodne radikale, rezultati nisu uvek uporedivi. U ovom istaživanju urađene su 4 različite metode, kako bismo bolje razumeli antioksidativni potencijal različitih ekstrakata gljive *I. obliquus*. Prethodno urađena hemijska karakterizacija ekstrakata pomaže pri boljem razumevanju i utvrđivanju jedinjenja odgovornih za antioksidativnu aktivnost Čage.

5.3.1.1. Sposobnost neutralizacije slobodnih DPPH• ekstrakata gljive *I. obliquus*

DPPH• je stabilan slobodni radikal tamno ljubičaste boje koji ima neupareni elektron i intenzivan, karakterističan pik na 517 nm. Međutim, u prisustvu antioksidativnih jedinjenja, DPPH• se konvertuje u 1,1-difenil-2-pikril hidrazil (neradikalisku formu) dolazi do smanjenja absorbance i postaje žut (Velazquez i sar., 2003). Dakle, intenzivnija promena boje ukazuje na višu antioksidativnu aktivnost. Antioksidativna aktivnost gljiva potiče od njihove sposobnosti da doniraju proton i tako redukuju DPPH•.

Ekstrakti mongolske Čage dobijeni pomoću mikrotalasa pokazali su slabiju sposobnost neutralizacije DPPH• (96% EtOH 52,67 ± 1,39%; 50% EtOH 50,67 ± 0,46%; H₂O 54,85 ± 0,53%) u odnosu na uzorke iz Srbije (96% EtOH 73,03 ± 0,46%; 50% EtOH 74,57 ± 0,20%;

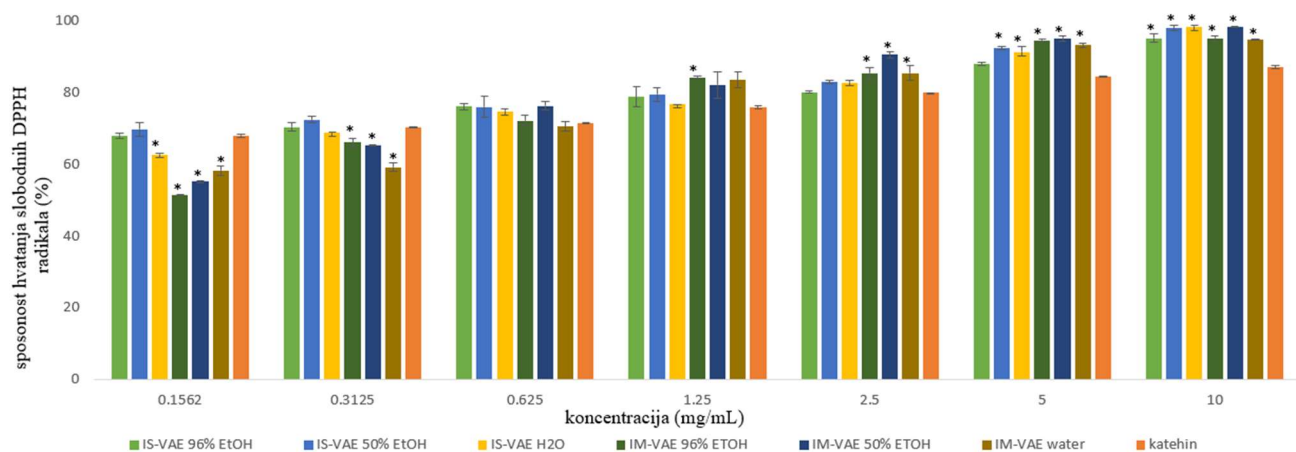
H₂O 73,38 ± 0,46%), pri najnižoj ispitivanoj koncentraciji od 0,1562 mg/mL. Međutim, kako se povećavala koncentracija ekstrakata rasla je i njihova sposobnost neutralizacije DPPH•. Utvrđeno je da testirani ekstrakti pri koncentraciji od 0,625 mg/mL imaju sličnu efikasnost, bez obzira na poreklo materijala. Uzorci IS i IM ekstrahovani vodom dostigli su izuzetno visoke vrednosti od 98,14 ± 0,27% i 97,01 ± 0,53%, pri maksimalnoj testiranoj koncentraciji (10 mg/mL). Na Slici 12 prikazano je da su svi testirani ekstrakti pri višim koncentracijama (0,1562- 10 mg/mL) bili efikasniji antioksidansi u odnosu na pozitivnu kontrolu katehin.



Slika 12. Sposobnost neutralizacije slobodnih DPPH• ekstrakata IS i IM gljive *I. obliquus* dobijenih mikrotalasnom ekstrakcijom

Rezultati su izraženi kao srednja vrednost za tri ponavljanja ± standardna devijacija. Statistička značajnost u odnosu na pozitivnu kontrolu analizirana je pomoću one-way ANOVA, primenom Tukey-ovog testa (*p < 0,05).

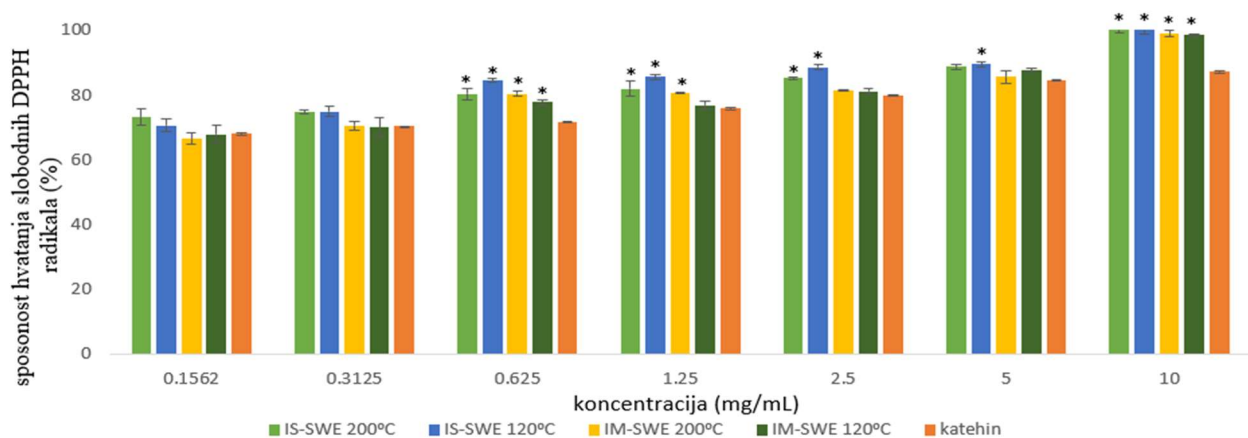
Slično kao kod ekstrakata dobijenih mikrotalasima, primećeno je da pri najnižoj testiranoj koncentraciji od 0,1562 mg/mL uzorci dobijeni pomoću ultrazvuka, poreklom iz Mongolije, pokazuju nešto slabiju aktivnost, dok se njihov potencijal za neutralisanje slobodnih DPPH• izjednačio sa uzorcima iz Srbije pri koncentraciji od 0,625 mg/mL. Sa porastom koncentracije ekstrakata rasla je i sposobnost hvatanja slobodnih radikala, tako da su pri koncentraciji od 5 mg/mL testirani ekstrakti dostigli visok nivo - preko 90% (Slika 13). Najjače antioksidativno dejstvo pokazali su sledeći uzorci: IS MW H₂O (98,34 ± 0,33%), IS MW 50% EtOH (98,01 ± 0,66%) i IM MW 50% EtOH (98,27 ± 0,13%), pri maksimalnoj testiranoj koncentraciji. Svi testirani ekstrakti su pri višim koncentracijama bili efikasniji od katehina.



Slika 13. Sposobnost neutralizacije slobodnih DPPH• ekstrakata IS i IM gljive *I. obliquus* dobijenih ultrazvučnom ekstrakcijom

Rezultati su izraženi kao srednja vrednost za tri ponavljanja \pm standardna devijacija. Statistička značajnost u odnosu na pozitivnu kontrolu analizirana je pomoću one-way ANOVA, primenom Tukey-ovog testa (* $p < 0,05$).

Pri koncentraciji od 0,1562 mg/mL, sposobnost neutralizacije slobodnih radikala SWE ekstrakata iz gljive *I. obliquus* dostigla je izuzetno visoke vrednosti: IS 200 °C ($73,05 \pm 0,73\%$), IS 120 °C ($70,59 \pm 1,06\%$), IM 200 °C ($66,47 \pm 0,99\%$) i IM 120 °C ($67,87 \pm 0,39\%$), i rasla je sa porastom koncentracije. Kao što se može videti na Slici 14 uzorci Čage poreklom iz Srbije kod svih testiranih koncentracija ispoljili su nešto jače antioksidativno dejstvo u poređenju sa uzorcima iz Mongolije. Pri maksimalnoj testiranoj koncentraciji od 10 mg/mL, IS 200 °C ($99,96 \pm 0,73\%$) i IS 120 °C ($99,99 \pm 1,06\%$) ekstrakti hvatali su gotovo sve prisutne slobodne DPPH•, dok su IM SWE uzorci imali sposobnost neutralizacije slobodnih radikala od $98,85 \pm 0,99\%$ (200 °C) i $98,45 \pm 0,39\%$ (120 °C), za istu testiranu koncentraciju. SWE ekstrakti pokazali su bolju efikasnost pri svim višim koncentracijama u odnosu na pozitivnu kontrolu, katehin.



Slika 14. Sposobnost neutralizacije slobodnih DPPH• ekstrakata IS i IM gljive *I. obliquus* dobijenih subkričnom vodenom ekstrakcijom

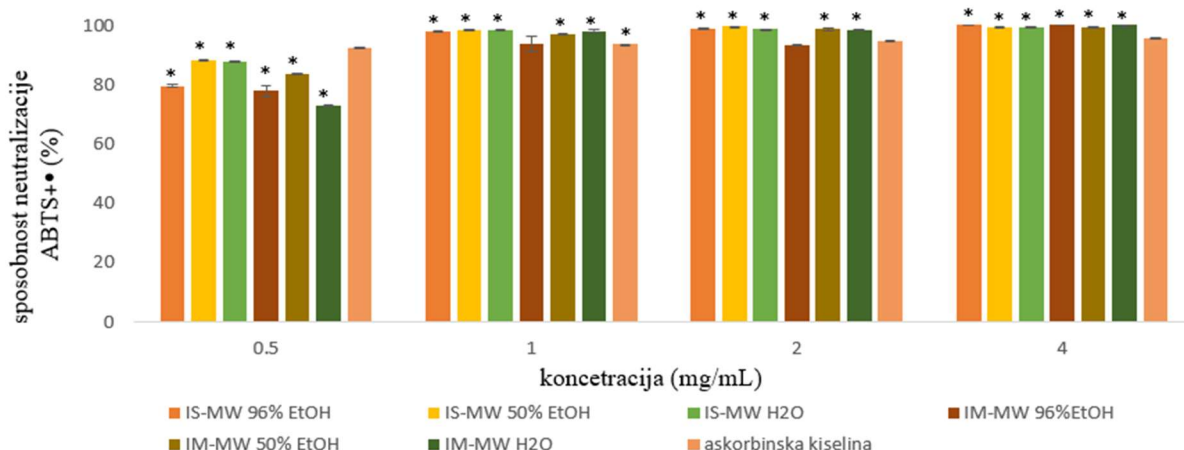
Rezultati su izraženi kao srednja vrednost za tri ponavljanja \pm standardna devijacija. Statistička značajnost u odnosu na pozitivnu kontrolu analizirana je pomoću one-way ANOVA, primenom Tukey-ovog testa (* $p < 0,05$).

U prethodnom istraživanju utvrđeno je da je SWE ekstrakt dobijen na temperaturi od 209°C pokazao značajnu sposobnost neutralizacije slobodnih DPPH• (20,21 – 90,66%) u odnosu na vreli vodeni ekstrakt, pri čemu je testirana aktivnost bila 13,57 – 75,78%, pri koncentracionom opsegu od 0,3125 – 5 mg/mL (Hu i sar., 2017). Autori su pokazali da uzorci dobijeni superkritičnom vodenom ekstrakcijom značajno poboljšavaju hvatanje slobodnih DPPH• kao i da su testirani ekstrakti efikasniji pri višim koncentracijama. Ovo istraživanje je pokazalo da je pri najvišim testiranim koncentracijama efikasnost hvatanja slobodnih DPPH• bila slična, dok je u slučaju najniže testirane koncentracije (0,1562 mg/ml) efikasnost naših SWE ekstrakata bila skoro tri puta jača. Hu i sar. (2017) su pretpostavili da polisaharidi iz Čage mogu da budu dobri kandidati kao antioksidansi, međutim, usled komplikovanog komercijalnog uzgajanja ove gljive onemogućeno je dobijanje velike količine ovih polisaharida. Od ranije je poznato da biološke aktivnosti polisaharida zavise od njihove molekulske strukture uključujući sastav monosaharida, glikozidne veze, stepen grananja, šećerne komponente i konformaciju glavnog lanca (Ma i sar., 2012). Takođe, u prethodnim istraživanjima je pokazano da prostorne strukture mogu ometati antioksidativnu aktivnost tako da polisaharidi velike molekulske težine mogu da budu manje efikasni (Chen i sar., 2009). Yan i sar., (2021) su potvrdili da polisaharidi manje molekulske mase imaju jači kapacitet uklanjanja slobodnih DPPH•. Rezultati dobijeni za sposobnost hvatanja slobodnih DPPH• u ovom istraživanju ukazuju da su verovatno polisaharidi imali značajan uticaj. Kod SWE ekstrakata dobijenih na temperaturi od 200 °C su zabeleženi najveći prinosi ukupnih polisaharida, kao i ukupnih glukana. Međutim, i uzorci dobijeni pomoću mikrotalasa i ultrazvuka, gde je voda korišćena kao rastvarač, pokazali su se kao pogodan materijal za ekstrakovanje ukupnih i pojedinačnih šećera, kao i da su veoma aktivni u hvatanju slobodnih radikala. Seo i Lee (2010) ranije su pokazali da je maksimum hvatanja slobodnih radikala (72,5%) pri koncentraciji od 2 mg/mL dobijen kada je SWE ekstrakcija obavljena na 250 °C u trajanju od 60 min. Oni su pretpostavili da β -glukani kod SWE ekstrakata imaju važnu antioksidativnu ulogu. Sa druge strane, Wang i sar. (2021) su u svom istraživanju predložili optimalne uslove za ekstrakciju polifenola iz *I. obliquus* koji su korišćeni kao indikatori za procenu antioksidativne aktivnosti. Kada su polifenoli ekstrahovani sa 50% EtOH, na temperaturi od 60 °C u trajanju od 90 min, sposobnost hvatanja slobodnih DPPH• dostigla je 85,64%, pri koncentraciji od 5 mg/mL. Takođe, Hu i sar. (2017) su primetili da se aktivnost uklanjanja slobodnih DPPH• povećavala sa porastom sadržaja fenola i flavonoida.

5.3.1.2. Sposobnost neutralizacije ABTS+• ekstrakata gljive *I. obliquus*

Za ispitivanje antioksidativne sposobnosti ekstrakata gljive *I. obliquus*, korišćena je i ABTS+• metoda. Pored DPPH• metode, na ovaj način je takođe moguće proceniti sposobnost ekstrakata da neutrališu produkciju slobodnih radikala. ABTS+• test se široko koristi za određivanje antioksidativne aktivnosti lipofilnih i hidrofилnih jedinjenja. Metoda se zasniva na sposobnosti antioksidanasa da neutrališu stabilni ABTS+• (2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonske kiseline)) radikal. Katjonski, plavo - zeleni ABTS+• radikal nastaje reakcijom između $K_2S_2O_8$ i ABTS i pokazuje maksimum apsorpcije na 734 nm. U prisustvu antioksidanasa dolazi do gubitka boje koja je proporcionalna količini prisutnih antioksidanasa; veći gubitak boje ukazuje na veću antioksidativnu sposobnost.

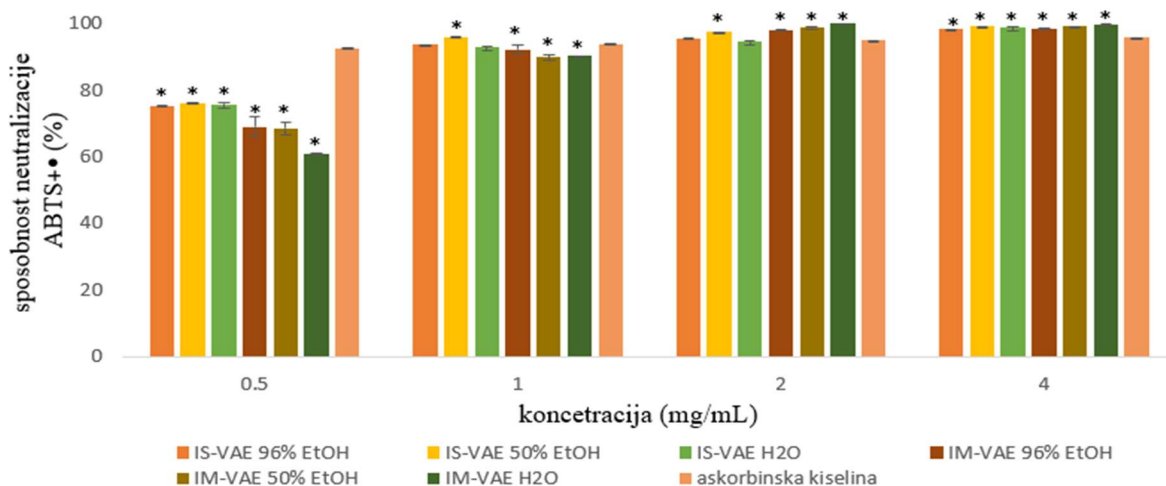
Ekstrakti dobijeni pomoću mikrotalasa pokazali su izuzetnu sposobnost neutralizacije tako da su već pri koncentraciji od 0,5 mg/mL vrednosti za srpsku Čagu bile: 96% EtOH 79,66 ± 0,29%; 50% EtOH 88,65 ± 0,1%; H₂O 87,67 ± 0,25%, dok su za mongolsku: 96% EtOH 77,90 ± 1,68%, 50% EtOH 83,67 ± 0,14%, H₂O 73,14 ± 0,19%. Može se videti da su svi ekstrakti pri koncentraciji od 1 mg/mL neutralisali skoro sve radikale, te da su pri maksimalnoj testiranoj koncentraciji od 4 mg/mL neutralisali sve ABTS+• (Slika 15). MW ekstrakti pokazali su bolju efikasnost i od askrobinske kiseline pri koncentracijama od 1 – 4 mg/mL.



Slika 15. Sposobnost neutralizacije ABTS+• ekstrakata IS i IM gljive *I. obliquus* dobijenih mikrotalasnou ekstrakcijom

Rezultati su izraženi kao srednja vrednost za tri ponavljanja ± standardna devijacija. Statistička značajnost u odnosu na pozitivnu kontrolu analizirana je pomoću one-way ANOVA, primenom Tukey-ovog testa (*p < 0,05).

Za razliku od MW ekstrakata, ekstrakti dobijeni pomoću ultrazvuka pokazali su nešto niže procenete neutralizacije na najnižoj testiranoj koncentraciji, ali se i njihova efikasnost povećala sa porastom koncentracije (Slika 16). Utvrđeno je da se izuzetno jaka neutralizacija slobodnih radikala *in vitro* (preko 90%), postiže pri koncentraciji od 1 mg/mL. Pri koncentraciji od 2 mg/mL skoro da se dostiže maksimalna aktivnost. Slično kao i kod MW, VAE uzorci bili su nešto efikasniji od askrobinske kiseline pri koncentracijama od 1 - 4 mg/mL.



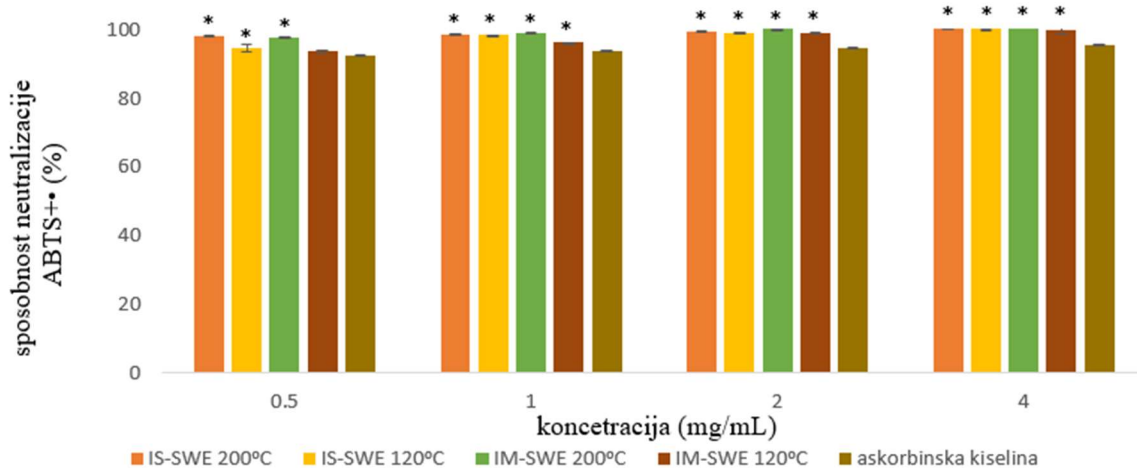
Slika 16. Sposobnost neutralizacije ABTS+• ekstrakata IS i IM gljive *I. obliquus* dobijenih ultrazvučnom ekstrakcijom

Rezultati su izraženi kao srednja vrednost za tri ponavljanja \pm standardna devijacija. Statistička značajnost u odnosu na pozitivnu kontrolu analizirana je pomoću one-way ANOVA, primenom Tukey-ovog testa (* $p < 0,05$).

SWE ekstrakti imali su izrazitu sposobnost neutralizacije ABTS+•: IS 200 °C ($98,29 \pm 0,08\%$), IS 120 °C ($94,53 \pm 1,08\%$), IM 200 °C ($97,79 \pm 0,16\%$) i IM 120 °C ($93,62 \pm 0,59\%$), pri koncentraciji od 0,5 mg/mL. Ovi ekstrakti dostigli su maksimalnu aktivnost već pri koncentraciji od 1 mg/mL i pokazali su bolju efikasnost u odnosu na pozitivnu kontrolu askrobinsku kiselinu, što se može videti na Slici 17.

Generalno DPPH• i ABTS+• su najčešći sintetički slobodni radikali, koji se koriste za procenu aktivnosti uklanjanja slobodnih radikalskih vrsta potencijalnim antioksidativnim jedinjenjima u *in vitro* uslovima.

Nešto jača aktivnost dobijena ABTS+• testom u odnosu na sposobnost hvatanja DPPH• može se objasniti različitom reaktivnošću ispitivanih uzoraka sa selektovanim radikalskim vrstama (Platzer i sar., 2021). Na primer, ABTS+• test može ispoljiti specifičnost prema određenoj strukturi ispitivanih jedinjenja, dok DPPH• test specifično prepoznaje funkcionalne grupe kao što je npr. $-\text{OH}$ i $-\text{NH}_3^+$ (Platzer i sar., 2021).



Slika 17. Spособnost neutralizacije ABTS+• ekstrakata IS i IM gljive *I. obliquus* dobijenih subkritičnom vodenom ekstrakcijom

Rezultati su izraženi kao srednja vrednost za tri ponavljanja \pm standardna devijacija. Statistička značajnost u odnosu na pozitivnu kontrolu analizirana je pomoću one-way ANOVA, primenom Tukey-ovog testa (* $p < 0,05$).

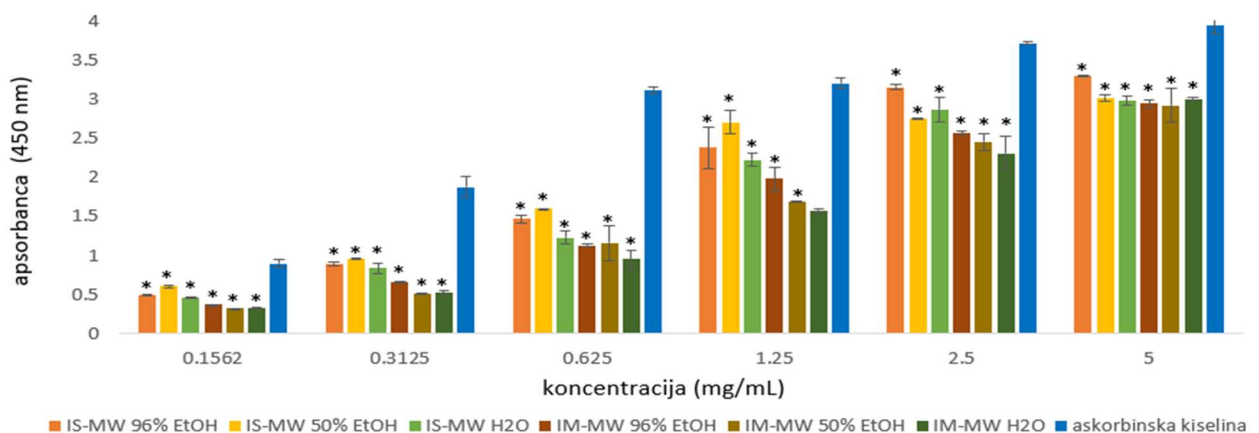
Seo i Lee (2010) su pokazali da se kod SWE ekstrakata sposobnost neutralizacije ABTS+• povećavala sa porastom temperature i vremena ekstrakcije. Najviši procenat neutralizacije od 97,8%, pri koncentraciji od 2 mg/mL, utvrđen je kod ekstrakta dobijenog na 250 °C tokom 60 min što je bilo 6 puta više nego kod ekstrakta dobijenog na 50 °C tokom 60 min (14,4%). Ovi rezultati pokazuju da je SWE tehnika efikasna za ekstrahovanje jedinjenja koja imaju jak antioksidativni potencijal. U ovom istraživanju, ekstrakti dobijeni pomoću ove tehnike ispoljili su izuzetno visok antioksidativni potencijal, a takođe je ekstrahovana značajna količina fenola, kao što je navedeno u pasusu 5.2.6. Hu i sar. (2017) su poredili antioksidativnu aktivnost etanolnih ekstrakata dobijenih na 40 °C tokom 4 h pomoću 75% EtOH, sa SWE ekstraktima dobijenim na 209 °C tokom 5 min. Pomoću SWE ekstrahovano je 4 puta više ukupnih fenolnih jedinjenja, ali ono što je bilo još važnije aktivnost uklanjanja ABTS+• je poboljšana. Neutralizacija ABTS+• etanolnim ekstraktom bila je $62,83 \pm 0,76$ mM ekvivalenta askorbinske kiseline po gramu, dok je kod SWE ekstrakta bila $178,34 \pm 1,23$ mM askorbinske kiseline po gramu. Ovo istraživanje ukazuje da se SWE ekstrakcija može koristiti za ekstrahovanje antioksidativnih jedinjenja. Od pojedinačnih fenolnih jedinjenja kod SWE ekstrakta izdvojile su se: galna, hlorogena, vanilinska, ferulna kiselina, kao katehin i epikatehin (Hu i sar., 2017). U ovom radu, hlorogena kiselina je detektovana u veoma visokim koncentracijama kod svih ekstrakata, a posebno kod SWE, pa se pretpostavlja da ovo značajno doprinosi izraženom antioksidativnom potencijalu različitih ekstrakata gljive *I. obliquus*.

5.3.1.3. Spособnost redukcije jona bakra ekstrakata gljive *I. obliquus*

CUPRAC metoda je praktičan test za merenje nivoa antioksidativne aktivnosti, koristan za širok spektar ispitivanja fenolnih kiselina, flavonoida, karotenoida, kao i sintetičkih antioksidanasa. Metoda se zasniva na transferu elektrona, pri fiziološkoj pH vrednosti; Cu^{2+} se redukuje do Cu^{1+} koji sa neokuproinom gradi stabilan kompleks i apsorpcija se meri pri maksimalnoj talasnoj dužini od 450 nm (Özyürek i sar., 2011). Narandžasto-žuta boja nastaje zbog formiranog Cu^{1+} - neokuproin helata.

Zbog brojnih nedostataka postojećih antioksidativnih metoda razvijena je CUPRAC metoda, jer je mnogo stabilnija od homogenih radikalskih reagenasa (poput ABTS+• i DPPH•) (Özyürek i sar., 2011). Sposobnost redukcije izmerene za neki biološki uzorak može indirektno ali efikasno odrediti ukupnu antioksidativnu moć, iako nijedna radikalska vrsta nije uključena u test. Metoda se prvobitno primenjivala na hranu (kajsija, biljni čajevi, divlje jestive biljke i gljive itd.), a kasnije sa novim eksperimentalnim dizajnom i za analiziranje ljudskih tečnosti jer podjednako dobro reaguje i na hidrofilne i na lipofilne antioksidanse (Özyürek i sar., 2011). Ova metoda ima veliki potencijal za razvoj univerzalnog antioksidativnog senzora u prehrambenoj industriji, ali i za biohemijska i medicinska istraživanja oksidativnog stresa. Jedan od osnovnih razloga zašto je FRAP metoda (redukcija Fe³⁺) zamenjena CUPRAC metodom je u tome što je pH vrednost bliža fiziološkoj vrednosti, dok je kod redukcije jona gvožđa pH izuzetno niska (Özyürek i sar., 2011).

Redukciona svojstva ekstrakata dobijenih pomoću mikrotalasa iz gljive *I. obliquus* povećavala su se postepeno sa porastom koncentracije (Slika 18). Pri svim testiranim koncentracijama ekstrakti dobijeni iz Čage poreklom iz Srbije pokazali su veću redukcionu sposobnost od ekstrakata dobijenih iz mongolske Čage. Pri najvišoj testiranoj koncentraciji od 5 mg/mL redukciona sposobnost (izražena preko apsorbance na 450 nm) iznosila je za IS uzorke: 96% EtOH 3,3 ± 0,01; 50% EtOH 3,02 ± 0,04 i H₂O 2,98 ± 0,06, a za IM uzorke: 96% EtOH 2,95 ± 0,05; 50% EtOH 2,93 ± 0,21 i H₂O 3,01 ± 0,02. Redukciona sposobnost pozitivne kontrole, askorbinske kiseline, pri svim testiranim koncentracijama bila je izuzetno visoka u odnosu na testirane ekstrakte.

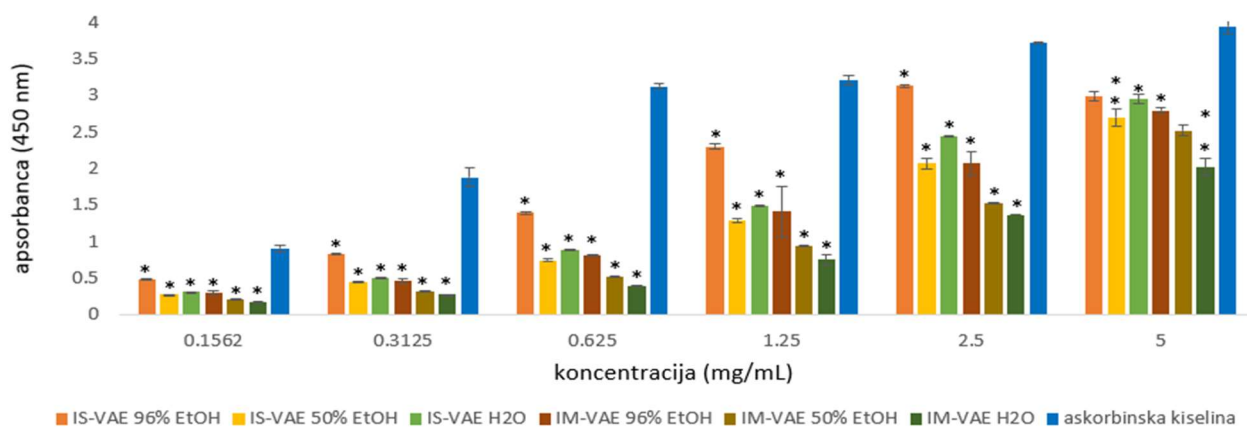


Slika 18. Sposobnost redukcije jona bakra (Cu²⁺) ekstrakata IS i IM gljive *I. obliquus* dobijenih mikrotalasnou ekstrakcijom

Rezultati su izraženi kao srednja vrednost za tri ponavljanja ± standardna devijacija. Statistička značajnost u odnosu na pozitivnu kontrolu analizirana je pomoću one-way ANOVA, primenom Tukey-ovog testa (*p < 0,05).

Slično kao i kod MW ekstrakata, sposobnost redukcije Cu²⁺ ekstrakata gljive *I. obliquus* dobijenih pomoću ultrazvuka je rasla sa porastom koncentracije. Takođe, može se primetiti da je ekstrakt IS 96% EtOH imao najizraženiju redukcionu sposobnost, dok su ekstrakti IM 50% EtOH i H₂O imali najslabiju redukcionu sposobnost pri svim testiranim koncentracijama (Slika 19). Ovakav rezultat ukazuje da se 96% etanolom ekstrahuju komponente koje imaju veću sposobnost doniranja elektrona. Redukciona sposobnost standarda, askorbinske kiseline

kretala se u rasponu od 3,94 – 0,90 pri koncentracijama 0,1562 - 5 mg/mL. Redukciona sposobnost pri najvišoj testiranoj koncentraciji bila je u opsegu 2,01 – 2,99.

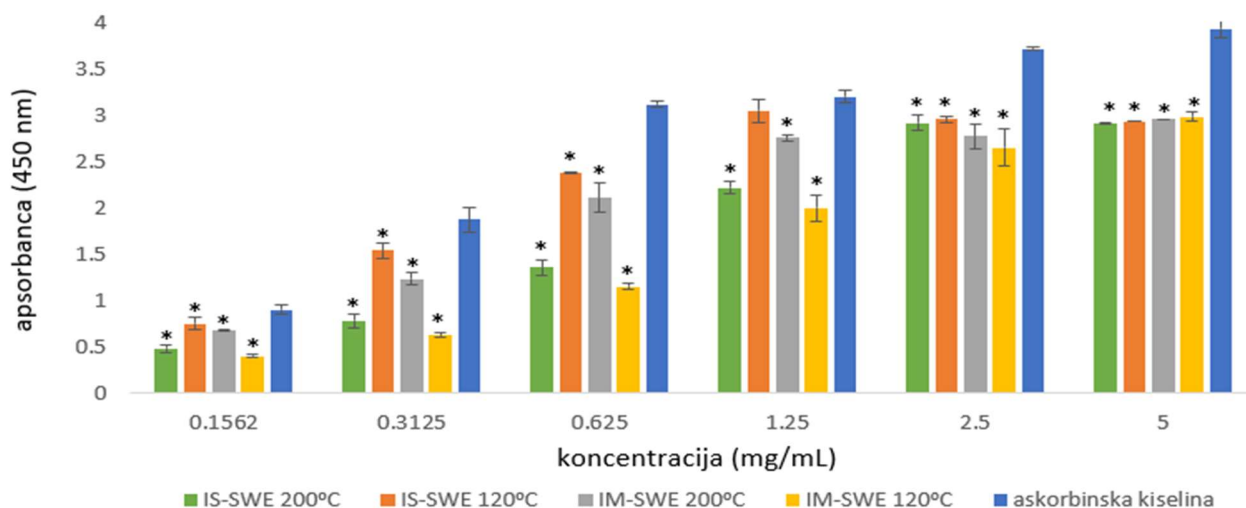


Slika 19. Sposobnost redukcije jona bakra (Cu^{2+}) ekstrakata IS i IM gljive *I. obliquus* dobijenih ultrazvučnom ekstrakcijom

Rezultati su izraženi kao srednja vrednost za tri ponavljanja \pm standardna devijacija. Statistička značajnost u odnosu na pozitivnu kontrolu analizirana je pomoću one-way ANOVA, primenom Tukey-ovog testa (* $p < 0,05$).

Redukciona sposobnost SWE ekstrakata pokazala je doznu zavisnost. SWE ekstrakti imaju veoma izraženu redukcionu sposobnost, posebno pri najvišoj testiranoj koncentraciji od 5 mg/ml pri kojoj je kod srpske Čage ova vrednost dostigla $2,92 \pm 0,01$ ($200\text{ }^\circ\text{C}$) i $2,93 \pm 0,00$, a kod mongolske $2,96 \pm 0,00$ ($200\text{ }^\circ\text{C}$) i $2,99 \pm 0,05$. Primećeno je da ekstrakti IS SWE $200\text{ }^\circ\text{C}$ i IM SWE $120\text{ }^\circ\text{C}$ pri nižim koncentracijama (0,1562 – 1,25 mg/mL) imaju nešto slabiju sposobnost redukcije jona bakra (Slika 20). Askorbinska kiselina je pri svim testiranim koncentracijama imala veoma visoku sposobnost redukcije Cu^{2+} .

Ova metoda primenjena je u svega par istraživanja za gljivu *I. obliquus*. Deveci i Çayan (2019) su pokazali da su dva ekstrahovana jedinjenja iz gljive *I. obliquus* pokazala dobru redukciju jona bakra. Pri koncentraciji od 0.2 mg/mL redukciona sposobnost za jedinjenje 3,4 – dihidroksibenzaldehid bila je $3,62 \pm 0,01$, a za 4-(3,4 – dihidroksifenil) $4,00 \pm 0,01$. Ova jedinjenja su pokazala veću antioksidativnu aktivnost od pozitivne kontrole α -tokoferola. Ranije je utvrđeno da je CUPRAC analiza korisna za određivanje antioksidativne aktivnosti širokog spektra fenolnih kiselina, flavonoida, karetenoida, antocijanina, tiola ali i sintetičkih antioksidanasa poput vitamina C i E (Dimitrijevic i sar., 2015). CUPRAC reagens je stabilan, lako dostupan, jeftin i aktivan je skoro pri fiziološkoj pH, za razliku od FRAP metode koja se izvodi u kiseloj sredini, što predstavlja osnovnu prednost pri testiranju bioloških komponenata (Apak i sar., 2008).



Slika 20. Spособnost redukcije jona bakra (Cu^{2+}) ekstrakata IS i IM gljive *I. obliquus* dobijenih subkritičnom vodenom ekstrakcijom

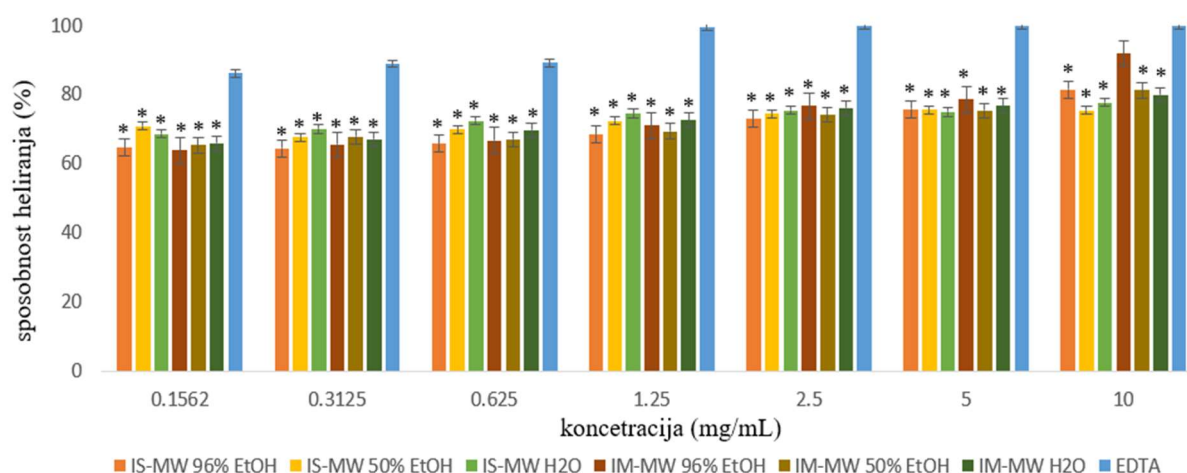
Rezultati su izraženi kao srednja vrednost za tri ponavljanja \pm standardna devijacija. Statistička značajnost u odnosu na pozitivnu kontrolu analizirana je pomoću one-way ANOVA, primenom Tukey-ovog testa (* $p < 0,05$).

5.3.1.4. Spособnost heliranja jona gvožđa ekstrakata gljive *I. obliquus*

Gvožđe je neophodno za pravilno funkcionisanje ćelijskih procesa, kao što su transport kiseonika, ćelijsko disanje, ali je i kofaktor za brojne metaloenzime (Islam i sar., 2016). Međutim, višak slobodnog gvožđa može da izazove stvaranje reaktivnih vrsta kiseonika, tako što Fe^{2+} redukuje H_2O_2 do hidroksil radikala Fentonovom reakcijom. Reaktivne vrste kiseonika se povezuju sa nastankom brojnih bolesti, poput kardiovaskularnih oboljenja, tumora, Alchajmerove i Parkinsonove bolesti, kao i sa starenjem (Janjušević et al., 2017). U ovom istraživanju spособnost heliranja jona gvožđa određena je ferozin testom. Antioksidativni potencijal se procenjuje narušavanjem kompleksa Fe^{2+} i ferozina u prisustvu helirajućih agenasa, poput ekstrakata gljiva, te dolazi do slabljenja intenziteta tamnocrvene boje rastvora u odnosu na netretiranu kontrolu (Ghosh i sar., 2021). Niže apsorpcije ukazuju na veću helirajuću spособnost. Helatori igraju veoma važnu ulogu u telu zbog njihove spособnosti da mobilizuju gvožđe iz tela formiranjem stabilnog, rastvorljivog kompleksa koji se izlučuje iz organizma preko urina i fekalija (Kontoghiorghes i Kontoghiorghes, 2020). Veliki broj molekula sa svojstvima heliranja koji imaju spособnost da vezuju višak gvožđa mogu da ponude terapijsko rešenje za mnoge bolesti koje su povezane sa toksičnošću metala (Kontoghiorghes i Kontoghiorghes, 2020).

Spособnost heliranja Fe^{2+} ekstrakata dobijenih mikrotalasnom ekstrakcijom se povećavala vrlo malo sa porastom koncentracije kao što je prikazano (Slika 21). Svi testirani ekstrakti pokazali su slabiji helirajući efekat u odnosu na sintetički helator, EDTA, kod koga je spособnost heliranja bila 100% (u testiranom opsegu od 2.5 - 10 mg/mL). Pri koncentraciji od 0,1562 mg/mL spособnost heliranja se kretala od $63,83 \pm 0,06$ – $65,88 \pm 0,45\%$, dok je pri koncentraciji od 20 mg/mL helirajući efekat ovih ekstrakata bio od $75,26 \pm 0,63$ – $91,86 \pm 4,97\%$ fero jona. IM - MW 96% EtOH ekstrakt pri maksimalnoj testiranoj koncentraciji pokazao je najizraženiji helirajući efekat ($91,86 \pm 4,97\%$). Visoka aktivnost heliranja gvožđa kod IM ekstrakta dobijenog 96% etanolom može biti posledica prisustva značajnih količine

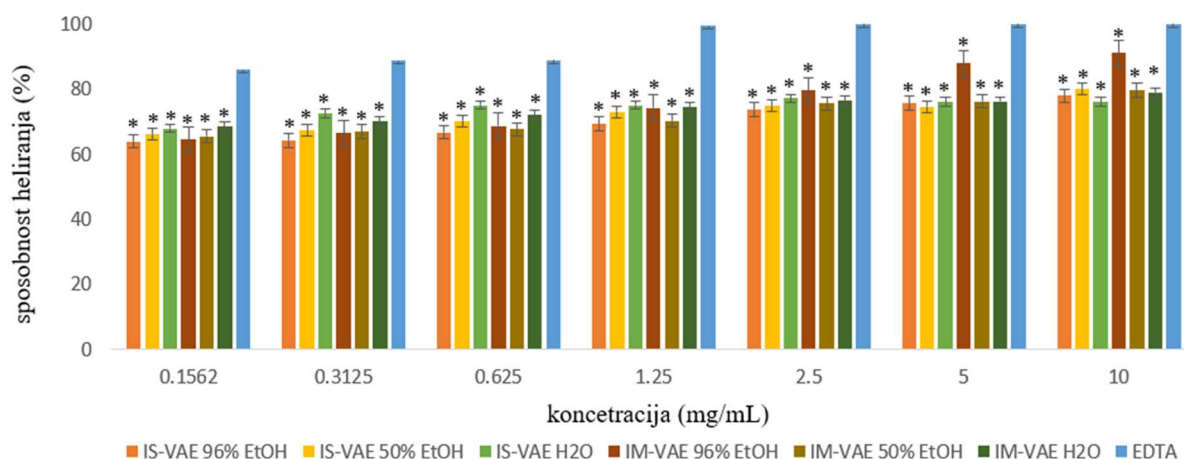
katehina i kvercetina u ovom ekstraktu. Od ranije je već poznato da su flavonoidi važni antioksidansi, posebno su aktivni prilikom heliranja metala (Abu-Reidah i sar., 2021).



Slika 21. Spособnost heliranja jona gvožđa (Fe^{2+}) ekstrakata IS i IM gljive *I. obliquus* dobijenih mikrotalasnom ekstrakcijom

Rezultati su izraženi kao srednja vrednost za tri ponavljanja \pm standardna devijacija-Statistička značajnost u odnosu na pozitivnu kontrolu analizirana je pomoću one-way ANOVA, primenom Tukey-ovog testa (* $p < 0,05$).

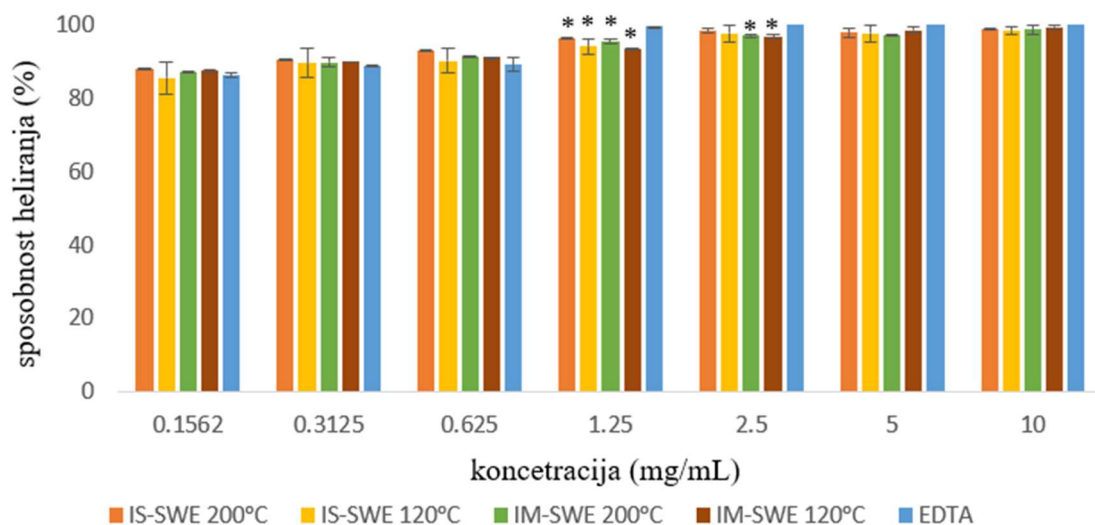
Slična situacija bila je kod ekstrakata dobijenih pomoću ultrazvuka, sposobnost heliranja fero jona kod testiranih ekstrakata se blago povećavala sa porastom koncentracije (Slika 22). Tako je pri koncentraciji od 0,1562 mg/mL helirajući efekat bio od $64,03 \pm 0,15 - 68,43 \pm 0,19\%$, a pri maksimalnoj testiranoj koncentraciji od 10 mg/mL od $76,16 \pm 0,13 - 91,09 \pm 1,02\%$. IM 96% EtOH se pokazao kao najefikasniji ekstrakt, skoro kao pozitivna kontrola EDTA (100%), a to može biti posledica oslobađanja jedinjenja koja doprinose vezivanju metala. U ovom ekstraktu detektovane su značajne količine katehina kao i kod IM – MW 96% uzorku, dok je koncentracija kvercetina bila značajno niža. Ovo ukazuje da su verovatno fenoli bili odgovorni za dobru efikasnost IM 96% EtOH ekstrakta, posebno što je od ranije poznato da visoke koncentracije etanola dovode do taloženja proteina i polisaharida zbog povećanja elektrostatičkih interakcija između polarnih delova različitih molekula (Al Azad i Ai Ping, 2021).



Slika 22. Sposobnost heliranja jona gvožđa (Fe^{2+}) ekstrakata IS i IM gljive *I. obliquus* dobijenih ultrazvučnom ekstrakcijom

Rezultati su izraženi kao srednja vrednost za tri ponavljanja \pm standardna devijacija. Statistička značajnost u odnosu na pozitivnu kontrolu analizirana je pomoću one-way ANOVA, primenom Tukey-ovog testa (* $p < 0,05$).

SWE ekstrakti bili su značajno efikasniji od MW i VAE. Subkritičnom vodenom ekstrakcijom došlo je do oslobađanja jedinjenja koja su najviše doprinela sposobnosti heliranja fero jona, bez obzira na poreklo materijala i temperature na kojoj su dobijeni ekstrakti (Slika 23). Ekstrakti srpske Čage dobijeni na temperaturi $200\text{ }^{\circ}\text{C}$ helirali su $98,60 \pm 0,26\%$, a na $120\text{ }^{\circ}\text{C}$ $98,15 \pm 0,96\%$ fero jona, pri koncentraciji od 10 mg/mL . Ekstrakti poreklom iz Mongolije takođe su pokazali izuzetnu efikasnost od $98,47 \pm 1,28\%$ ($200\text{ }^{\circ}\text{C}$) i $99,11 \pm 0,77\%$ ($120\text{ }^{\circ}\text{C}$). Pri svim testiranim koncentracijama sposobnost vezivanja fero jona bila je slična onoj koju pokazuje pozitivna kontrola EDTA, za sve testirane uzorke. Dakle, svi ekstrakti posebno SWE, pokazuju značajan uticaj na formiranje kompleksa Fe^{2+} i ferozina i mogu se smatrati dobrim helatorima gvožđa. Helatna aktivnost je značajna jer se smanjuje koncentracija prelaznog metala koji katalizuje lipidnu peroksidaciju (Sudha i sar., 2012). Dobijeni podaci ukazuju da različito dobijeni ekstrakti gljive *I. obliquus* imaju visok kapacitet za vezivanje fero jona i na taj način sprečavaju pokretanje oksidativnog stresa.



Slika 23. Spособnost heliranja jona gvožđa (Fe^{2+}) ekstrakata IS i IM gljive *I. obliquus* dobijenih subkritičnom vodenom ekstrakcijom
Rezultati su izraženi kao srednja vrednost za tri ponavljanja \pm standardna devijacija. Statistička značajnost u odnosu na pozitivnu kontrolu analizirana je pomoću one-way ANOVA, primenom Tukey-ovog testa (* $p < 0,05$).

Ova studija je pokazala da se različito dobijeni ekstrakti gljive *I. obliquus* mogu smatrati dobrim izvorom potencijalnih prirodnih antioksidativnih jedinjenja. Različite antioksidativne metode su korišćene kako bismo bolje razumeli antioksidativni potencijal Čage. Kao što je primećeno i naglašeno u ovom istraživanju varijacije koje se javljaju prilikom određivanja antioksidativne aktivnosti različito dobijenih ekstrakata su posledica različitih tehnika ekstrakcije bioaktivnih molekula, njihove raznovrsnosti, ali i geografskog porekla materijala i vrste breze na kojoj je gljiva rasla. Različiti načini ekstahovanja favorizuju određene grupe jedinjenja što je potvrđeno i u ovom istraživanju, a ona mogu da budu od velike važnosti i da imaju ogroman biološki potencijal. Iz prikazanih rezultata može se zaključiti da ekstrakti dobijeni subkritičnom vodenom ekstrakcijom imaju bolju antioksidativnu moć u odnosu na ostale primenjene tehnike. Povišena temperatura i pritisak kod ovog tipa ekstrakcije doveli su do efikasnijeg izdvajanja antioksidativnih jedinjenja ili njihove kombinacije. SWE ekstrakcija omogućava oslobađanje više aktivnih antioksidativnih jedinjenja koja bi se potencijalno mogla primeniti u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji i koja bi mogla da pomognu u prevenciji mnogih oboljenja.

5.3.2. Antimikrobna aktivnost

Infekcije koje su ranije relativno lako lečene danas postaju ozbiljan problem zbog široke rasprostranjenosti antimikrobne rezistencije (Alves i sar., 2012). Savremena medicina se sve više suočava sa pretnjom da se vrati u pre-antibiotski period, bar za neke vrste zaraznih bolesti. Antibiotici su nesumnjivo najjači antimikrobni agensi, ali njihova zloupotreba danas predstavlja globalni problem. Odgovarajuća antibiotska terapija ima mnogo uspeha, međutim infekcija se ponovo pojavljuje kod 25% obolelih (Jurica i sar., 2015). Antimikrobna rezistencija je 2019. godine navedena od strane Svetske zdravstvene organizacije kao jedan od najvećih globalnih problema (WHO, 2019). To intenziviralo potragu za novim antimikrobnim jedinjenjima. Među novim grupama organizama koji se istražuju su i gljive koje bi mogle biti alternativni izvor novih antimikrobnih lekova.

Antimikrobni potencijal dobijenih ekstrakata gljive *I. obliquus* prema odabranim ATCC i kliničkim sojevima mikroorganizama određen je mikrodilucionom metodom i praćenjem kinetike rasta mikroorganizama - merenjem optičke gustine. Takođe je određen i tip interakcija kombinovanjem odabranih ekstrakata sa etanolnim ekstraktom kantariona - primenom metode šahovske table.

5.3.2.1. Minimalne inhibitorne (MIC) i minimalne baktericidne koncentracije (MBC) ekstrakata gljive *I. obliquus*

Osetljivost bakterija prema ispitivanim ekstraktima gljive *I. obliquus* analizirana je određivanjem MIC i MBC vrednosti koje su prikazane u Tabeli 7.

Gram pozitivne bakterije pokazale su veću osetljivost prema testiranim ekstraktima gljive *I. obliquus* u poređenju sa Gram negativnim bakterijama kako u slučaju ATCC, tako i kod kliničkih izolata. Većina ekstrakata delovala je antimikrobno prema *E. faecalis* ATCC 29219. Minimalne inhibitorne koncentracije su bile u opsegu od 5 do 20 mg/mL. Najjače antimikrobno dejstvo prema *E. faecalis* ATCC 29219 utvrđeno je za ekstrakte IS i IM SWE 200 °C (MIC - 5 mg/mL), visok antimikrobni potencijal potvrđen je i kod ekstrakata IS i IM SWE 120°C (MIC - 10 mg/mL). Ekstrakti dobijeni subkritičnom vodenom ekstrakcijom (200 °C) pokazali su i mikrobicidni potencijal (MBC - 20 mg/mL). Aktivnost ekstrakta dobijenih mikrotalasima i ultrazvukom uz upotrebu 96% EtOH, 50% EtOH i H₂O bila je relativno slaba prema *E. faecalis* ATCC 29219 (MIC - 20 mg/mL). MBC vrednosti nisu detektovane. Slična aktivnost je potvrđena i prema *S. aureus* ATCC 25923, inhibitorno dejstvo pri koncentraciji od 20 mg/mL ispoljili su SWE 120 °C, MW i VAE (kada su kao rastvarači korišćeni 50 % EtOH i voda), dok je MIC vrednost za SWE 120 °C bila 10 mg/mL. SWE 120 °C ekstrakt obe Čage ispoljio je i baktericidno dejstvo prema *S. aureus* ATCC 25923 (MBC – 20 mg/mL). U slučaju kliničkih Gram pozitivnih izolata, MRSA je pokazao veću osetljivost prema ekstraktima poreklom iz srpske Čage. Najniža MIC vrednost (10 mg/mL) utvrđena je za ekstrakte MW i VAE gde je 96% EtOH bio rastvarač, kod ostalih ekstrakta MIC je utvrđena pri koncentraciji od 20 mg/mL. Svi testirani ekstrakti ispoljili su baktericidno dejstvo pri koncentraciji od 20 mg/mL prema MRSA. MIC i MBC nisu utvrđene kod ekstrakta MW H₂O. Ekstrakti dobijeni iz mongolske Čage su bili manje aktivni, VAE nisu delovali na MRSA, dok su MW i SWE ekstrakti pokazali inhibitorno dejstvo pri koncentraciji od 20 mg/mL. IM MW 96% EtOH i SWE 120 °C ekstrakti delovali su mikrobicidno pri koncentraciji 20 mg/mL. Svi testirani ekstrakti pokazali su inhibitorno dejstvo prema kliničkom izolatu *E. faecalis* (MIC – 20 mg/mL). MW 96% EtOH ekstrakt obe Čage ispoljio je i baktericidno dejstvo prema ovom kliničkom izolatu (MBC – 20 mg/mL).

Tabela 7. Antibakterijska aktivnost ekstrakata gljive *I. obliquus* određena mikrodilucionom metodom i izražena vrednostima MIC i MBC (mg/mL)

Ekstrakt	<i>S. aureus</i> 25923		<i>S. aureus</i> (MRSA)		<i>E. faecalis</i> 29212		<i>E. faecalis</i> klinički izolat		<i>E. coli</i> 25922		<i>E. coli</i> klinički izolat		<i>P. aeruginosa</i> 35032		<i>P. aeruginosa</i> MMA83		
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	
IS	MW 96 % EtOH	nd	nd	10	20	20	nd	20	20	20	nd	nd	nd	20	nd	20	nd
	MW 50 % EtOH	20	nd	20	20	20	nd	20	nd	20	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	MW water	nd	nd	nd	nd	20	nd	20	nd	20	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	VAE 96 % EtOH	nd	nd	10	20	20	nd	20	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	VAE 50 % EtOH	20	nd	20	20	20	nd	20	nd	20	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	VAE water	20	nd	20	20	20	nd	20	nd	20	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	SWE 200 °C	10	20	20	20	5	20	20	nd	20	nd	nd	nd	20	nd	20	nd
	SWE 120 °C	20	nd	20	20	10	nd	20	nd	20	nd	nd	nd	20	nd	nd	nd
IM	MW 96 % EtOH	nd	nd	20	20	20	nd	20	20	20	nd	nd	nd	20	nd	nd	nd
	MW 50 % EtOH	20	nd	20	nd	20	nd	20	nd	20	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	MW water	nd	nd	20	nd	20	nd	20	nd	20	nd	nd	nd	nd	nd	20	nd
	VAE 96% EtOH	nd	nd	nd	nd	20	nd	20	nd	nd	nd	nd	nd	20	nd	nd	nd
	VAE 50 % EtOH	nd	nd	nd	nd	20	nd	20	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	VAE water	nd	nd	nd	nd	20	nd	20	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	SWE 200 °C	10	20	20	20	5	20	20	nd	20	nd	nd	nd	20	nd	20	nd
	SWE 120 °C	20	nd	20	nd	10	nd	20	nd	20	nd	nd	nd	20	nd	nd	nd
gentamicin	0.0024	0.002	0.078	0.078	0.0781	0.156	5	5	0.0097	0.0097	0.0781	0.0781	0.3125	0.625	5	5	

nd - nije definisan

Gram negativne bakterije bile su značajno otpornije na testirane ekstrakte. Klinički izolat *E. coli* pokazao je otpornost prema svim testiranim ekstraktima; ni kod jednog nije utvrđena MIC. Čaga poreklom iz Srbije pokazala je jači efekat prema *E. coli* ATCC 25922 za većinu testiranih ekstrakata, samo VAE 96% EtOH nije imao antimikrobnu aktivnost, dok je za ostale ekstrakte utvrđen MIC od 20 mg/mL. Kada je reč o Čagi poreklom iz Mongolije, ekstrakti dobijeni ultrazvukom nisu pokazali antimikrobnu aktivnost, dok je je MIC vrednost bila 20 mg/mL za MW i SWE ekstrakte; nijedan od testiranih ekstrakata nije pokazao baktericidnu aktivnost. IS i IM ekstrakti dobijeni pomoću mikrotalasa (kada su korišćeni 50% EtOH i H₂O) i ultrazvuka (svi korišćeni rastvarači) nisu pokazali nikakav uticaj prema bakteriji *P. aeruginosa* ATCC 35032. Ekstrakti dobijeni subkritičnom vodenom ekstrakcijom i mikrotalasnou ekstrakcijom (96% EtOH) delovali su inhibitorno pri najvišoj testiranoj koncentraciji (MIC 20 mg/mL). Nijedan od ekstrakata nije pokazao baktericidno dejstvo prema *P. aeruginosa* ATCC 35032. Klinički izolat *P. aeruginosa* MMA83 bio je otporan prema skoro svim testiranim ekstraktima, MIC od 20 mg/mL je utvrđen kod sledećih ekstrakata: IM MW H₂O, IS i IM SWE 200 °C. Nijedan ekstrakt nije pokazao baktericidno dejstvo prema kliničkom izolatu *P. aeruginosa* MMA83.

U dostupnoj literaturi vrlo su oskudni podaci o antimikrobnoj aktivnosti ekstrakata Čage. Iako se *I. obliquus* dugo koristi u tradicionalnoj medicini, a poslednjih decenija sve su intenzivnija ispitivanja njenih bioloških svojstava, njen antimikrobni potencijal je veoma malo ispitan i nema podataka o mehanizmu delovanja ekstrakata. U objavljenim istraživanjima korišćeni su ekstrakti koji uglavnom nisu dobijeni savremenim, zelenim tehnikama ekstrakcije. Glamočlija i sar. (2015) utvrdili su da etanolni i vodeni ekstrakti Čage poreklom iz Rusije, Finske i sa Tajlanda imaju inhibitorno i baktericidno delovanje prema Gram - pozitivnim i Gram - negativnim bakterijama. Najosetljivije bakterije na testirane ekstrakte su bile *Staphylococcus aureus* i *Bacillus cereus*, dok su najotpornije bile *Listeria monocytogenes*, *E. coli* i *Enterobacter cloacae*. Pored toga, Milyuhina i sar. (2021) su objavili da vodeni ekstrakt *I. obliquus* dobijen pomoću mikrotalasa pokazuje antimikrobnu aktivnost prema *S. aureus* (12,00 ± 0,4 mm), *Enterococcus* spp. (10,3 ± 0,3 mm) i *E. coli* (13,7 ± 0,3), pri koncentraciji od 200 mg/mL. Ovo zapažanje se može pripisati povećanom sadržaju fenola u ekstraktima nakon izlaganja mikrotalasa, ali i neuobičajeno visokim koncentracijama ekstrakata (Papoutsis i sar., 2016). Milyuhina i sar., (2021) su potom izvestili da su metanolni i etanolni ekstrakti *I. obliquus* ispoljili još intenzivnije dejstvo prema *S. aureus* (22,00 ± 0,2 mm), *Enterococcus* spp. (22,00 ± 0,2 mm) i *Proteus* spp. (22,00 ± 0,2 mm) u poređenju sa vodenim ekstraktom koji je pokazao niže zone inhibicije za iste sojeve. Dobijeni rezultati su ukazali da se korišćenjem organskih rastvarača ekstrahuje veći broj aktivnih jedinjenja u odnosu na ekstrakciju vodom. Upska i sar., (2023) su u svom istraživanju pokazali da su *E. coli*, *S. aureus* i *P. aeruginosa* otporne na etil - acetatni ekstrakt *I. obliquus*. Sa druge strane, Altuwajiri i sar., (2023) su utvrdili za *S. aureus* i *Salmonella* Typhimurium MIC od 3.125 µg/mL za etil-acetatni tip ekstrakta.

Ovo istraživanje je obuhvatilo ispitivanje antimikrobne aktivnosti ekstrakata *I. obliquus* dobijenih savremenim tehnikama ekstrakcije prema ATCC i kliničkim izolatima. Kao i kod antioksidativne aktivnosti, na antimikrobnu aktivnost ekstrakata *I. obliquus* uticao je način ekstrakcije i odabir rastvarača. Pored referentnih ATCC sojeva, testirani su i klinički sojevi: *E. coli*, *E. faecalis*, MRSA i *P. aeruginosa* MMA83 koji su u praksi najčešće izloveni patogeni rezistentni na antimikrobne agense (Lord i sar., 2021). Pokazano je da su različito dobijeni ekstrakti Čage bili efikasniji prema Gram – pozitivnim bakterijama, što može biti posledica različitih struktura u građi ćelijskog zida (Liu i sar., 2017). Posebno je interesantno

što SWE ekstrakti pokazuju efikasnost prema skoro svim testiranim izolatima, sem prema kliničkom izolatu *E. coli* koji je pokazao rezistentnost prema svim testiranim ekstraktima. A ranije je već objašnjeno da povišena temperatura kod SWE ekstrakcije omogućava lakše izdvajanje velikog broja bioaktivnih jedinjenja koja mogu inhibirati bakterijski rast (Rodrigues Barbosa i sar., 2020). Takođe je primećeno da su MW ekstrakti dobijeni 50% EtOH pokazali MIC vrednosti kod Gram – pozitivnih ATCC i kliničkih sojeva i kod *E. coli* ATCC 25922. Ranije je dokazano da dodavanje vode organskim rastvaračima povećava prinos fenola koji mogu biti odgovorni za antimikrobnu aktivnost ekstrakata (Luthria, 2012). Mnoga fenolna jedinjenja imaju mikrobicidna svojstva ili inhibiraju rast mikroorganizama. Biosinteza različitih jedinjenja gljivama omogućava zaštitu od patogena, s obzirom da se radi o sedentarnim organizmima, kao što je slučaj sa biljkama (Balik i sar., 2020). Sekundarni metaboliti mogu na različite načine delovati na bakterijske ćelije, inhibiranjem biosinteze proteina i ćelijskog zida, narušavanjem strukture ćelijske membrane, inhibiranjem replikacije DNK i formiranja biofilma (Abass i sar., 2024).

U ranijim istraživanjima određivana je antimikrobna aktivnost pojedinačnih fenolnih komponenti poreklom iz gljiva. Heleno i sar., (2015) su procenili antimikrobnu aktivnost hidrosibenzojeve kiseline i cimetne kiseline prema Gram – pozitivnim i negativnim bakterijama koja je bila izrazito inhibitorna. Alves i sar. (2012) su pokazali antimikrobnu aktivnost 2,4-dihidroksidbenzojeve, protokatehuinske, vanilinske i p-kumarinske prema Gram - pozitivnim i Gram - negativnim bakterijama pri nižim koncentracijama (1 mg/mL), dok je cimetna kiselina pokazala antimikrobnu aktivnost prema MRSA. S obzirom da su sve pomenute kiseline detektovane u ekstraktima korišćenim u ovom istraživanju moguće je da su one doprinele antimikrobnom efektu pojedinih ekstrakata. Efikasnija aktivnost gljive *I. obliquus* prema Gram - pozitivnim bakterijama može se dovesti u vezu sa polisaharidima prema kojima je ćelijski zid ovih bakterija propustljiviji (Ren i sar., 2014). Polisaharidi izolovani iz gljiva značajno modifikuju sastav crevne mikrobiote, podstiču metabolizam i razmnožavanje korisnih mikroorganizama, a sa druge strane inhibiraju rast patogenih bakterija (Singdevsachan i sar., 2016). Generalno, neophodno je ispitati da li bioaktivna jedinjenja *I. obliquus* ispoljavaju svoja svojstva sa istom efikasnošću kada su u slobodnom stanju ili se koriste kao deo funkcionalne hrane. Takođe, potrebno je utvrditi potencijalne antagonističke ili sinergističke interakcije između *I. obliquus* i drugih jedinjenja ili antibiotika.

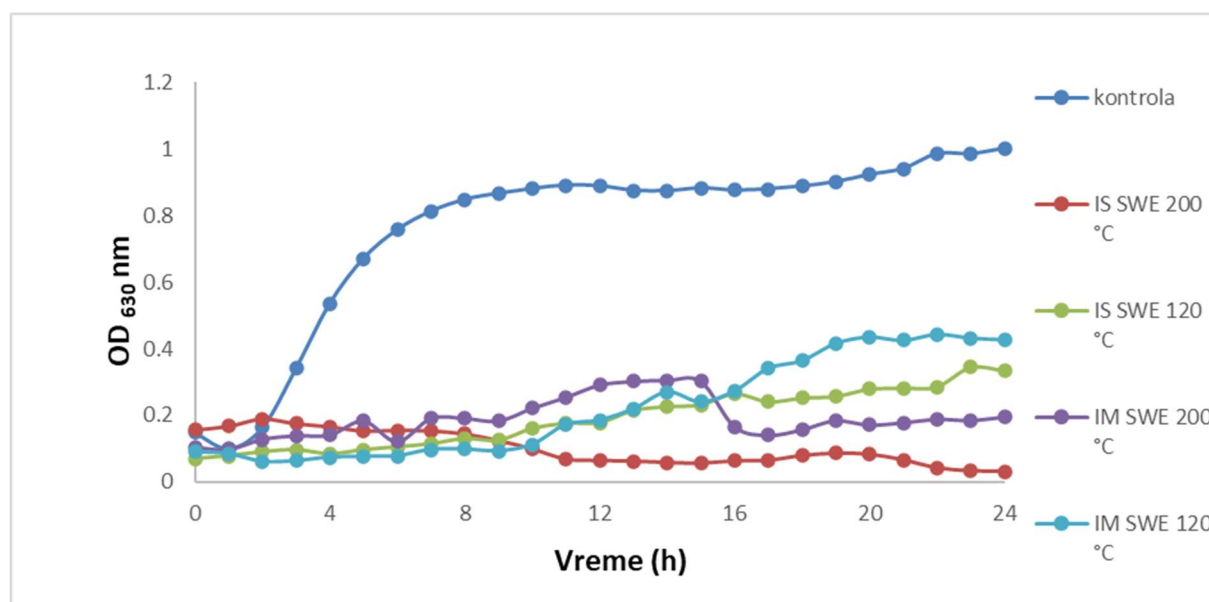
5.3.2.2. Određivanje kinetike rasta odabranih bakterija merenjem optičke gustine (OD)

Gram - pozitivne bakterije, klinički izolat MRSA i *E. faecalis* ATCC 29219 su izabrane za praćenje kinetike rasta u prisustvu najaktivnijih odabranih ekstrakata. Gram - negativne bakterije nisu korišćene u ovom mikrobiološkom ispitivanju s obzirom da nisu zabeležene MBC vrednosti ni za jedan testirani ekstrakt. MRSA je jedan od vodećih uzročnika upornih infekcija kod ljudi. MRSA izaziva ozbiljne infekcije otporne na konvencionalne terapije i smatra se najčešćim uzročnikom bolničkih infekcija (Cascioferro i sar., 2020). Postoji hitna potreba za novim terapijskim strategijama za ovaj patogen kako bi se prevazišli glavni mehanizmi otpornosti ove bakterije (Parrino i sar., 2020). Što se tiče roda *Enterococcus* tradicionalno se smatraju patogenima nižeg stepena, međutim poslednjih godina došlo je do pojave rezistencije na antibiotike, poput tetraciklina, ciprofloksacina, gentamicina, i eritromicina (Kafil i Asharzadeh, 2014). Radi se o Gram - pozitivnim bakterijama koje su deo mikrobiote gastrointestinalnog trakta većine ljudi, dve vrste se najčešće izoluju *Enterococcus faecalis* i *Enterococcus faecium*. *E. faecalis* uzrokuje 80-90% infekcija, dok *E. faecium* svega

10-15% (Oli i sar., 2012). U ovom delu istraživanja nije korišćen klinički izolat, zato što su analizirani ekstrakti pokazali bolju aktivnost prema referentnom soju.

Na osnovu prethodno dobijenih rezultata izdvojena su 4 najaktivnija ekstrakta koja su pokazala najbolju rastvorljivost (nije dolazilo do taloženja ni nakon 24 h) dobijena subkritičnom vodenom ekstrakcijom iz obe vrste Čage. Merenjem optičke gustine (engl. optical density, OD) dobijene su kalibracione krive rasta sa kojih je moguće utvrditi dobijene MIC i MBC vrednosti kroz lag, eksponencijalnu i stacionarnu fazu. Fazu odumiranja nije moguće odrediti jer uređaj ne razlikuje žive od mrtvih ćelija.

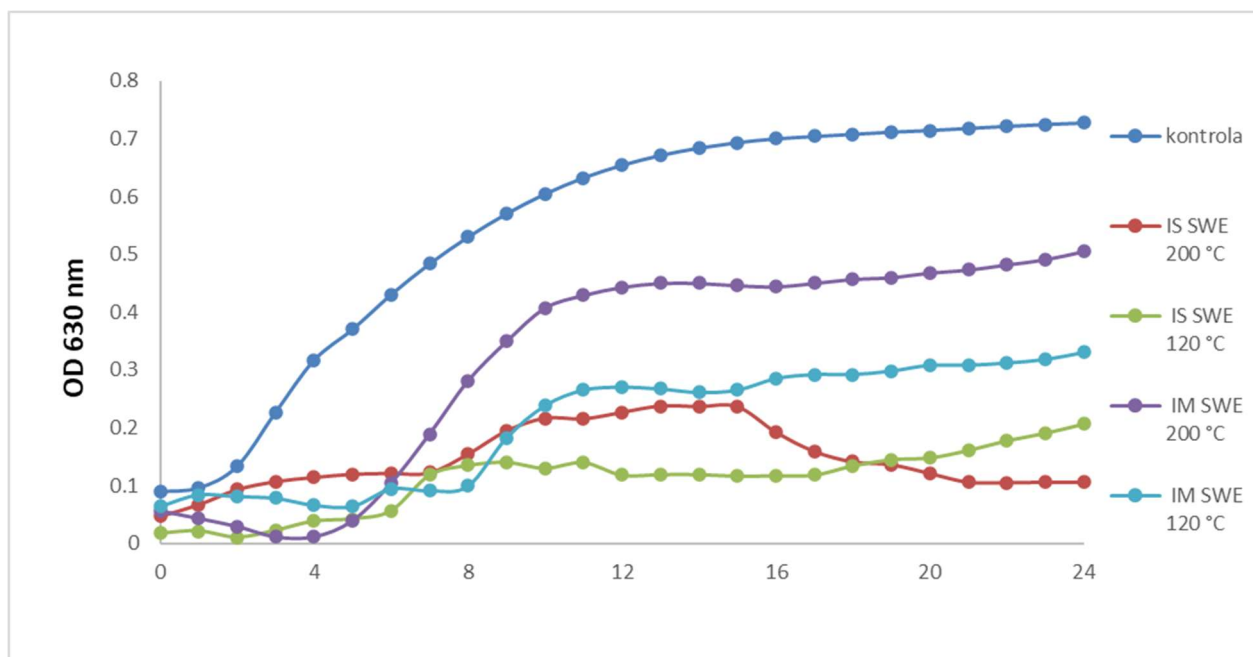
Krive rasta MRSA ćelija u prisustvu najviših testiranih koncentracija (20 mg/mL) SWE ekstrakta gljive *I. obliquus* prikazane su na Slici 24 SWE 200 °C ekstrakt Čage poreklom iz Srbije delovao je bakteriostatički već od 12. sata. Za ostala tri ekstrakta je primećeno da eksponencijalna faza počinje oko 10. sata i kod IM SWE 200 °C ekstrakta ova faza traje kratko, a potom ćelije ulaze u stacionarnu fazu. Kod SWE ekstrakata koji su dobijeni na temperaturi od 120 °C za obe vrste Čage blagi rast je uočen nakon 16. sata, ali krajnje dostignute OD vrednosti bile su znatno niže u odnosu na pozitivnu kontrolu. Rezultati dobijeni određivanjem kinetike rasta bili su u saglasnosti sa rezultatima mikrodilucione metode.



Slika 24. Kinetika rasta kliničnog izolata MRSA u prisustvu najaktivnijih ekstrakata gljive *I. obliquus* pri najvišoj testiranoj koncentraciji ekstrakata (20 mg/mL)

Druga bakterija koja je izabrana za praćenje kinetike rasta u prisustvu najaktivnijih SWE ekstrakata je bila *E. faecalis* ATCC 29219 (20 mg/mL) (Slika 25). *E. faecalis* je bila osetljivija na SWE ekstrakte dobijene iz srpske Čage. Uzorak SWE 120 °C bio je nešto efikasniji do 20. sata a potom se uočava blagi rast u odnosu na uzorak dobijen na temperaturi od 200 °C. Ekstrakt SWE 200 °C uticao je na dužinu eksponencijalne faze nakon čega je došlo do opadanja brojnosti bakterijske populacije. Mikrodilucionom metodom je utvrđeno da SWE 200 °C uzorak ima baktericidno dejstvo, dok kod uzorka SWE 120 °C nije zabeleženo antimikrobno dejstvo, ni pri najvišoj testiranoj koncentraciji, što je potvrđeno i ovom metodom.

SWE ekstrakti poreklom iz mongolske Čage pokazali su nešto slabiju aktivnost prema *E. faecalis*. Koncentracija od 20 mg/mL SWE 120 °C ekstrakta uticala je da ćelije *E. faecalis* uđu u eksponencijalnu fazu nakon 9 h, ona je kratko trajala i krajnje dostignute OD vrednosti su bile upola niže u poređenju sa pozitivnom kontrolom. Utvrđeno je odsustvo MBC. U prisustvu IM SWE 200 °C ekstrakta ćelije su ušle u eksponencijalnu fazu već nakon 4 h, krajnje dostignute OD vrednosti su bile nešto niže u poređenju sa pozitivnom kontrolom što znači da su ove bakterije uspele da nastave svoj životni ciklus u prisustvu ekstrakta, samo nešto sporije.



Slika 25. Kinetika rasta *E. faecalis* ATCC 29219 u prisustvu najaktivnijih ekstrakata gljive *I. obliquus* pri najvišoj testiranoj koncentraciji ekstrakata (20 mg/mL)

5.3.2.3. Utvrđivanje tipa interakcija između odabranih ekstrakata gljive *I. obliquus* i etanolnog ekstrakta kantariona (*Hypericum perforatum*)

U cilju određivanja potencijalnih sinergističkih efekata odabrana su 2 ekstrakta gljive *I. obliquus* (IS SWE 200 °C i IM SWE 200 °C) u kombinaciji sa etanolnim ekstraktom kantariona (*Hypericum perforatum*) i primenjen je metod šahovske table. Ispitivanje je urađeno na kliničkom izolatu MRSA i *E. faecalis* ATCC 29219, s obzirom da su izabrani ekstrakti pokazali dejstvo prema ovim bakterijama, ali samo pri najvišim testiranim koncentracijama (20 mg/mL). Određivanjem FICI indeksa određen je tip interakcije između testiranih ekstrakata koji može da bude: sinergistički ($FICI \leq 0,5$), aditivni ($0,5 < FICI \leq 1,5$), indiferentni ($1,5 < FICI \leq 4$) i antagonistički ($FICI > 4$).

Hypericum perforatum je višegodišnja biljka, poznata kao kantarion, veoma popularan tradicionalni biljni lek koji ima širok spektar primene. Dokazano je da ova biljka ima različite biološke aktivnosti, kao što su antioksidativne, antikancerogene, antiinflamatorne, antimikrobne, antidijabetične, takođe pokazuje i antidepresivni efekat i pomaže kod zarastanja rana i opekotina (Süntar i sar., 2016). Otkriveno je da etanolni ekstrakt kantariona ima antimikrobno dejstvo kao i antivirusnu aktivnost, što je posebno važno imajući u vidu potrebu za novim antimikrobnim supstancama ne samo protiv različitih infekcija, već i protiv mikroorganizama koji uzrokuju kvarenje hrane (Süntar i sar., 2016). Kantarion je bogat

flavonoidima, fenolnim kiselinama, naftrodiatronima (posebno hipericin i pseudohipericin koji su odgovorni za antidepresivni efekat), floroglucinolima, taninima kao i etarskim uljima (Morshedloo i sar., 2015).

Kao što prikazano u Tabeli 8. dobijeni rezultati ukazuju da su oba ekstrakta (IS SWE 200 °C i IM SWE 200 °C) ispoljila sinergističko dejstvo u kombinaciji sa etanolnim ekstraktom kantariona, prema odabranoj bakteriji *E. faecalis* (ATCC 29219). Poređenjem ekstrakata IS SWE 200 °C i IM SWE 200 °C može se videti da je ekstrakt IM SWE 200 °C efikasniji pri nižoj koncentraciji kada se kombinuje sa etanolnim ekstraktom kantariona. Prema Σ FICI indeksu utvrđen je sinergistički efekat ova dva ekstrakta koji omogućava smanjenje koncentracije oba ekstrakta. MIC vrednost IM SWE 200 °C je bila 20 mg/mL, etanolnog ekstrakta kantariona 20 mg/mL, dok je ta vrednost za oba ekstrakta u kombinaciji bila 2,5 mg/mL.

Tabela 8. Sinergistički efekat odabranih kombinacija ekstrakata prema izolatu *E. faecalis*

<i>Enterococcus faecalis</i> (ATCC 29219)					
antimikrobne supstance	MIC svake antimikrobne supstance (mg/mL)		FICI	Σ FICI	konačno dejstvo
	pojedinačno	u kombinaciji			
IS SWE 200 °C	20	2,5	0,125	0,375	sinergizam
Ekstrakt kantariona	20	5	0,25		
IM SWE 200 °C	20	2,5	0,125	0,25	sinergizam
Ekstrakt kantariona	20	2,5	0,125		

FICI - frakciona inhibitorna koncentracija, $FICI = MIC \text{ u kombinaciji} / MIC \text{ pojedinačna vrednost}$
 $\Sigma FICI$ - zbirna vrednost dve FICI vrednosti, $\Sigma FICI = FICI \text{ SWE ekstrakta} + FICI \text{ ekstrakta kantariona}$

U Tabeli 9. prikazani su rezultati tipa interakcije oba ekstrakta Čage (IS SWE 200 °C i IM SWE 200 °C) u kombinaciji sa etanolnim ekstraktom kantariona prema kliničkom izolatu MRSA. Može se uočiti da su ekstrakti IS SWE 200 °C i IM SWE 200 °C u kombinaciji sa kantarionom pokazali indiferentni efekat, odnosno da nije došlo do interakcije između testiranih ekstrakata. Za etanolni ekstrakt kantariona utvrđena MIC vrednost bila je 2,5 mg/mL, međutim u kombinaciji sa ekstraktima Čage ta vrednost je iznosila 5 mg/mL. Minimalna inhibitorna koncentracija SWE 200 °C uzorka poreklom iz Srbije u kombinaciji sa kantarionom bila je 10 mg/mL, dok je za uzorak poreklom iz Mongolije ta vrednost bila 2,5 mg/mL.

Tabela 9. Sinergistički efekat odabranih kombinacija ekstrakata prema kliničkom izolatu MRSA

MRSA					
antimikrobne supstance	MIC svake antimikrobne supstance (mg/mL)		FICI	ΣFICI	konačno dejstvo
	pojedinačno	u kombinaciji			
IS SWE 200 °C	20	10	0,5	2,5	indiferentan efekat
Ekstrakt kantariona	2,5	5	2		
IM SWE 200 °C	20	2,5	0,125	2,125	indiferentan efekat
Ekstrakt kantariona	2,5	5	2		

FICI - frakciona inhibitorna koncentracija, $FICI = MIC \text{ u kombinaciji} / MIC \text{ pojedinačna vrednost}$

$\Sigma FICI$ - zbirna vrednost dve FICI vrednosti, $\Sigma FICI = FICI \text{ SWE ekstrakta} + FICI \text{ ekstrakta kantariona}$

Do sada je opisano više opštih mehanizama antimikrobne interakcije koji dovode do sinergizma (Henri i sar., 2012). Oni mogu obuhvatiti inhibiciju zajedničkog biohemijskog puta, inhibiciju protektivnih enzima, upotrebu aktivnih komponenti ćelijskog zida radi boljeg prodora drugih antimikrobnih agenasa. Fenolne komponente koje su prisutne u ekstraktima mogu ostvariti aktivnost na više načina: komunikacijom sa bakterijskim proteinima i strukturama ćelijskog zida, mogu izazvati oštećenja citoplazmatične membrane, smanjiti fluidnost i inhibirati sintezu ćelijskog zida i nukleinskih kiselina (Slobodniková i sar., 2013). Iako nedostaju referentni podaci o ispitivanju kombinacije SWE ekstrakata Čage sa etanolnim ekstraktima kantariona, prethodna istraživanja su pokazala da su fenolna jedinjenja, koja i dominiraju u ekstraktima Čage u ovom istraživanju, odgovorna za značajan sinergistički efekat prema Gram - pozitivnim bakterijama (Daglia, 2012). Pronalazak odgovarajućih alternativnih kombinacija prirodnih ekstrakata može doprineti borbi protiv antimikrobne rezistencije.

5.3.3. Utvrđivanje produkcije biofilma

Na prethodno opisan način (navedi podnaslov odeljka) ocenjivana je sposobnost formiranja biofilma odabranih ATCC i kliničkih sojeva patogenih bakterija, odnosno dodeljene su kategorije koje su označavale slabu, umerenu ili izraženu produkciju biofilma. Rezultati inicijalne adhezivnosti i formiranja biofilma odabranih patogenih bakterija prikazani su u Tabeli 10. Uočava se da sve izolate odlikuje sposobnost adherencije na mikrotitarskim pločama (odnosno na polistirenu) i da su bolju sposobnost pokazali klinički izolati. Nakon 24h za kliničke izolate *P. aeruginosa* MMA83, *E. faecalis*, MRSA i ATCC izolat *E. faecalis* 29212 utvrđena je umerena produkcija biofilma (kategorija 2). Sa druge strane, za ATCC izolate *P. aeruginosa* 35032, *S. aureus* 29212, *E. coli* 25922 kao i za klinički izolat *E. coli* utvrđena je slaba produkcija biofilma. Nijedan izolat nije pokazao izraženu produkciju biofilma. Takođe, nakon inicijalne adhezivnosti nije došlo do promene kategorije kod kliničkih izolata, dok je kod ATCC jedina promena zabeležena za *E. faecalis* 29212 kod koga je primećeno smanjenje biofilma posle 48h, nakon inicijalne adhezivnosti.

Tabela 10. Inicijalna adhezivnost i sposobnost formiranja biofilma odabranih ATCC i kliničkih izolata

	<i>P. aeruginosa</i> 35032	<i>E. faecalis</i> 29212	<i>S. aureus</i> 25923	<i>E. coli</i> 25922	<i>P. aeruginosa</i> MMA83	<i>E. faecalis</i> klinički izolat	MRSA	<i>E. coli</i> klinički izolat
adhezija (24h)	+	++	+	+	++	++	++	+
biofilm (48h)	+	+	+	+	++	++	++	+

+ - slaba produkcija biofilma (kategorija 1); ++ - umerena produkcija biofilma (kategorija 2)

Formiranje biofilma daje mnogo veću mogućnost preživljavanja nego kada se bakterije nalaze u formi plankton (Lee i Tan, 2014). Bakterije koje proizvode biofilm su odgovorne za mnoge hronične infekcije i poznato je da ih je teško iskoreniti. Pokazuju rezistenciju na antibiotike na različite načine, kao npr. ograničavaju prodiranje antibiotika u biofilm ili dolazi do ekspresije gena odgovornih za rezistenciju (Usman i sar., 2011). Slična zapažanja su izneli i drugi autori. U studiji koju su sprovedi Ratajczak i Kamińska, (2021) a u kojoj se procenjuje sposobnost formiranja biofilma pokazano je da većina kliničkih izolata *P. aeruginosa* ima visok kapacitet formiranja biofilma (74%), dok je manje izolata ispoljilo umeren (16,4%) i slab (9,6%) potencijal. Takođe, Lobo i sar., (2018) su dokazali da je 77,5 % kliničkih *P. aeruginosa* izolata bilo sposobno za produkciju jakog ili umerenog biofilma. Što se tiče *E. faecalis*, Dimkić i sar., (2021) su utvrdili da od 76 testiranih kliničkih izolata većina (54 izolata) ima slabu produkciju biofilma (kategorija 1), dok su ostali izolati pokazali umerenu produkciju. Haddad i sar., (2018) su objavili da od 43 izolata MRSA 46,5% pokazuje jaku produkciju, a 53,5% umerenu. Takođe, u ovom istraživanju referentni sojevi *S. aureus* ATCC 6538 i *S. aureus* ATCC 43300 imaju visoku sposobnost da produkuju biofilm. Slično kao i u našem istraživanju Jr i sar. (2013) su utvrdili da *E. coli* najslabije produkuje biofilm; od 39 izolata 5 je formiralo slabu biomasu biofilma, a takođe referentni soj je imao slabu produkciju. Generalno, sposobnost formiranja biofilma je izraženija kod multirezistentnih sojeva, međutim, sposobnost mikroorganizma da produkuju biofilm može imati važnu, ali ne i presudnu ulogu u razvoju antimikrobne rezistencije (Lobo i sar., 2018).

5.3.4. Antiadhezivni i antibiofilmski potencijal ekstrakata gljive *I. obliquus*

Nakon utvrđivanja kategorija inicijalne adhezivnosti i produkcije biofilma svih testiranih izolata, odabrana su 4 koja su pokazala umerenu produkciju, 3 klinička (*P. aeruginosa* MMA83, *E. faecalis* i MRSA) i jedan ATCC soj (*E. faecalis* 29212). Na odabranim izolatima praćen je uticaj ekstrakata gljive *I. obliquus*, dobijenih na različite načine, na sposobnost adhezije, formiranje biofilma i razaranje biofilma. Na osnovu mikrodilucionog testa odabran je opseg koncentracija od 0,625 – 20 mg/mL. Rezultati uticaja redukcije inicijalne adhezivnosti (24 h) i formiranja biofilma (48 h) prikazani su u Tabelama (11; 12; 13; 14).

Što se tiče *P. aeruginosa* MMA83 skoro svi testirani ekstrakti bili su u stanju da spreče adheziju i formiranje biofilma pri najvišoj testiranoj koncentraciji (20 mg/mL), inhibicija je iznosila od 30 do 60%. Jedino IS VAE 96% EtOH nije pokazao ni antiadhezivno ni antibiofilmsko delovanje ni za jednu testiranu koncentraciju. Pri koncentracijama od 10 i 5 mg/mL primećeno je da MW i VAE (50% EtOH i H₂O) kao i SWE ekstrakti poreklom iz Srbije pokazuju bolju aktivnost nakon 24 h i 48 h u odnosu na iste ekstrakte poreklom iz Mongolije. Od ekstrakata mongolske Čage samo su VAE H₂O i SWE 200 °C pri koncentraciji od 5 mg/mL sprečili inicijalnu adhezivnost za oko 50%. Delovanje nižih testiranih

koncentracija (2,5, 1,25 i 0,625) uglavnom nije bilo statistički značajno, pošto nisu pokazale značajan procenat smanjenja adhezivnosti i produkcije biofilma, ili aktivnosti uopšte nije bilo. Nijedan od ekstrakta nije pokazao efekat kada je tretiran već formirani biofilm, (merenjem ukupne biomase nakon bojenja kristal violetom dobijene su izuzetno visoke apsorbance - rezultati nisu prikazani).

Kako je *P. aeruginosa* čest oportunistički patogen i ima sposobnost da formira biofilm može dovesti do brojnih akutnih i hroničnih bolničkih infekcija, a pokazuje i višestruku rezistenciju na niz antibiotika, dalja istraživanja bila su usmerena na praćenje uticaja odabranih ekstrakata na ekspresiju gena uključenih u QS sistem i odgovarajućih faktora virulencije. Takođe, za ovaj izolat i odabrane ekstrakte koji su pokazali dejstvo pri koncentraciji od 5 mg/mL primenjena je fluorescentna i SEM mikroskopija kako bi se pratio uticaj ekstrakata na formiranje biofilma i dekompoziciju biofilma. Kao kontrolni, tj. netretirani uzorak korišćen je *P. aeruginosa* MMA83.

U slučaju kliničkog izolata MRSA procenat inhibicije adhezije uglavnom je dostizao do 60% pri koncentracionom opsegu od 5 - 20 mg/mL. Jedino IS i IM ekstrakti dobijeni ultrazvukom kada je kao rastvarač korišćen 96% EtOH nisu ispoljili značajan procenat inhibicije za te koncentracije, dok pri nižim koncentracijama za iste ekstrakte efekta na adheziju i formiranje biofilma nije uopšte bilo. Važno je istaći da su SWE (IM i IS) ekstrakti bili veoma efikasni pri nižim koncentracijama (0,312–0,625) i da je procenat inhibicije bio između 40 – 60%. Nakon 48 h, većina ekstrakata pri višim testiranim koncentracijama (do 5 mg/mL) pokazala je sličan ili jači procenat inhibicije u poređenju sa antiadhezivnom aktivnošću. Sa druge strane, samo su SWE ekstrakti doveli do značajne inhibicije produkcije biofilma, između 30 i 50%.

Prema još jednom kliničkom izolatu - *E. faecalis*, svi ekstrakti pri najvišoj testiranoj koncentraciji ispoljili su značajan procenat inhibicije inicijalne adhezije (do 60%). Primećeno je da MW i VAE ekstrakti u kombinaciji sa 50% EtOH i SWE uzorci dobijeni na 200 °C zadržavaju sličan procenat inhibicije i pri koncentracijama od 10 i 5 mg/mL. Antibiofilmsko dejstvo utvrđeno je za sve ekstrakte, procenat inhibicije je bio između 30 – 50% pri najvišoj koncentraciji. Sa druge strane, niže koncentracije nisu pokazale značajan efekat dok za koncentracioni opseg 0,625 – 2,5 inhibicije nije bilo.

Slično kao kod kliničkih izolata, većina analiziranih ekstrakata pri koncentraciji od 20 mg/mL sprečila je inicijalnu adheziju *E. faecalis* ATCC 29212 između 30 i 50%, a nešto slabija inhibicija primećena je kod ekstrakata dobijenih ultrazvukom u vodi. Sa smanjenjem koncentracije ekstrakata opadao je i procenat inhibicije. Pri koncentracijama 10 i 5 mg/mL značajan procenat inhibicije zadržali su MW i VAE ekstrakti u kombinaciji sa 50% EtOH i SWE uzorci dobijeni na 200 °C slično kao i kod kliničkog izolata *E. faecalis*.

Tabela 11. Antiadhezivni efekat različitih ekstrakta *I. obliquus* prema *P. aeruginosa* MMA83 i MRSA

Uzorci	<i>P. aeruginosa</i> MMA83						MRSA						
	20	10	5	2,5	1,25	0,625	20	10	5	2,5	1,25	0,625	
IS	MW 96% EtOH	21,58 ± 1,39 ^a	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	57,8 ± 0,20 ^g	55,5 ± 0,46 ^{fg}	57,8 ± 0,92 ^g	39,91 ± 0,49 ^d	30,28 ± 0,02 ^b	25,23 ± 4,13 ^{bcd}
	MW 50% EtOH	54,99 ± 0,46 ^{gh}	48,88 ± 2,78 ^c	43,39 ± 1,86 ^c	32,71 ± 1,39 ^{def}	12,17 ± 1,91 ^{ab}	6,68 ± 0,93 ^{bc}	55,05 ± 0,53 ^{fg}	58,26 ± 1,38 ^g	60,55 ± 0,03 ^{gh}	41,28 ± 0,92 ^d	30,73 ± 0,14 ^b	27,06 ± 0,49 ^{cde}
	MW water	51,28 ± 1,39 ^{fg}	49,05 ± 2,70 ^c	51,62 ± 2,13 ^d	38,75 ± 2,78 ^f	16,89 ± 0,93 ^{cde}	10,39 ± 1,86 ^{de}	57,34 ± 0,46 ^g	57,17 ± 0,36 ^g	59,63 ± 0,83 ^{gh}	50,92 ± 0,32 ^f	40,83 ± 0,46 ^d	31,65 ± 0,32 ^{ef}
	VAE 96% EtOH	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	31,19 ± 1,83 ^a	21,1 ± 2,75 ^a	12,36 ± 0,46 ^a	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
	VAE 50% EtOH	51,74 ± 1,86 ^{fg}	49,32 ± 2,23 ^c	37,36 ± 0,46 ^b	29,37 ± 2,88 ^{cde}	16,05 ± 3,00 ^{cd}	6,89 ± 2,78 ^{bcd}	54,59 ± 0,46 ^{ef}	59,17 ± 1,03 ^g	61,01 ± 0,71 ^{gh}	55,5 ± 4,3 ^h	38,99 ± 0,38 ^d	30,28 ± 0,92 ^{def}
	VAE water	47,56 ± 1,39 ^{ef}	50,34 ± 2,32 ^c	51,28 ± 0,45 ^d	35,49 ± 3,25 ^{ef}	16,98 ± 2,87 ^{cde}	12,57 ± 1,86 ^c	50,92 ± 3,21 ^{cd}	57,43 ± 0,94 ^g	58,71 ± 1,81 ^g	49,08 ± 3,21 ^f	39,45 ± 1,83 ^d	33,48 ± 2,29 ^f
	SWE 200 °C	57,31 ± 0,93 ^h	58,24 ± 0,93 ^f	51,06 ± 1,39 ^d	33,21 ± 0,46 ^{def}	24,36 ± 0,46 ^f	6,93 ± 2,32 ^{bcd}	57,34 ± 0,46 ^g	56,78 ± 1,03 ^{fg}	58,26 ± 1,37 ^g	58,72 ± 0,03 ⁱ	58,26 ± 1,37 ^c	55,96 ± 0,19 ^h
	SWE 120 °C	51,28 ± 1,39 ^{fg}	45,71 ± 0,47 ^{de}	51,43 ± 1,75 ^b	25,75 ± 2,78 ^{bc}	21,11 ± 0,93 ^{ef}	8,32 ± 0,92 ^{cd}	58,26 ± 0,43 ^{gh}	59,17 ± 0,21 ^g	58,09 ± 0,19 ^g	60,09 ± 0,36 ⁱ	60,55 ± 0,91 ^c	58,72 ± 0,93 ^h
IM	MW 96% EtOH	28,07 ± 1,39 ^b	20,19 ± 1,86 ^a	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	57,26 ± 0,39 ^g	58,72 ± 0,92 ^g	45,41 ± 1,26 ^{cd}	34,86 ± 0,91 ^c	22,02 ± 0,68 ^a	16,97 ± 1,13 ^a
	MW 50% EtOH	37,36 ± 2,32 ^c	30,39 ± 2,78 ^c	19,88 ± 4,29 ^a	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	54,13 ± 0,92 ^{ef}	52,29 ± 0,77 ^{ef}	49,49 ± 3,62 ^d	41,28 ± 1,83 ^d	33,95 ± 0,85 ^{bc}	21,79 ± 0,96 ^{ab}
	MW water	29,47 ± 1,86 ^b	28,07 ± 1,39 ^{bc}	34,11 ± 1,86 ^b	23,43 ± 2,32 ^{bc}	10,98 ± 1,51 ^a	0,00 ± 0,00	51,38 ± 0,78 ^{cd}	44,49 ± 1,20 ^c	44,04 ± 0,92 ^c	28,44 ± 0,29 ^b	22,25 ± 0,47 ^a	17,34 ± 1,73 ^a
	VAE 96% EtOH	44,78 ± 2,32 ^{de}	32,71 ± 2,32 ^c	19,72 ± 2,32 ^a	20,18 ± 2,78 ^b	8,58 ± 0,46 ^a	0,00 ± 0,00	40,37 ± 1,83 ^b	34,86 ± 1,83 ^b	21,56 ± 0,46 ^b	16,06 ± 0,46 ^a	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
	VAE 50% EtOH	42,46 ± 1,86 ^d	30,86 ± 3,25 ^c	18,79 ± 0,46 ^a	12,76 ± 0,05 ^a	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	52,75 ± 0,41 ^{de}	55,5 ± 0,46 ^{fg}	54,13 ± 0,09 ^{fg}	42,2 ± 0,84 ^d	34,4 ± 2,29 ^{bc}	29,36 ± 3,67 ^{def}
	VAE water	47,84 ± 1,67 ^{ef}	40,14 ± 4,18 ^d	51,43 ± 2,84 ^d	27,61 ± 2,78 ^{cd}	13,23 ± 2,32 ^{ab}	0,00 ± 0,00	54,59 ± 0,23 ^{ef}	56,88 ± 0,01 ^{fg}	52,29 ± 2,75 ^{ef}	44,95 ± 0,62 ^{de}	32,57 ± 0,46 ^b	23,85 ± 1,16 ^{bc}
	SWE 200 °C	51,28 ± 0,46 ^{fg}	47,84 ± 1,67 ^c	50,89 ± 1,41 ^d	39,21 ± 3,25 ^f	29,47 ± 2,78 ^g	3,89 ± 0,91 ^a	52,29 ± 1,14 ^{de}	59,17 ± 0,38 ^g	54,12 ± 0,02 ^{fg}	56,42 ± 0,44 ^h	56,88 ± 0,03 ^c	53,21 ± 0,16 ^h
	SWE 120 °C	29,47 ± 0,93 ^b	23,43 ± 0,46 ^{ab}	23,90 ± 1,86 ^a	12,30 ± 2,32 ^a	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	49,54 ± 0,88 ^c	51,38 ± 1,18 ^{de}	50,46 ± 1,81 ^c	53,66 ± 1,37 ^g	37,61 ± 1,58 ^{cd}	40,37 ± 0,99 ^g

¹Rezultati su izraženi kao % inhibicije prevencije adhezije u poređenju sa kontrolom (bakterija bez prisustva testiranih uzoraka)

²Različita slova u kolonama označavaju statistički različite vrednosti (p < 0.05)

Tabela 12. Antiadhezivni efekat različitih ekstrakta *I. obliquus* prema kliničkom izolatu *E. faecalis* i ATCC soju *E. faecalis*

Uzorci	<i>E. faecalis</i> klinički izolat						<i>E. faecalis</i> ATCC 29212							
	20	10	5	2,5	1,25	0,625	20	10	5	2,5	1,25	0,625		
IS	MW 96% EtOH	58,80 ± 1,68 ^f	23,91 ± 2,10 ^b	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	55,34 ± 0,97 ^{de}	50,23 ± 0,86 ^e	41,26 ± 2,31 ^{cd}	31,07 ± 1,94 ^{de}	9,22 ± 3,36 ^b	1,94 ± 0,03 ^a	
	MW 50% EtOH	61,32 ± 0,02 ^g	63,42 ± 0,42 ^h	58,8 ± 0,94 ^{fg}	34,42 ± 0,74 ^d	26,85 ± 3,36 ^c	0,00 ± 0,00	56,79 ± 0,49 ^{ef}	57,77 ± 0,38 ^f	51,94 ± 1,45 ^e	42,23 ± 0,49 ^g	29,13 ± 0,74 ^d	11,17 ± 1,46 ^d	
	MW water	56,28 ± 2,25 ^{de}	28,81 ± 2,58 ^{bc}	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	35,92 ± 2,91 ^b	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
	VAE 96% EtOH	50,46 ± 1,17 ^{bc}	57,79 ± 0,04 ^{gh}	46,79 ± 0,92 ^e	31,47 ± 2,13 ^{cd}	3,31 ± 1,68 ^a	0,00 ± 0,00	54,85 ± 2,42 ^{de}	39,81 ± 1,94 ^d	27,67 ± 1,37 ^{ab}	9,71 ± 1,94 ^b	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
	VAE 50% EtOH	59,64 ± 0,35 ^{fg}	61,32 ± 0,12 ^h	63,00 ± 1,46 ^g	41,56 ± 1,26 ^c	29,15 ± 1,83 ^c	0,00 ± 0,00	55,83 ± 0,49 ^{de}	50,00 ± 3,39 ^c	50,74 ± 3,31 ^e	34,95 ± 0,06 ^{ef}	17,48 ± 2,19 ^c	4,85 ± 0,97 ^b	
	VAE water	53,34 ± 2,31 ^{cd}	33,58 ± 0,85 ^{cd}	17,6 ± 3,36 ^b	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	24,27 ± 1,41 ^a	5,34 ± 1,45 ^a	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
	SWE 200 °C	54,59 ± 1,18 ^{de}	60,48 ± 1,22 ^h	55,02 ± 2,20 ^f	30,21 ± 2,52 ^{cd}	22,23 ± 0,84 ^b	0,00 ± 0,00	57,77 ± 1,36 ^f	46,6 ± 2,91 ^c	33,49 ± 0,86 ^{bc}	27,52 ± 0,63 ^d	6,31 ± 0,69 ^b	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
	SWE 120 °C	44,51 ± 0,12 ^b	34,84 ± 0,42 ^{cd}	19,28 ± 1,16 ^b	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	45,63 ± 2,76 ^c	35,92 ± 0,94 ^{cd}	21,36 ± 1,15 ^a	3,88 ± 2,91 ^a	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
IM	MW 96% EtOH	52,92 ± 2,52 ^{cd}	42,83 ± 0,34 ^c	13,39 ± 4,20 ^b	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	47,09 ± 1,45 ^{cd}	36,41 ± 1,35 ^{cd}	21,84 ± 0,49 ^a	11,65 ± 0,97 ^{bc}	1,84 ± 0,66 ^a	0,00 ± 0,00	
	MW 50% EtOH	57,96 ± 1,03 ^{ef}	56,29 ± 1,09 ^g	53,71 ± 3,32 ^f	46,19 ± 1,68 ^c	22,64 ± 0,63 ^b	0,00 ± 0,00	51,46 ± 0,97 ^d	49,51 ± 0,97 ^c	46,55 ± 2,83 ^{de}	37,86 ± 1,57 ^f	30,09 ± 1,29 ^d	7,52 ± 0,63 ^c	
	MW water	27,69 ± 0,84 ^a	16,34 ± 2,16 ^a	5,54 ± 1,13 ^a	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	16,99 ± 1,46 ^a	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
	VAE 96% EtOH	52,16 ± 0,42 ^{cd}	49,55 ± 2,52 ^f	27,69 ± 2,74 ^e	10,45 ± 2,10 ^a	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	48,06 ± 0,49 ^{de}	39,32 ± 1,27 ^d	22,82 ± 3,19 ^a	10,92 ± 1,69 ^b	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	
	VAE 50% EtOH	62,16 ± 1,46 ^g	54,18 ± 1,26 ^{fg}	38,62 ± 0,08 ^d	27,61 ± 2,43 ^{bc}	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	45,63 ± 0,97 ^c	34,95 ± 0,08 ^{bc}	26,21 ± 0,73 ^{ab}	15,05 ± 0,49 ^c	1,94 ± 1,73 ^a	0,00 ± 0,00	
	VAE water	57,54 ± 0,74 ^{ef}	36,09 ± 0,98 ^d	16,34 ± 1,26 ^b	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	33,88 ± 3,09 ^b	5,83 ± 1,07 ^a	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
	SWE 200 °C	48,71 ± 2,04 ^{bc}	56,28 ± 1,68 ^g	46,61 ± 2,10 ^e	21,47 ± 0,66 ^b	22,65 ± 1,26 ^b	0,00 ± 0,00	51,94 ± 1,14 ^d	34,95 ± 1,29 ^{bc}	22,82 ± 2,42 ^a	10,68 ± 1,85 ^b	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
	SWE 120 °C	46,19 ± 2,52 ^b	39,04 ± 0,72 ^{de}	29,37 ± 1,68 ^c	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	34,95 ± 3,16 ^b	33,49 ± 0,56 ^b	25,24 ± 1,17 ^{ab}	8,25 ± 0,27 ^b	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	

¹Rezultati su izraženi kao % inhibicije prevencije adhezije u poređenju sa kontrolom (bakterija bez prisustva testiranih uzoraka)

²Različita slova u kolonama označavaju statistički različite vrednosti (p < 0.05)

Kao što je već naglašeno formiranje biofilma dovodi do upornih i ponavljajućih infekcija. Međutim, problem bakterijskih biofilma dobro je poznat u i prehrambenoj industriji i vezuje se za patogene bakterije koje se prenose putem hrane i koji mogu ozbiljno ugroziti zdravlje ljudi i izazvati velike ekonomske gubitke (Zhao i sar., 2016). Bakterijske ćelije zarobljene u biofilmu zaštićene su od različitih fizičkih i hemijskih uticaja, zreli biofilmi su 10 do 1000 puta otporniji na antibiotike u odnosu na planktonske ćelije (Ye i sar., 2017). Uklanjanje biofilma u prehrambenoj industriji izuzetno je teško i do danas je predloženo nekoliko pristupa za njihovu kontrolu i uklanjanje. Dezinfekcija i čišćenje površina koje su u kontaktu sa hranom pre nego što se razvije biofilm, uklanjanje zrelog biofilma fizičkim, hemijskim ili biološkim metodama, kao i prevencija disperzije kako bi se sprečilo formiranje drugog biofilma neki su od pristupa koje su predložili Zhao i sar., (2016). Fizički tretmani se koriste za eliminisanje početnog vezivanja bakterija za površine tako što ometaju formiranje biofilma (He i sar., 2012). Za uklanjanje zrelog biofilma pored mehaničkih sredstava neophodno je i korišćenje hemikalija, pošto se fizičkim tretmanom ne postižu najbolji rezultati uklanjanja biofilma, jer oko 76% biofilma ostaje na površinama (Zhao i sar., 2017). Treba uzeti u obzir da korišćena hemijska sredstva iako daju isplative rezultate mogu imati štetan uticaj na zdravlje ljudi i životnu sredinu. Pored fizičkih i hemijskih tretmana, nove i efikasne strategije podrazumevaju alternativne prirodne antimikrobne agense koji inhibiraju međućelijsku komunikaciju ili faktore virulencije odgovorne za formiranje biofilma. Sve više istraživanja usmereno je na pronalaženje prirodnih proizvoda koji mogu efikasno da kontrolišu formiranje biofilma ili faktore virulencije patogenih bakterija umesto da ih direktno ubijaju (Ahmad et al., 2014). Upotreba prirodnih proizvoda kao antibiofilmskih agenasa ima prednost u odnosu na poznate antibiotike zbog raznovrsnosti, cene, dostupnosti kao i ređih neželjenih efekata (Mishra i sar., 2021).

Mnoge prirodne supstance, uglavnom biljnog porekla, pokazale su antibakterijska i antibiofilmska svojstva *in vitro* (Fathi i sar., 2021; Pompilio i sar., 2023). Antibiofilmski efekti prirodnih proizvoda u velikoj meri su zasnovani na sprečavanju formiranja polimernog matriksa, ograničavanju adhezije i vezivanja ćelija kao i smanjenja sinteze faktora virulencije (Liu i sar., 2018). Među kopnenim ekosistemima šuma, pored biljaka, danas sve više pažnje privlači ogroman broj različitih gljiva koje su i dalje neistražene u ovoj oblasti a potencijalno mogu biti vredan resurs u potrazi za jedinjenjima/ekstraktima koji ima antibiofilmska svojstva. Polisaharidi, proteini, peptidi, terpenoidi i fenolna jedinjenja mogu biti odgovorna za antiadhezivni i antibiofilmski efekat gljiva (Klančnik i sar., 2017). Različiti autori su istakli da fenolne kiseline, poput galne, ferulne, vanilinske, kafeinske i hlorogene značajno doprinose antibiofilmskoj aktivnosti gljiva (Alves i sar., 2014). S obzirom da ekstrakti testirani u ovom radu poseduju fenolna jedinjenja, ovi molekuli bi mogli biti odgovorni za uočena antiadhezivna i antibiofilmska svojstva. Fenolna jedinjenja koja su detektovana u najaktivnijim ekstraktima – SWE a čiji prinos je bio najviši su: hlorogena, cimeta, p-kumarinska, protokatehinska, cimeta, kafeinska, kao i kvercetin 3-O glukozid i kempferol. Ranije su Jagani i sar., (2009) pokazali potencijal fenola (80,9%) i prirodnih fenolnih jedinjenja (taninska kiselina – 78,1%, epigalokatehin – 69,9%, katehin – 67,5%) da inhibiraju biofilm patogene bakterije *P. aeruginosa*. Luis i sar., (2013) su utvrdili da galna, kafeinska i hlorogena kiselina inhibiraju metabolizam bakterijskih ćelija u biofilmu, što dovodi do njegove razgradnje. Vunduk i sar., (2023) su testirali 20 različitih vrsta gljiva i 40 ekstrakata (alkalni i vodeni) na dva važna patogena iz hrane (*Listeria monocytogenes* i *Salmonella* Enteritidis). Pokazali su da su alkalni ekstrakti kod preko 90% uzoraka imali jaču antibiofilmsku aktivnost u koncentracionom rasponu od 0,312 – 0,625 mg/mL, dok su niže koncentracije bile najmanje efikasne.

U ovom istraživanju se pokazalo da iako testirani ekstrakti nisu pokazali značajno antibakterijsko dejstvo ipak su gotovo svi ispoljili antiadhezivni i antibiofilmski potencijal.

Ovi rezultati bili su slični istraživanju koje su sproveli Darmasiwi i sar., (2022), a u kome se pokazalo da etanolni ekstrakt gljive *Hericiium erinaceus* nije pokazao antibakterijsko dejstvo, ali jeste antibiofilmsku aktivnost prema *P. aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella Typhimurium* i *S. aureus*. Takođe, Shomali i sar., (2019) su pokazali izraženu antibiofilmsku aktivnost etanolnih ekstrakata *Marasmius oreades* protiv *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* i *S. epidermidis*. Ovo ukazuje da je aktivnost pri niskim koncentracijama često dozno – zavisna i da antibiofilmski efekat zavisi i od mehanizma delovanja.

Tabela 13. Efekat prevencije formiranja biofilma *P. aeruginosa* MMA83 i MRSA u prisustvu različitih ekstrakta *I. obliquus*

Uzorci	<i>P. aeruginosa</i> MMA83						MRSA						
	20	10	5	2,5	1,25	0,625	20	10	5	2,5	1,25	0,625	
IS	MW 96% EtOH	36,17 ± 0,85 ^c	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	54,64 ± 1,83 ^{bc}	51,49 ± 1,97 ^{cd}	44,78 ± 2,31 ^b	29,79 ± 2,36 ^{ab}	17,72 ± 1,28 ^{bc}	3,46 ± 1,46 ^{ab}
	MW 50% EtOH	45,11 ± 1,28 ^{dc}	44,68 ± 1,70 ^c	42,55 ± 1,28 ^d	38,64 ± 0,09 ^f	19,87 ± 0,43 ^e	0,00 ± 0,00	57,4 ± 3,94 ^{cd}	52,28 ± 2,07 ^{cd}	46,36 ± 1,23 ^{bc}	39,26 ± 1,73 ^{bcd}	28,61 ± 2,18 ^{dc}	12,48 ± 2,48 ^{bcd}
	MW water	52,34 ± 1,70 ^f	51,06 ± 0,43 ^d	51,91 ± 0,42 ^c	37,87 ± 0,01 ^f	17,87 ± 1,28 ^e	6,81 ± 1,28 ^a	60,16 ± 1,97 ^d	48,33 ± 0,39 ^b	45,57 ± 2,01 ^b	32,16 ± 1,07 ^b	21,91 ± 1,36 ^{bc}	7,1 ± 0,89 ^{abc}
	VAE 96% EtOH	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
	VAE 50% EtOH	52,77 ± 0,43 ^f	46,38 ± 1,07 ^c	42,13 ± 0,85 ^d	26,38 ± 2,13 ^d	12,77 ± 0,43 ^{cd}	0,00 ± 0,00	57,8 ± 2,54 ^{cd}	55,04 ± 2,37 ^{dc}	56,31 ± 0,36 ^{dc}	38,08 ± 1,33 ^{bcd}	23,64 ± 1,78 ^{cd}	20,05 ± 2,00 ^{dc}
	VAE water	48,09 ± 0,20 ^e	52,77 ± 0,51 ^d	57,45 ± 0,90 ^f	42,97 ± 0,85 ^g	36,59 ± 0,73 ^f	17,87 ± 1,28 ^c	53,06 ± 1,49 ^{bc}	59,38 ± 1,07 ^{dc}	56,61 ± 1,18 ^{dc}	45,57 ± 2,15 ^{cd}	25,06 ± 1,17 ^{cd}	19,93 ± 2,45 ^{dc}
	SWE 200 °C	60,85 ± 0,72 ^g	59,57 ± 1,28 ^c	52,77 ± 2,11 ^e	22,13 ± 0,43 ^c	13,53 ± 0,51 ^d	11,06 ± 2,13 ^b	64,11 ± 1,83 ^d	66,08 ± 0,78 ^g	59,77 ± 1,57 ^e	51,35 ± 1,57 ^e	55,43 ± 1,97 ^g	32,55 ± 0,39 ^f
	SWE 120 °C	55,32 ± 1,21 ^f	50,21 ± 0,42 ^d	54,47 ± 1,26 ^{ef}	27,63 ± 1,63 ^d	10,64 ± 0,85 ^{bc}	0,00 ± 0,00	64,50 ± 0,78 ^d	64,89 ± 1,07 ^{ef}	58,19 ± 0,78 ^{dc}	49,36 ± 0,15 ^{dc}	42,81 ± 0,39 ^{fg}	34,13 ± 1,21 ^f
IM	MW 96% EtOH	42,55 ± 1,28 ^d	35,32 ± 1,64 ^b	9,36 ± 2,13 ^a	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	49,51 ± 1,58 ^{ab}	38,47 ± 1,05 ^a	42,02 ± 2,03 ^a	19,46 ± 2,02 ^a	10,47 ± 0,33 ^{ab}	2,15 ± 3,74 ^{ab}
	MW 50% EtOH	26,81 ± 0,85 ^a	27,66 ± 2,55 ^a	10,64 ± 3,40 ^a	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	47,15 ± 2,36 ^a	36,89 ± 1,57 ^a	40,84 ± 1,26 ^a	34,92 ± 1,27 ^{bc}	22,91 ± 1,08 ^{bc}	16,38 ± 3,15 ^{cd}
	MW water	31,92 ± 0,84 ^b	28,94 ± 1,28 ^a	22,55 ± 0,85 ^b	20,00 ± 1,70 ^c	5,96 ± 0,86 ^a	0,00 ± 0,00	46,19 ± 1,36 ^a	37,15 ± 1,38 ^a	41,62 ± 0,88 ^a	36,89 ± 0,09 ^{bcd}	17,96 ± 1,44 ^{bc}	9,68 ± 1,68 ^{abcd}
	VAE 96% EtOH	36,59 ± 2,18 ^c	34,47 ± 0,71 ^b	26,38 ± 2,13 ^{bc}	8,09 ± 0,85 ^a	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
	VAE 50% EtOH	42,13 ± 0,85 ^d	34,04 ± 0,43 ^b	27,66 ± 0,83 ^c	6,64 ± 0,17 ^a	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	50,69 ± 0,86 ^{ab}	51,46 ± 0,78 ^c	46,75 ± 2,19 ^{bc}	30,58 ± 2,08 ^{ab}	35,71 ± 3,53 ^{def}	18,99 ± 2,25 ^{cd}
	VAE water	43,83 ± 0,83 ^d	46,38 ± 0,85 ^c	52,34 ± 0,28 ^c	16,17 ± 0,43 ^b	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	50,30 ± 1,12 ^{ab}	53,46 ± 1,50 ^c	45,18 ± 1,18 ^b	38,87 ± 0,86 ^{bcd}	28,61 ± 1,28 ^{dc}	13,66 ± 1,22 ^{bcd}
	SWE 200 °C	55,32 ± 1,28 ^f	52,17 ± 1,53 ^d	43,06 ± 1,61 ^d	33,62 ± 0,64 ^e	14,04 ± 1,70 ^d	0,00 ± 0,00	64,50 ± 1,22 ^d	66,08 ± 0,03 ^g	64,5 ± 0,03 ^e	48,33 ± 1,18 ^d	44,78 ± 3,92 ^{fg}	32,55 ± 1,18 ^f
	SWE 120 °C	35,32 ± 0,85 ^c	29,79 ± 0,43 ^a	30,21 ± 1,70 ^c	16,59 ± 0,26 ^b	8,94 ± 0,72 ^b	0,00 ± 0,00	62,14 ± 0,09 ^d	58,19 ± 1,19 ^{ef}	49,12 ± 1,18 ^{cd}	44,78 ± 0,05 ^{cd}	40,05 ± 1,57 ^{ef}	30,58 ± 0,36 ^{ef}

¹Rezultati su izraženi kao % inhibicije prevencije formiranja biofilma u poređenju sa kontrolom (bakterija bez prisustva testiranih uzoraka)

²Različita slova u kolonama označavaju statistički različite vrednosti (p < 0.05)

Tabela 14. Efekat prevencije formiranja biofilma kliničkog izolata *E. faecalis* i ATCC soja *E. faecalis* u prisustvu različitih ekstrakta *I. obliquus*

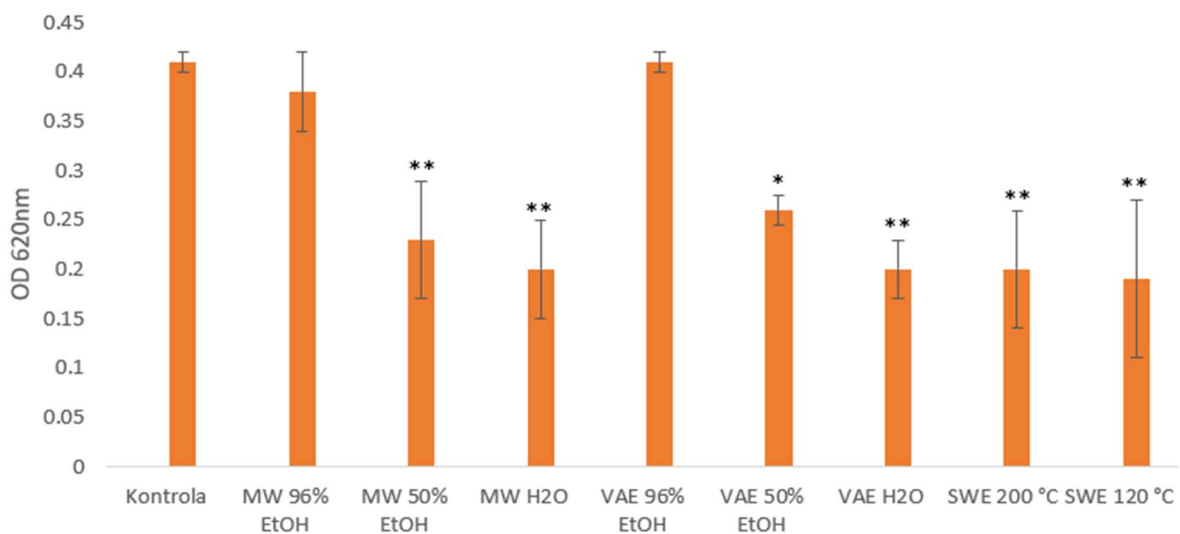
Uzorci	<i>E. faecalis</i> klinički izolat						<i>E. faecalis</i> ATCC 29212						
	20	10	5	2,5	1,25	0,625	20	10	5	2,5	1,25	0,625	
IS	MW 96% EtOH	51,04 ± 1,04 ^g	38,02 ± 0,52 ^{ef}	30,73 ± 1,56 ^g	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	58,46 ± 1,20 ^f	45,61 ± 1,28 ^j	36,61 ± 2,56 ^{gh}	21,62 ± 1,28 ^d	6,83 ± 0,69 ^b	0,00 ± 0,00
	MW 50% EtOH	40,1 ± 1,56 ^{de}	26,56 ± 2,85 ^c	11,98 ± 2,67 ^{cd}	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	59,31 ± 1,28 ^f	43,46 ± 0,86 ^{ij}	25,43 ± 2,52 ^f	14,77 ± 2,14 ^c	10,83 ± 1,62 ^c	0,00 ± 0,00
	MW water	32,09 ± 1,08 ^a	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	37,04 ± 2,99 ^{bc}	9,20 ± 1,71 ^b	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
	VAE 96% EtOH	42,71 ± 2,08 ^c	39,02 ± 0,46 ^{ef}	16,15 ± 0,52 ^{de}	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	47,75 ± 1,71 ^c	31,04 ± 2,14 ^{ef}	19,05 ± 2,99 ^{de}	13,06 ± 2,07 ^{bc}	8,99 ± 1,07 ^{bc}	0,00 ± 0,00
	VAE 50% EtOH	43,23 ± 2,60 ^c	44,27 ± 2,60 ^f	26,04 ± 2,16 ^{fg}	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	49,03 ± 0,42 ^c	40,89 ± 3,42 ^{hi}	32,76 ± 1,88 ^g	14,79 ± 0,42 ^c	10,49 ± 1,28 ^c	0,00 ± 0,00
	VAE water	35,42 ± 3,12 ^{bcd}	25,52 ± 3,64 ^{bc}	21,88 ± 2,08 ^{ef}	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	45,18 ± 1,71 ^{de}	36,61 ± 2,56 ^g	25,48 ± 2,56 ^f	8,77 ± 3,75 ^b	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
	SWE 200 °C	50,52 ± 1,35 ^f	44,27 ± 2,43 ^f	42,7 ± 1,15 ^h	9,32 ± 0,98	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	46,35 ± 0,52 ^c	38,54 ± 1,04 ^h	22,91 ± 0,04 ^{ef}	2,60 ± 0,52 ^a	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
	SWE 120 °C	37,50 ± 0,90 ^{cde}	20,01 ± 0,05 ^{ab}	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	40,10 ± 1,56 ^{cd}	27,6 ± 1,56 ^{de}	17,18 ± 2,08 ^{cd}	1,04 ± 3,12 ^a	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
IM	MW 96% EtOH	33,33 ± 2,37 ^{ab}	18,75 ± 2,08 ^a	23,44 ± 3,68 ^{fg}	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	49,47 ± 2,60 ^c	32,81 ± 0,52 ^{ef}	24,47 ± 1,56 ^f	10,41 ± 2,16 ^{bc}	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
	MW 50% EtOH	42,19 ± 1,68 ^{de}	32,29 ± 3,13 ^{de}	21,88 ± 3,11 ^{ef}	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	47,91 ± 1,04 ^c	45,83 ± 1,04 ^j	42,65 ± 2,11 ^h	33,33 ± 2,08 ^c	25,03 ± 1,04 ^d	0,00 ± 0,00
	MW water	27,08 ± 3,02 ^a	17,19 ± 2,60 ^a	2,08 ± 1,09 ^a	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	20,83 ± 1,08 ^a	2,60 ± 1,56 ^a	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	11,19 ± 1,09 ^a
	VAE 96% EtOH	43,75 ± 1,98 ^{ef}	29,17 ± 1,04 ^{cd}	8,33 ± 1,04 ^{bc}	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	32,81 ± 1,56 ^b	23,38 ± 3,59 ^{cd}	10,93 ± 1,12 ^{ab}	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
	VAE 50% EtOH	34,38 ± 1,71 ^{bc}	22,92 ± 0,97 ^{bc}	13,54 ± 3,12 ^{cd}	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	31,77 ± 3,64 ^b	32,81 ± 0,52 ^{ef}	21,35 ± 0,52 ^{ef}	14,06 ± 0,42 ^{bc}	0,52 ± 0,02 ^a	0,00 ± 0,00
	VAE water	33,85 ± 2,87 ^{abc}	19,79 ± 1,33 ^{ab}	7,24 ± 2,13 ^b	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	33,85 ± 2,21 ^b	19,79 ± 1,04 ^c	7,29 ± 2,17 ^a	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
	SWE 200 °C	40,63 ± 0,88 ^{de}	43,23 ± 0,62 ^f	30,1 ± 2,60 ^g	10,94 ± 1,56	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	45,83 ± 1,25 ^{de}	25,02 ± 1,03 ^{cd}	9,89 ± 1,65 ^a	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
	SWE 120 °C	37,19 ± 0,56 ^{cde}	18,75 ± 1,42 ^{ab}	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	35,41 ± 1,19 ^{bc}	27,08 ± 1,29 ^{de}	14,58 ± 1,04 ^{bc}	1,04 ± 2,12 ^a	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00

¹Rezultati su izraženi kao % inhibicije prevencije formiranja biofilma u poređenju sa kontrolom (bakterija bez prisustva testiranih uzoraka)

²Različita slova u kolonama označavaju statistički različite vrednosti ($p < 0.05$)

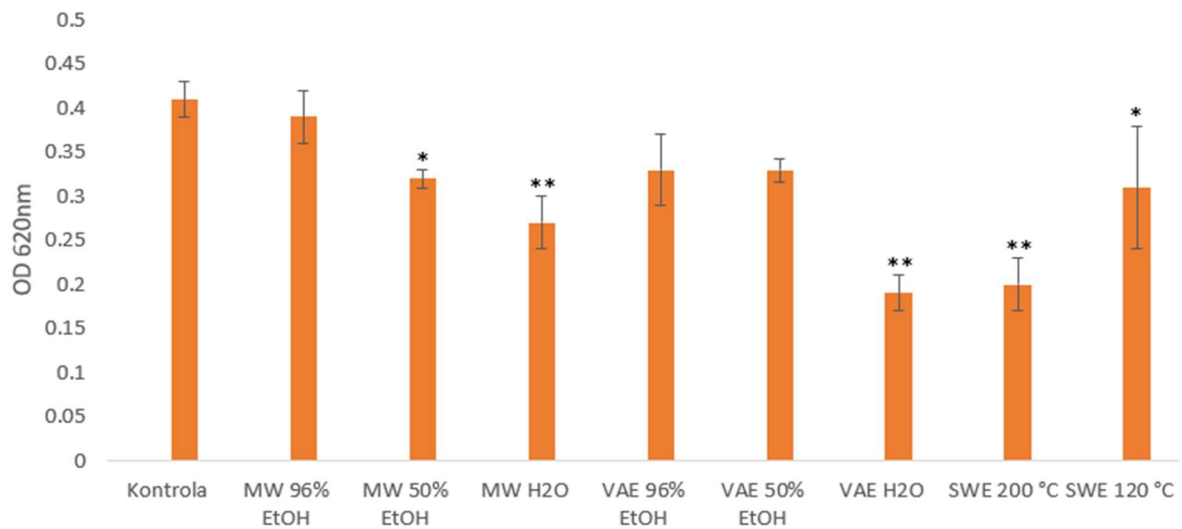
5.3.5. Uticaj ekstrakata čage na produkciju ekstraćelijskih polimernih supstanci (EPS)

Kako je matriks biofilma sačinjen od polimernih materija koje se izlučuju iz ćelija u manjoj ili većoj meri shodno uslovima životne sredine, vršena je kvantifikacija EPS u prisustvu odabranih ekstrakata *I. obliquus*. Kao što se može uočiti sa Slika 26 i 27, većina ekstrakata korišćenih u ovom radu ispoljila je antibiofilmsko dejstvo (što je potvrđeno i bojenjem kristal violetom) odnosno uticala je na smanjenje produkcije EPS. To se manifestovalo snižavanjem OD vrednosti. Efekat je bio sličan za uzorke IS MW H₂O, VAE H₂O, SWE 200 °C i SWE 120 °C, bez statistički značajne razlike. U odnosu na kontrolu, navedeni ekstrakti su smanjili produkciju EPS za oko 40-50%. Mongolska Čaga je bila nešto manje efikasna, odnosno manji broj uzoraka je pokazao sličan procenat inhibicije produkcije EPS; VAE H₂O i SWE 200 °C, dok je uzorak MW H₂O smanjio EPS za oko 35%. Kako je EPS odgovoran i za adheziju kolonija za određenu površinu, te interakciju među ćelijama i rast kolonija, sposobnost *I. obliquus* da inhibira produkciju EPS od značaja je za medicinu i industriju (Deng i sar., 2017). Ipak, ni jedan od testiranih uzoraka nije uspeo da u potpunosti spreči sekreciju EPS što je u salgasnosti sa rezultatima kvantifikacije biofilma kristal violetom. Osim toga, u ovom slučaju testirana je samo jedna koncentracija, koja se nije pokazala adekvatnom. Rezultati ove metode pokazuju da je jedan od načina prevencije formiranja biofilma uticaj na smanjenje produkcije i sekrecije EPS te time i vezivanja za kontaktnu površinu. Ovim se ponovo potvrđuje da ekstrakti gljiva prvenstveno mogu biti preventivni agensi.



Slika 26. Efekat ekstrakata srpske *I. obliquus* na produkciju ekstraćelijskih polimernih supstanci matriksa biofilma *P. aeruginosa* MMA83

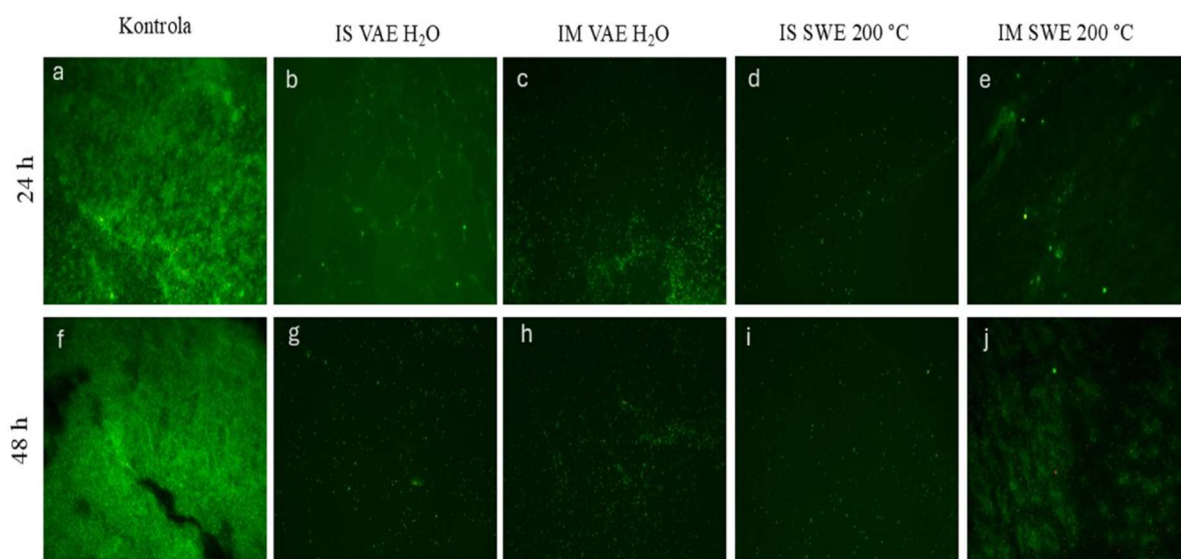
Rezultati su izraženi kao srednja vrednost za tri ponavljanja \pm standardna devijacija. Statistička značajnost u odnosu na kontrolu analizirana je pomoću one-way ANOVA, primenom Tukey-ovog testa (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$).



Slika 27. Efekat ekstrakata mongolske *I. obliquus* na produkciju ekstraćelijskih polimernih supstanci matriksa biofilma *P. aeruginosa* MMA83
 Rezultati su izraženi kao srednja vrednost za tri ponavljanja \pm standardna devijacija.
 Statistička značajnost u odnosu na kontrolu analizirana je pomoću one-way ANOVA,
 primenom Tukey-ovog testa (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$).

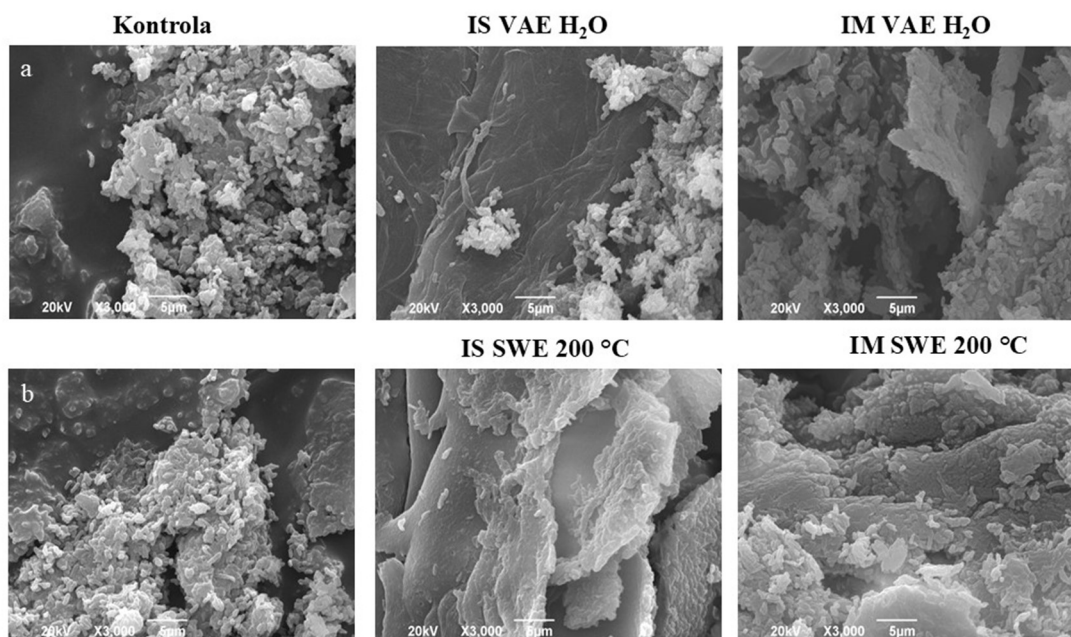
5.3.6. Fluorescentna i skenirajuća elektronska mikroskopija (SEM) biofilmova tretiranih odabranim ekstraktima gljive *I. obliquus*

Fluorescentna mikroskopija korišćena je kako bi se vizualizovao uticaj (IS MW H₂O, IS VAE H₂O, IM MW H₂O, IM VAE H₂O, IS SWE 200 °C, IS SWE 120 °C, IM SWE 120 °C, IM SWE 200 °C) ekstrakta kako na formiranje biofilma tako i na dekompoziciju formiranog biofilma kliničkog izolata *P. aeruginosa* MMA83. Na Slici 28 su prikazane mikrografije ekstrakata koji su ispoljili značajan efekat, dok su ostale mikrografije sa nešto slabijim efektom delovanja na formiranje i dekompoziciju biofilma predstavljene u Prilogu 7.



Slika 28. Vizualizacija biofilma fluorescentnom mikroskopijom. Uticaj IS VAE H₂O, IM VAE H₂O, IS SWE 200 °C, IM SWE 200 °C ekstrakata na formiranje (b, c, d, e) i dekompoziciju formiranog biofilma (g, h, i, j). *P. aeruginosa* MMA83 klinički izolat inkubiran je 24 h sa 5 mg/mL analiziranih ekstrakata u cilju vizualizacije njegovog efekta na formiranje biofilma (b, c, d, e). Uticaj ekstrakata na dekompoziciju 24 h starog formiranog biofilma praćen je nakon 24 h tretmana ekstraktima (g, h, i, j). Fluorescentne mikrografije netretiranih biofilmova *P. aeruginosa* MMA83 starih 24 h (a) i 48 h (f) (uz dodatak DMSO 0,5% v/v) na pokrovnim staklima. Fluorescentne boje SYTO9 (zeleni) i PI (crveni) su korišćene za bojenje biofilma.

Na mikrografijama se može uočiti da *P. aeruginosa* MMA83 formira kompaktni, gust biofilm u odsustvu ekstrakata *I. obliquus* i nakon 24 i 48 h (kontrola a i f, Slika 28). U prisustvu ekstrakta može se primetiti slaba pokrivenost površine pokrovnog stakla biofilmom i smanjen broj bakterijskih ćelija, posebno na mikrografijama c, d i e što ukazuje da su se bakterijske ćelije *P. aeruginosa* MMA83 minimalno vezale za površinu kada su tretirane sa 5 mg/mL odabranih ekstrakata i inkubirane 24h. Nešto slabija destrukcija uočena je na mikrografiji b. Na mikrografijama g, h, i, j se uočava da su testirani ekstrakti imali uticaj i na dekompoziciju biofilma (48 h). Zapaža se manja količina biofilma na staklu što ukazuje da ovi ekstrakti u značajnoj meri mogu da razore biofilm iako to nije dokazano kada je merena ukupna biomasa biofilma nakon bojenja kristal violetom.



Slika 29. Vizualizacija biofilma skenirajućom elektronskom mikroskopijom. Uticaj IS VAE H₂O, IM VAE H₂O, IS SWE 200 °C, IM SWE 200 °C ekstrakata na formiranje biofilma *P. aeruginosa* MMA83. SEM mikrografije netretiranih biofilmova (a i b) *P. aeruginosa* MMA83 (uveličanje x3000).

Primenom SEM mikroskopije analizirana je morfologija biofilma kliničkog izolata *P. aeruginosa* MMA83, tretiranog odabranim ekstraktima koncentracije 5 mg/mL. Na Slici 29 izdvojene su 4 mikrografije sa kojih se vidi da je došlo do narušavanja strukture biofilma, dok su u Prilogu prikazane ostale na kojima se ne uočavaju značajne promena u strukturi biofilma. Na dobijenim mikrografijama može se uočiti da su ekstrakti IS VAE H₂O i IS SWE IM 200 °C doveli do značajne destrukcije biofilma. Može se zapaziti manja gustina, neravnomerno raspoređene strukture, pri čemu površina izgleda kao da je došlo do ljušćenja matriksa. I dalje postoji slojevitost, no sitne strukture su se izgubile a preostale su pločaste sa manjim ispupčenjima. Ekstrakti IM VAE H₂O i IM SWE 200 °C su takođe ispoljili efekat, ali u slabijoj meri. Morfologija matriksa je izmenjena u odnosu na kontrolne uzorke uz postojanje brazda i pukotina. Na osnovu mikrografija može se spekulirati i da su ekstrakti ispoljili različit uticaj, tj. da su IS VAE H₂O i IS SWE 200 °C delovali ravnomerno površinski kao špatula koja skida sloj biofilma, dok su IM VAE H₂O i IM SWE 200 °C narušili biofilm topikalno, delujući tačkasto-koncentrisano. Tako su u matriksu nastale brazde i pukotine.

5.3.7. Molekularna analiza

Za transkripcionu analizu uzet je model sistem *P. aeruginosa* MMA83 i praćen je uticaj odabranih ekstrakata gljive *I. obliquus* (IS MW H₂O, IS VAE H₂O, IM MW H₂O, IM VAE H₂O, IS SWE 200 °C, IS SWE 120 °C, IM SWE 120 °C, IM SWE 200 °C) na ekspresiju gena uključenih u QS sistem *P. aeruginosa* MMA83, kao i ekspresiju odgovarajućih faktora virulencije. Za RT-qPCR analizu korišćeni geni su deo tri QS mreže *P. aeruginosa* (*las* - *lasI*, *lasR*; *rhl* - *rhlI*, *rhlR*; *pqs* - *pqsA*, *pqsH*, *mvfR*) i geni odgovorni za virulenciju (*lasB*, *algK*, *phzM*, *pvdS*, *rhlC*). Dobijeni rezultati su prikazani na Slici 30 i može se uočiti da efekti na analizirane gene variraju u odnosu na način dobijanja testiranog ekstrakta. Ekstrakti IS VAE

H₂O, IM VAE H₂O, IS SWE 200 °C, IS SWE 120 °C i IM SWE 120 °C doprineli su smanjenju ekspresije gena *lasI*, dok su svi testirani ekstrakti doprineli značajnom smanjenju (**p < 0,001) ekspresiji *rhlI* gena, uloga ovih gena je da kodiraju sinteze autoinducera. Značajno smanjenje ekspresije *lasI* (2,9 puta) i *rhlI* (4,8 puta) gena uočeno je za ekstrakt dobijen pomoću ultrazvuka poreklom iz Mongolije u odnosu na netretiranu kontrolu. Što se tiče ekspresije transkripcionih regulatora *lasR* i *rhlR* do smanjenja je došlo kod VAE i SWE (120 i 200 °C) ekstrakata, jedino je ekspresija ostala nepromenjena za *lasR* gen (ekstrakt IM SWE 200 °C). Kada je reč o ekspresiji *pqsA*, ekstrakt IM SWE 120 °C se pokazao kao najefikasniji, nivo transkripcije je smanjen 2,9 puta u poređenju sa netretiranom kontrolom. Dok je za gene *pqsH* i *mvfR* najznačajni novo smanjenja ekspresije (2,7 i 3,5 puta, navedenim redom) utvrđen za ekstrakt IM VAE H₂O.

Rezultati su pokazali da tretman *P. aeruginosa* MMA83 odabranim ekstraktima utiče na smanjenje relativnog nivoa mRNK gena odgovornih za virulenciju, odnosno uključenih u proizvodnju elastaza (*lasB*), alginata (*algK*), piocijanina (*phzM*), pioverdina (*pvdS*) i ramnolipida (*rhlC*) (Slika 30). Najizražanije snižavanje nivoa ekspresije primećeno je za gen *rhlC* kod svih testiranih ekstrakta, posebno se izdvaja IM VAE H₂O ekstrakt čiji je nivo ekspresije u odnosu na netretiran uзорak bio manji 16,6 puta. Takođe, značajno smanjenje ekspresije gena odgovornog za sintezu piocijanina uočeno je kod većine analiziranih ekstrakata, sem za IM MW H₂O i IM SWE 200 °C koji povećavaju nivo ekspresije. Ekspresija *algK* gena nešto manje je bila redukovana u odnosu na netretiranu kontrolu. Relativna ekspresija *pvdS* gena povećana je samo pri tretmanu SWE ekstraktima dobijenim na temperaturi od 200 °C, dok su ostali ekstrakti doveli do smanjenja. Značajno smanjenje nivoa ekspresije gena koji kodiraju elastazu dokazano je za ekstrakte IS VAE H₂O, IM MW H₂O i IM VAE H₂O za 8,3, 6,6 i 14,3 puta u poređenju sa negativnom kontrolom. Generalno, MW H₂O ekstrakti ispoljili su najslabiji efekat na smanjenje ekspresije gena QS i produkcije faktora virulencije, dok su VAE H₂O i SWE 120 °C pokazali značajan efekat na smanjenje ekspresije ispitivanih gena.

Ekstrakcija	<i>lasI</i>	<i>lasR</i>	<i>rhlI</i>	<i>rhlR</i>	<i>pqsA</i>	<i>pqsH</i>	<i>mvfR</i>	<i>lasB</i>	<i>algK</i>	<i>phzM</i>	<i>pvdS</i>	<i>rhlC</i>
IS MW H ₂ O	1.85	1.36	0.53 ***	1.67	1.35	0.84 *	1.16	0.80 *	0.71 **	0.36 ***	0.24 ***	0.13 ***
IS VAE H ₂ O	0.62 ***	0.70 **	0.32 ***	0.73 **	0.57 ***	0.56 ***	0.59 **	0.12 ***	0.62 **	0.36 ***	0.80 *	0.11 ***
IM MW H ₂ O	1.04	1.94	0.60 ***	1.53	1.57	0.48 ***	1.33	0.15 ***	1.06	1.70	0.54 ***	0.72 **
IM VAE H ₂ O	0.35 ***	0.46 ***	0.21 ***	0.34 ***	0.45 ***	0.37 ***	0.29 ***	0.07 ***	0.39 ***	0.16 ***	0.52 ***	0.06 ***
IS SWE 200°C	0.47 ***	0.80 *	0.33 ***	0.54 ***	0.48 ***	0.70 **	0.89	0.30 ***	0.39 ***	0.50 ***	1.06	0.14 ***
IS SWE 120°C	0.74 **	0.42 ***	0.38 ***	0.72 **	0.53 ***	1.10	0.57 ***	0.90 *	0.90 *	0.59 ***	0.30 ***	0.26 ***
IM SWE 200°C	1.06	1.00	0.56 ***	0.67 ***	0.77 *	1.28	0.83 *	0.54 ***	1.10	1.57	1.28	0.42 ***
IM SWE 120°C	0.49 ***	0.63 ***	0.24 ***	0.35 ***	0.35 ***	0.95	0.55 ***	0.42 ***	0.82 **	0.34 ***	0.34 ***	0.10 ***

Increased expression
 Control
 Decreased expression

Slika 30. RT-qPCR analiza korišćena je za ispitivanje promene nivoa ekspresije gena nakon tretmana *P. aeruginosa* MMA83 odabranim ekstraktima gljive *I. obliquus* u poređenju sa netretiranim MMA83. Ispitivani geni u ovom istraživanju deo su tri QS mreže *P. aeruginosa* *las*, *rhl* i *pqs* (*las* - *lasI*, *lasR*; *rhl* - *rhlI*, *rhlR*; *pqs* - *pqsA*, *mvfR*) i geni koji su odgovorni za virulenciju (*lasB*, *algK*, *phzM*, *pvdS*, *rhlC*). Studentov t-test je korišćen da se proceni da li postoje značajne razlike između tretirane i kontrolne grupe (*p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001)

Infekcije koje izaziva *P. aeruginosa* često predstavljaju poteškoće prilikom lečenja i veoma lako mogu preći u hronične. Oportunistički patogen *P. aeruginosa* otežava lečenje infekcija

zahvaljujući svojoj metaboličkoj prilagodljivosti, mogućnosti da proizvodi nekoliko faktora virulencije i da formira biofilm (Laborda i sar., 2021; Jurado-Mart i Sainz-Mejias, 2021). Formiranje biofilma i sinteza faktora virulencije doprinose lakšem širenju infekcija, slabijem prodiru antibiotika u biofilmove i širenju gena odgovornih za rezistenciju na antibiotike između bakterija unutar biofilma (Tuon i sar., 2022). Produkcija biofilma i sinteza faktora virulencije regulisana je pomoću QS sistema. QS omogućava međucelijsku komunikaciju bakterija i prilagođavanje promjenama životne sredine, reguliše ekspresiju velikog broja gena odgovornih za adheziju i formiranje biofilma kod *P. aeruginosa* (Sousa i sar., 2021). Prekomerna upotreba antibiotika, razvoj antimikrobne rezistencije, nemogućnost lečenja bakterijskih infekcija kao i negativan uticaj antibiotika na životnu sredinu zahtevaju otkrivanje inovativnih pristupa za iskorenjivanje ovih problema (Mahtab i sar., 2021; Theuretzbacher i sar., 2020). Sve više istraživanja uključuje nove tretmane molekulima koji inhibiraju QS. Molekuli koji inhibiraju QS funkcionišu uglavnom tako što ometaju ili inhibiraju međucelijsku komunikaciju bakterija (QSI) i smanjuju produkciju faktora virulencije (Das i sar., 2020). Ovaj pristup je imao obećavajuće rezultate kod inhibicije rasta i narušavanja biofilma *P. aeruginosa*, odnosno smanjenja bakterijske patogeneze (Welsh i sar., 2014; Kalia, 2013). Posebno je *P. aeruginosa* prepoznat kao idealan organizam za otkrivanje lekova protiv virulencije koji su fokusirani na inhibiciju QS (Lu i sar., 2022). Brojna istraživanja su pokazala da inhibitori QS mogu da sintetišu različite vrste ogranizama, bakterije, alge, biljke ili gljive (Zhao i sar., 2019). Primer za to su QSI molekuli poreklom iz morske alge *Delissia pulchra* koji inhibiraju regulatorne gene odgovorne za proizvodnju elastaza, ramnolipida i piocijanina (Kalia, 2013; Welsh i sar., 2014). U ovom istraživanju različito dobijeni ekstrakti gljive *I. obliquus* inhibirali su ekspresiju tri QS mreže *las*, *rhl* i *pqs* i gena odgovornih za virulenciju. Smanjenje ekspresije ovih gena može biti posledica prisustva fenolnih jedinjenja i flavonoida u ekstraktima, imajući u vidu da su još od ranije ova jedinjenja poznata po svojoj anti-QS aktivnosti. Pokazano je da flavonoidi, naringenin i kvercetin, značajno smanjuju proizvodnju piocijanina i snižavaju ekspresiju nekoliko QS gena (*lasR*, *lasI*, *lasA*, *lasB*, *rhlA*, *rhlI*, *rhlR*, *phzA1*) (Tchachedre i sar., 2019). U jednom od istraživanja pokazano je da rutin i galna kiselina ekstrahovani iz jablanovače (*Agrocybe aegerita*) inhibiraju faktore virulencije soja *P. aeruginosa* PAO1 kao što su piocijanin, pioverdin i receptora za detekciju QS (Bains i sar., 2023).

Na osnovu rezultata može se zaključiti da potencijal ekstrakata medicinske gljive *I. obliquus* i jedinjenja kojima je bogata daje mogućnost za razvoj novih terapijskih agenasa protiv patogena otpornih na lekove. Neophodna su dalja istraživanja kako bi se istražio potencijal gljive i optimizovalo njeno korišćenje.

5.3.8. Citotoksična aktivnost odabranih ekstrakata gljive *I. obliquus*

Citotoksična aktivnost ekstrakta dobijenih subkritičnom vodenom ekstrakcijom ispitana je primenom MTT testa na odabranim ćelijskim linijama: fetalnim fibroblastima pluća čoveka (MRC-5), melanocitama (Hs 294T) i ćelijama kolorektalnog adenokarcinoma (SW 620).

Nakon tretmana IS i IM SWE ekstraktima dobijenih na temperaturi od 200 °C preživljavanje MRC-5 ćelija bilo je preko 80% do koncentracije od 1,25 mg/mL, sa povećanjem koncentracije ekstrakata došlo je do povećanja citotoksičnog potencijala. Tako je pri najvišoj testiranoj koncentraciji došlo do smanjenja vijabilnosti ćelija za oko 70%. Sa druge strane, preživljavanje MRC-5 ćelija nakon tretmana IS i IM SWE ekstraktima koji su dobijeni na temperaturi od 120 °C je bilo preko 80% do koncentracije od 2,5 mg/ml, međutim na testiranim koncentracijama (5 i 10 mg/mL) došlo je do značajnog smanjenja procenta preživljavanja (Slika 31). Što se tiče citotoksične aktivnosti SWE ekstrakata na Hs 297T ćelijskoj liniji kancera svi testirani ekstrakti sem IS SWE 200 °C, pokazali su značajan

procenat smanjenja preživljavanja ćelija (Slika 32). Dozno-zavisni inhibitorski potencijal pri koncentracionom rangu od 10 do 0,3125 mg/mL utvrđen je kod ekstrakata IS SWE 120 °C (46,4 - 98%), IM SWE 200 °C (35,1 – 92,6%) i IM SWE 120 °C (31,7 – 84,3%). Ekstrakt poreklom od Srpske Čage dobijen na temperaturi od 200 °C doveo je do značajne redukcije preživljavanja ćelija pri najvišim testiranim koncentracijama 5 i 10 mg/mL i inhibitorski potencijal je iznosio 58,4% odnosno 38,5%. Kod nižih testiranih koncentracije ovog ekstrakta vijabilnost Hs 297T ćelija bila je preko 90%. Kada su u pitanju ćelije kolorektalnog adenocarcinoma (SW 620), SWE ekstrakti pokazali su citotoksičnu aktivnost samo na testiranim koncentracijama od 5 i 10 mg/mL (Slika 33). Vijabilnost SW 620 ćelija nakon tretmana SWE ekstraktima pri ovim koncentracijama smanjena je za oko 60%, dok se pri nižim testiranim koncentracijama preživljavanje ovih kancerskih ćelija kretalo preko 80%.

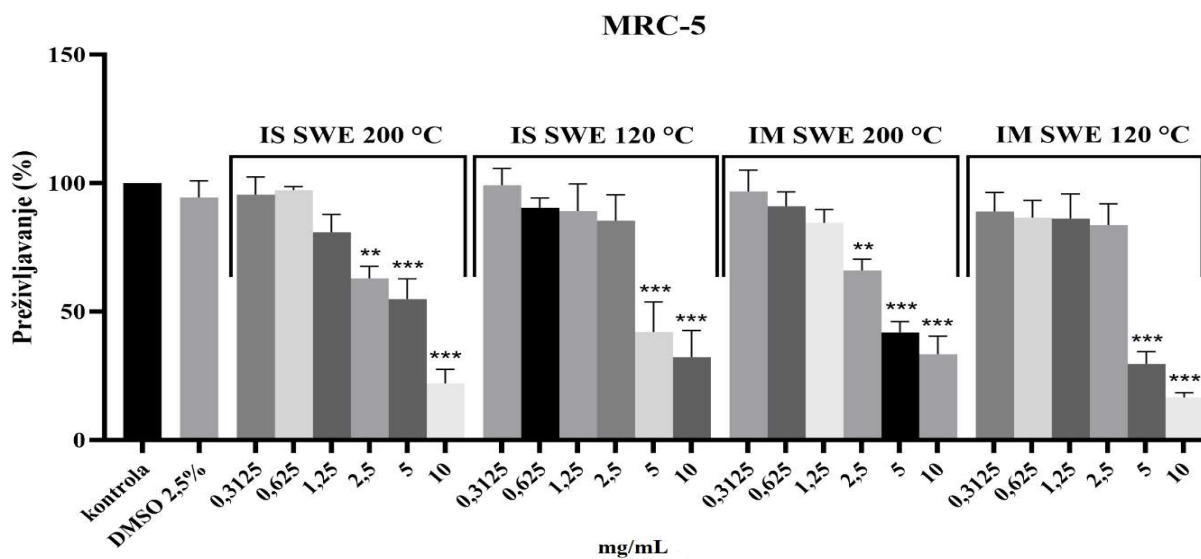
Takođe, u ovom istraživanju smo uporedili citotoksičnu aktivnost testiranih ćelija karcinoma (Hs 294T i SWE 620) i neizmenjenih ćelija MRC-5. U skladu sa činjenicom da indeks selektivnosti ($SI > 3$) ukazuje na značajan antitumorski potencijal, nijedan od testiranih ekstrakata nije pokazao ovaj potencijal. Kako je citotoksičnost uočena prilikom testiranja svih ekstrakata na neizmenjenim ćelijama fibroblasta pluća to može biti razlog loše selektivnosti.

Tabela 15. Citotoksičnost subkritičnih vodenih ekstrakata gljive *I. obliquus*

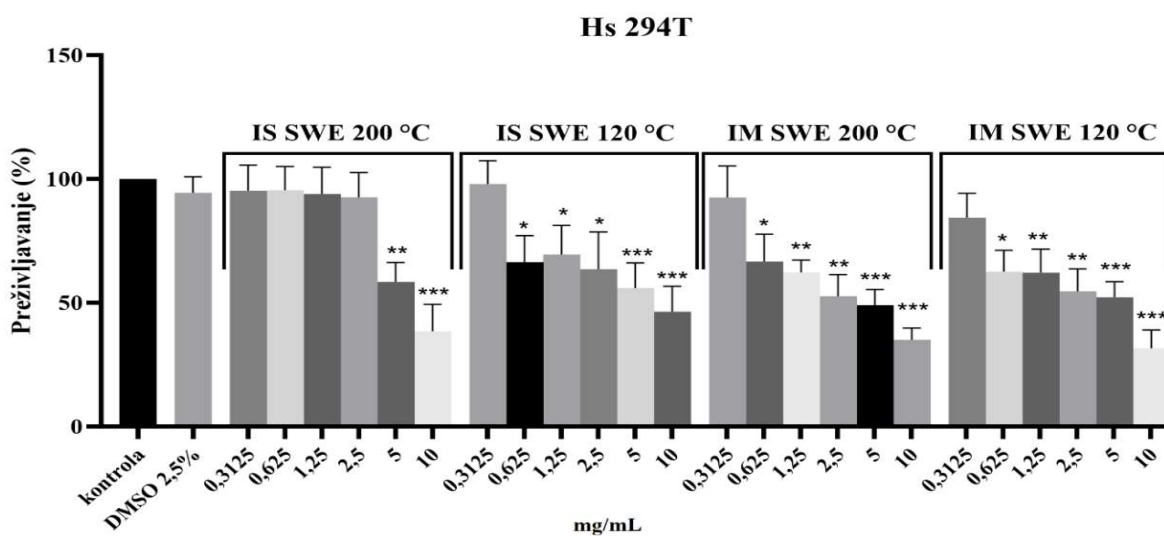
Ekstrakti	IC ₅₀ (mg/mL)		SI citotoksični efekat/IC ₅₀	IC ₅₀ (mg/mL)		SI citotoksični efekat/IC ₅₀
	MRC-5	Hs 294T		MRC-5	SW 620	
IS SWE 200 °C	5.74	7.11	0.81	5.74	4.26	1.35
IS SWE 120 °C	4.54	8.1	0.56	4.54	4.44	1.02
IM SWE 200 °C	4.16	4.34	0.96	4.16	4.52	0.92
IM SWE 120 °C	4.06	5.53	0.73	4.06	4.29	0.95

IC₅₀ predstavlja efektivnu koncentraciju svakog ekstrakta pri kojoj je uništeno 50% testiranih ćelija

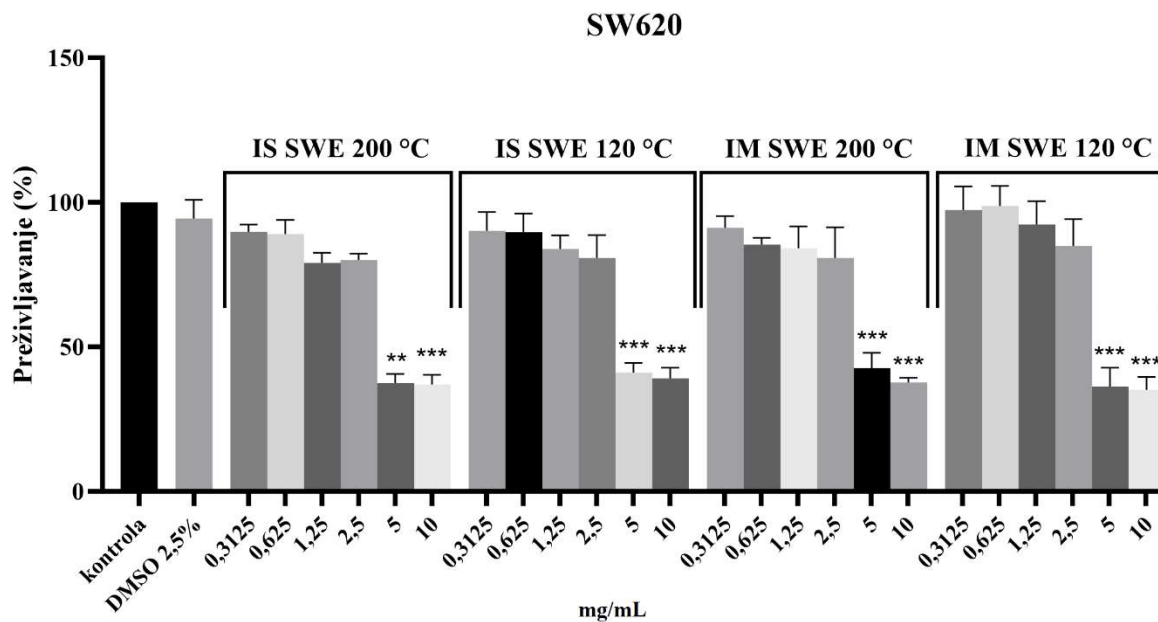
SI citotoksični efekat/IC₅₀ – indeks selektivnosti prema kancerogenim ćelijama



Slika 31. Citotoksična aktivnost subkritičnih vodenih ekstrakata gljive *I. obliquus* na MRC-5 ćelijama. Rezultati su izraženi kao srednja vrednost % preživljavanja sa tri ponavljanja ± standardna devijacija (n=3). Statistička značajnost analizirana je u odnosu na kontrolu rastvarača DMSO 2,5% pomoću one-way ANOVA, primenom Tukey-ovog testa (*p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001).



Slika 32. Citotoksična aktivnost subkritičnih vodenih ekstrakata gljive *I. obliquus* na Hs 294T ćelijama. Rezultati su izraženi kao srednja vrednost % preživljavanja sa tri ponavljanja ± standardna devijacija (n=3). Statistička značajnost analizirana je u odnosu na kontrolu rastvarača DMSO 2,5% pomoću one-way ANOVA, primenom Tukey-ovog testa (*p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001).



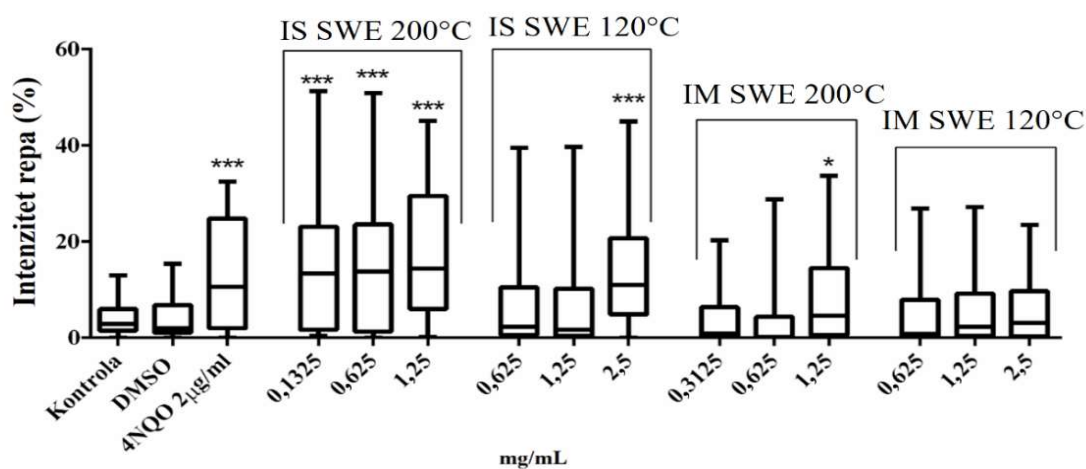
Slika 33. Citotoksična aktivnost subkritičnih vodenih ekstrakata gljive *I. obliquus* na SW 620 ćelijama. Rezultati su izraženi kao srednja vrednost % preživljavanja sa tri ponavljanja ± standardna devijacija (n=3). Statistička značajnost analizirana je u odnosu na kontrolu rastvarača DMSO 2,5% pomoću one-way ANOVA, primenom Tukey-ovog testa (*p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001).

Na globalnom nivou, karcinom je među vodećim uzročnicima smrti, 2012. godine zabeleženo je 8,2 miliona smrtnih slučajeva povezanih sa karcinomom. Predviđa se da će broj novih slučajeva povezanih sa ovim teškim oboljenjem porasti na 23,6 miliona do 2030. godine. Većina hemioterapeutika protiv humanih karcinoma koji se trenutno koriste mogu klinički zaustaviti napredovanje bolesti i inhibirati ili uništiti tumore, međutim štetne posledice ovih agenasa na zdrave ćelije i tkiva su glavni problem (Duru et al., 2019). Takođe, još jedan problem pri lečenju karcinoma je njegova rezistencija na dugotrajno lečenje dostupnim hemioterapeuticima (Costea et al., 2020). Ova neželjena dejstva dovode do potreba za ispitivanjem novih, efikasnih i bezbednih hemoterapeutskih agenasa koji su poreklom iz prirodnih jedinjenja. Medicinske gljive predstavljaju dobar izvor bioaktivnih molekula sa snažnim lekovitim svojstvima kao što su antioksidativna, antimutagena, imunomodulatorna ali i citotoksičnost prema ćelijama karcinoma (Paterson i Lima, 2014). Brojne studije su pokazale da fenolna jedinjenja koja potiču iz gljiva imaju sposobnost da inhibiraju proliferaciju matičnih ćelija raka, karcinoma dojke, pluća, prostate ili kolorektalnog karcinoma (Costea et al., 2020). U ovom istraživanju ispitivali smo biološku aktivnost gljive *I. obliquus* koja je bogata bioaktivnim jedinjenjima koja mogu da doprinosu antikancerogenim aktivnostima. Svrha istraživanja bila je procena antitumorske aktivnosti subkritičnih vodenih ekstrakata na ćelije kancera, melanocite (Hs 294T) i ćelije kolorektalnog adenokarcinoma (SW 620), kao i na neizmenjene ćelije humanih fetalnih fibroblasta (MRC-5) imajući u vidu neželjene efekte hemioterapija.

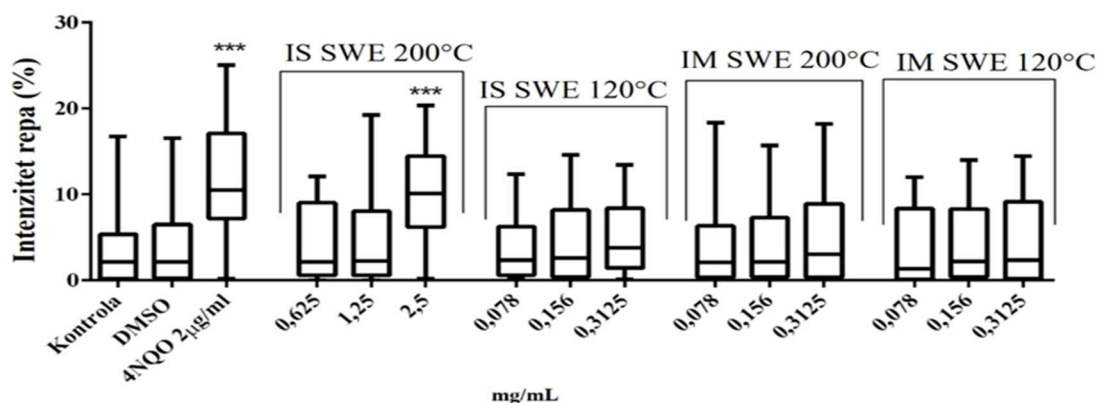
I. obliquus se smatra potencijalnim prirodnim lekom za prevenciju i lečenje karcinoma pošto se pokazalo da dugotrajna primena ekstrakata iz ove gljive ne izaziva nikakve neželjene toksične nuspojave (Vandermolen et al., 2017). U medicinskim bazama podataka postoji mnogo publikacija o antikancerogenoj aktivnosti ekstrakata *I. obliquus* ili supstanci izlovanih iz ove medicinske gljive na različitim ćelijskim linijama kancera. Većina istraživanja je sprovedena na ćeliskim linijama digestivnog sistema kao što su: HCT-116, HT-29, SW620, SGC-7901, DLD-1, CACO-2 i druge (Szychowski et al., 2018; Fan et al., 2012; Lee et al., 2015). Pokazalo se da ekstrakti iz *I. obliquus* inhibiraju proliferaciju i/ili su citotoksični za humane gastrointestinalne tumorske ćelijske linije. Takođe, pokazano je da ekstrakti *I. obliquus* nakon implementacije u miševu inhibiraju proliferaciju i razvoj dve tumorske linije: melanoma B16eF10 i sarkoma-180 (Youn et al., 2009). Pored toga što ekstrakti Čage mogu da se koriste kod melanoma, sve više se koriste kao zaštita od ultraljubičastog zračenja, protiv starenja i hiperpigmentacije kože (Softa et al., 2019). Trenutno postoje pretpostavke da je visok sadržaj polisaharida odgovoran za antikancerogeni potencijal Čage, ali nije dokazano da li inhibitorno deluju slobodni polisaharidi ili polisaharidi vezani za proteine (Jiang et al., 2020). U ovom istraživanju je pokazano da su subkritični vodeni ekstrakti bogati polisaharidima, posebno β glukanima. Kako većina polisaharida pripada grupi β -glukana proučavano je njihovo antitumorsko dejstvo. Glukani zahvaljujući β -1,3 glikozidnim vezama u glavnom lancu i β -1,6 vezama u bočnom lancu obezbeđuju mehanizam antitumorskog delovanja (Khoroshutin i sar., 2021). Takođe, glukani visoke molekulske težine su efikasniji od glukana niske molekulske težine (Devi i Maiti., 2016). Da bi se povećala antitumorska aktivnost polisaharida i poboljšala njihova svojstva koja uglavnom zavise od njihove rastvorljivosti u vodi, neophodno je pronaći odgovarajući metod ekstrakcije koji neće dovesti do narušavanja njihove strukture (Khoroshutin i sar., 2021). Rezultati ovog istraživanja ukazuju da su ekstrakti dobijeni subkritičnom vodenom ekstrakcijom lako rastvorljivi i da se ovom tehnikom ekstrahuje širok spektar bioaktivnih jedinjenja.

Fenolna jedinjenja poput protokatehinske kiseline, kafeinske kiseline, 3,4-dihidroksil benzil acetona inhibiraju rast A549 ćelija adenokarcinoma pluća, dok na neizmenjenim ćelijama nisu pokazala citotoksični efekat (Nakajima et al., 2009). Vodeni ekstrakti *I. obliquus* koji su bogati p-kumarinskom i ferulinskom kiselinom su doveli do znatnog smanjenja preživljavanja A549, Bel-7402 i LO2 ćelijskih linija (Wang i sar., 2015). Polifenolna jedinjenja iz Čage su pokazala aktivnost inhibicije topoizomerase II pri čemu je došlo do smanjenja rasta ćelija karcinoma debelog creva (HCT116). Takođe, u *in vitro* istraživanju je naglašeno da fenolna jedinjenja poput elaginske, galne, cimetne i kafeinske kiseline izolovana iz gljive *I. obliquus* imaju pozitivan efekat protiv karcinoma kože (Sofreni et al., 2021). Etanolni ekstrakt *I. obliquus* nalazi se kao sastavna komponenta u kompleksnom komercijalnom leku "Befungin" koji se koristi protiv gastritisa, čira na želudcu ili kao preventivna terapija protiv prekancerogeneze (Khoroshutin et al., 2021).

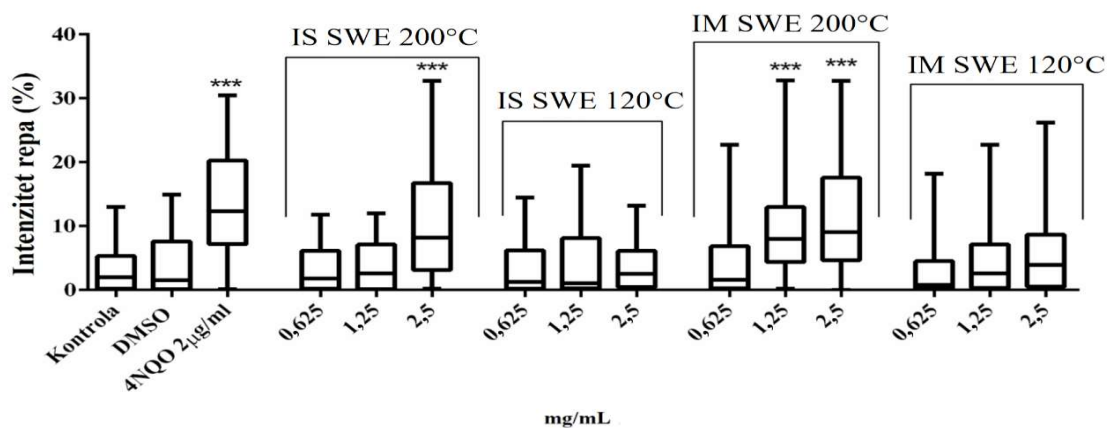
Kako bi se dalje utvrdila bezbednost testiranih ekstrakata, ispitan je i genotoksični potencijal prema MRC-5, Hs 294T i SW 620 ćelijskim linijama. Za alkalni komet test na MRC-5 ćelijama izabrane su necitotoksične koncentracije (do 1,25 mg/mL za IS i IM SWE 200 °C; do 2,5 za IS i IM SWE 120 °C ekstrakte). Na ćelijsku liniju MRC-5 samo ekstrakt IM SWE 120 °C nije ispoljio genotoksičan efekat, dok je IM SWE 200 °C pokazao genotoksičnost samo pri najvišoj testiranoj koncentraciji od 1,25 mg/mL. Ekstrakti dobijeni iz Srpske Čage zavisno od temperature na kojoj su ekstahovani pokazali su značajnu razliku pri genotoksičnoj analizi. IS SWE 200 °C doveo je do statistički značajnog oštećenja molekula DNK pri svim testiranim koncentracijama, dok je ekstrakt IS SWE 120 °C pokazao najznačajnije oštećenje pri najvišoj testiranoj koncentraciji od 2,5 mg/mL (Slika 34). Što se tiče ćelijske linije Hs 294T samo je IS SWE 200 °C pokazao statistički značajan genotoksični efekat pri koncentraciji od 2,5 mg/mL (Slika 35). Izabrane necitotoksične koncentracije za ovu kancersku ćelijsku liniju bile su: do 2,5 mg/ml za IS SWE 200 °C, do 0,3125 mg/mL za preostale ekstrakte. Sa druge strane, najveći stepen oštećenja na molekulu DNK na ćelijskoj linija SW 620 izazvali su IS i IM ekstrakti dobijeni na temperaturi od 200 °C pri koncentraciji od 2,5 mg/mL a IM i pri koncentraciji od 1,25 mg/mL (Slika 36). Ekstrakti dobijeni na temperaturi od 120 °C nisu ispoljili oštećenja na DNK molekulu.



Slika 34. Genotoksična aktivnost subkritičnih vodenih ekstrakata gljive *I. obliquus* na na MRC-5 ćelijama. Rezultati su izraženi kao TI (eng. tail intensity, procenat DNK u repovima kometa). Kao pozitivna kontrola je korišćen 4NQO (2 µg/ml). Statistička značajnost analizirana je u odnosu na kontrolu rastvarača DMSO pomoću neparametarskog testa Mann-Whitney U testa (*p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001).



Slika 35. Genotoksična aktivnost subkritičnih vodenih ekstrakata gljive *I. obliquus* na na Hs 294T ćelijama. Rezultati su izraženi kao TI (eng. tail intensity, procenat DNK u repovima kometa). Kao pozitivna kontrola je korišćen 4NQO (2 µg/ml). Statistička značajnost analizirana je u odnosu na kontrolu rastvarača DMSO pomoću neparametarskog testa Mann-Whitney U testa (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).



Slika 36. Genotoksična aktivnost subkritičnih vodenih ekstrakata gljive *I. obliquus* na na SW 620 ćelijama. Rezultati su izraženi kao TI (eng. tail intensity, procenat DNK u repovima kometa). Kao pozitivna kontrola je korišćen 4NQO (2 µg/ml). Statistička značajnost analizirana je u odnosu na kontrolu rastvarača DMSO pomoću neparametarskog testa Mann-Whitney U testa (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

Što se tiče genotoksičnog potencijala u komet testu, testirani ekstrakti uglavnom nisu ispoljili prema ćelijskim linijama tumora, izuzev ekstrakta dobijenih na temperaturi od 200 °C, koji je i na svim testiranim koncentracijama redukovao fetalne fibrobaste pluća (MRC-5).

6. Zaključci

Na osnovu dobijenih rezultata u ovoj tezi utvrđeno je da su postavljeni ciljevi ispunjeni, te se mogu izvesti sledeći zaključci:

1. Različite zelene tehnike ekstrakcije značajno su uticale na prinos dobijenih ekstrakata *I. obliquus*. Subkrična vodena ekstrakcija na 120 °C dala je najviši prinos u odnosu na sve ostale primenjenije tehnike.

2. Najviši sadržaj ukupnih proteina dobijen je primenom MW i VAE ekstrakcije kada je korišćena voda ili 50% EtOH, kao i kod SWE uzoraka. Sadržaj ukupnih polisaharida bio je najviši kod SWE (200 °C) IS (536,15 ± 39,54 mg GLU/g) i IM (580,28 ± 4,23 mg GLU/g) ekstrakata, kod ovih uzoraka je utvrđen i najviši sadržaj glukana za srpsku (20,43 ± 1,09 GLUg/100 g) i mongolsku Čagu (20,95 GLU ± 0,83 g/100 g). Utvrđeno je da je glukoza dominantan monosaharid u svim ekstraktima *I. obliquus*. SWE ekstrakcija se izdvojila kao najefikasnija za ekstrahovanje pojedinačnih šećera: glukoze, sorbitola, manitola, galaktoze i turanoze.

3. Izdvajanju fenolnih jedinjenja najviše je pogodovalo kombinovanje 50% EtOH i mikrotalasa i rezultiralo je najboljim prinosom za IS (90,16 ± 1,51 mg/g GAE) i IM (55,65 ± 0,88 mg/g GAE), takođe se i SWE tehnika pokazala kao efikasna za ekstrakciju fenolnih jedinjenja. Kvalitativnom analizom utvrđeno je da je hlorogena kiselina najzastupljenija u odnosu na bilo koje drugo fenolno jedinjenje. Vanilinska, siringinska, sinapinska i ferulna kiselina prisutne su u umerenim količinama. Pored hlorogene, utvrđeno je prisustvo i prokatehinske, kafeinske, p-kumarinske i cimetine kiseline u nešto većim količinama, kao i vanilinske, siringinske, sinapinske i ferulne u umerenim količinama.

4. Mikrotalasa i ultrazvučna ekstrakcija u kombinaciji sa etanolom i SWE na 200 °C dale su znatno viši prinos nezasićenih masnih kiselina u poređenju sa zasićenim. Najzastupljenije masne kiseline u ekstraktima srpske i mongolske Čage bile su palmitinska (C16:0), stearinska (C18:0) i oleinska kiselina (C18:1 cis).

5. Ispitivanjem antioksidativnog potencijala ekstrakata različitim metodama, DPPH•, ABTS+•, CUPRAC i heliranje Fe²⁺ pokazano je da Čaga ima izuzetan antioksidativni potencijal. Kod svih metoda uočena je dozna zavisnost. Različite tehnike ekstrakcije bioaktivnih jedinjenja, njihova raznovrsnost ali i geografsko poreklo materijala uticali su na biološku aktivnost ekstrakata. Iako su svi ekstrakti ispoljili snažnu antioksidativnu aktivnost, SWE su bili nešto superiorniji čak i pri vrlo niskim koncentracijama (0,3125 – 2,5 mg/mL), što je u korelaciji sa višim sadržajem fenolnih jedinjenja, polisaharida i β-glukana.

6. Mikrodilucionim testom je pokazana znatno veća osetljivost Gram – pozitivnih bakterija u poređenju sa Gram - negativnim prema testiranim ekstraktima gljive *I. obliquus*. IS i IM SWE 200 °C ekstrakti ispoljili su najjače antimikrobno dejstvo (MIC - 5 mg/mL) prema *E. faecalis* ATCC 29219 i nešto slabije dejstvo (MIC - 10 mg/mL) za iste ekstrakte dobijene pri nižoj temperaturi (120 °C). Dodatno su (SWE 200 °C) ekstrakti pokazali i mikrobicidni potencijal, što je potvrđeno i praćenjem kinetike rasta u prisustvu ekstrakta. MRSA je pokazao veću osetljivost prema ekstraktima poreklom iz srpske Čage. Sa druge strane nijedan testiran izolat Gram – negativnih bakterija nije ispoljio baktericidno dejstvo.

7. Metodom šahovske table pokazano je da ekstrakti IS i IM SWE 200 °C u kombinaciji sa etanolnim ekstraktom kantariona deluju sinergistički prema *E. faecalis* (ATCC 29219), dok je

sa druge strane ista kombinacija ekstrakata ispoljila indiferentan efekat prema kliničkom izolatu MRSA.

8. Umerena produkcija biofilma je zabeležena kod 4 izolata, 3 klinička (*P. aeruginosa* MMA83, *E. faecalis* i MRSA) i jedan ATCC soj (*E. faecalis* 29212). Ostali izolati su ispoljili slabu produkciju biofilma.

9. Tretman pojedinačnim ekstraktima, pri najvišim testiranim koncentracijama, dovodio je do značajne redukcije inicijalne adhezivnosti na svim odabranim izolatima. Ekstrakti MW i VAE u kombinaciji sa 50% EtOH i SWE (200 °C) uglavnom su zadržavali sličan procenat inhibicije kao i najviša koncentracija. Pri nižim testiranim koncentracijama (0,312–0,625), analizirani ekstrakti nisu pokazali značajan antiadhezivni efekat prema *P. aeruginosa* MMA83 i kliničkom *E. faecalis*. Najbolji efekat pri nižim koncentracijama pokazali su uzorci SWE (IM i IS) prema MRSA, procenat inhibicije je bio 40 – 60%.

10. Efekat na formiranje biofilma uočen je samo pri višim koncentracijama uglavnom za sve ekstrakte, dok su niže koncentracije slabo ispoljile antibiofilmsku aktivnost, jedino je primećena prema MRSA. Kod *P. aeruginosa* MMA83 ekstrakti MW i VAE (50% EtOH i H₂O) i SWE poreklom iz Srbije pri koncentracijama 10 i 5 mg/mL doveli su do značajne redukcije biofilma u poređenju sa ostalim ekstraktima. Nijedan ekstrakt nije pokazao sposobnost potpunog razaranja već formiranog biofilma.

11. Jedan od načina delovanja na biofilmove patogenih bakterija jeste smanjenje intenziteta sinteze i sekrecije EPS čime se smanjuje sposobnost bakterija da se vežu za kontaktnu površinu. Ni jedan od ispitanih ekstrakata nije u potpunosti zaustavio ovaj proces što može biti posledica hemijskog sastava kao i niske koncentracije ekstrakata. Čaga iz Srbije bila je efikasnija za veći broj različitih ekstrakata a procenat inhibicije se kretao oko 50.

12. Fluorescentna mikroskopija je pokazala da ekstrakti IS VAE H₂O, IM VAE H₂O, IS SWE 200 °C, IM SWE 200 °C sprečavaju formiranje biofilma, ali dovode i do dekompozicije formiranog biofilma *P. aeruginosa* MMA83.

13. SEM mikrografije su pokazale da ekstrakti IS VAE H₂O i IS SWE IM 200 °C imaju različit način delovanja na strukturu biofilma u odnosu na IM VAE H₂O i IM SWE 200 °C i to: ravnomernim skidanjem površinskog sloja matriksa odnosno, stvarajući tačkaste deformacije poput brazdi i pukotina, navedenim redom.

14. QSI ekstrakti IS VAE H₂O, IM VAE H₂O, IS SWE 200 °C, IS SWE 120 °C i IM SWE 120 °C pokazali su značajan efekat na smanjenje ekspresije gena tri QS sistema *P. aeruginosa* MMA83 – *las*, *rhl* i *pqs* koji kodiraju autoinducer sintazu. Većina ekstrakata uticala je na smanjenje produkcije faktora virulencije pre svega ramnolipida, ali i elastaze i piocijanina kliničkog izolata *P. aeruginosa*.

15. SWE ekstrakti pokazali su značajan citotoksični efekat prema melanocitama (Hs 294T) i ćelijama kolorektalnog adenokarcinoma (SW 620) pri koncentracijama 5 i 10 mg/mL, međutim, ekstrakti su ispoljili citotoksičnost i na neizmenjenim fetalnim fibroblastima pluća čoveka (MRC-5), što nije poželjno.

16. Genotoksični efekat prema MRC-5 nije ispoljio samo IM SWE 120 °C. IS SWE 200 °C (2,5 mg/mL) je imao genotoksični efekat prema Hs 294T ćelijama, a IS i IM SWE 200 °C prema SW 620.

7. LITERATURA

- Abass, S., Parveen, R., Irfan, M., Malik, Z., Akhtar, S., & Sayeed, H. (2024). Mechanism of antibacterial phytoconstituents : an updated review. *Archives of Microbiology*, 206(7), 1–21. <https://doi.org/10.1007/s00203-024-04035-y>
- Abu-Reidah, I. M., Critch, A. L., Manful, C. F., Rajakaruna, A., Vidal, N. P., Pham, T. H., Cheema, M., & Thomas, R. (2021). Effects of ph and temperature on water under pressurized conditions in the extraction of nutraceuticals from chaga (*Inonotus obliquus*) mushroom. *Antioxidants*, 10(8). <https://doi.org/10.3390/antiox10081322>
- Ahmad, M., Kuldeep, R., & Manabendra, G. (2021). Microbial biofilm : formation, architecture, antibiotic resistance, and control strategies. *Brazilian Journal of Microbiology*, 1701–1718. <https://doi.org/10.1007/s42770-021-00624-x>
- Ahmad, S., Lee, S. Y., Kong, H. G., Jo, E. J., & Choi, H. K. (2016). Genetic Determinants for Pyomelanin Production and Its Protective Effect against Oxidative Stress in *Ralstonia solanacearum*. *PLoS ONE*, 11(8), 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0160845>
- Ahmad, I., Husain, F. M., Maheshwari, M., & Zahin, M. (2014). Medicinal Plants and Phytocompounds: A Potential Source of Novel Antibiofilm Agents. *Antibiofilm Agents*, 205–232. doi:10.1007/978-3-642-53833-9_10
- Al Azad, S., & Ai Ping, V. C. (2021). Comparison of Protein and Amino Acids in the Extracts of Two Edible Mushroom, *Pleurotus sajor-caju* and *Schizophyllum commune*. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 12(09), 286–296. <https://doi.org/10.4236/abb.2021.129018>
- Albericio, F. (2019). Antibiotic Resistance: From the Bench to Patients. *Antibiotics*, 8(3), 129. <https://doi.org/10.3390/antibiotics8030129>.
- Allesen-Holm, M., Barken, K. B., Yang, L., Klausen, M., Webb, J. S., Kjelleberg, S., & Tolker-Nielsen, T. (2006). A characterization of DNA release in *Pseudomonas aeruginosa* cultures and biofilms. *Molecular Microbiology*, 59(4), 1114–1128. doi:10.1111/j.1365-2958.2005.05008.x
- Altuwajiri, M., Mohamed, S., & Abo, S. (2023). Antibacterial activity of Chaga mushroom (*Inonotus obliquus*) extract against *Staphylococcus aureus* and *Salmonella typhimurium* : An *In Vitro* Study. *The Egyptian Society of Experimental Biology*, 19(2): 167 – 177. <https://doi.org/10.5455/egyjebb.20230921012834>
- Alupului, A., Călinescu I., Lavric V. (2012). Microwave extraction of active principles. *UPB Science Bulletin, Series B*, 74 (2).
- Alves, M.J.; Ferreira, I.C.; Lourenço, I.; Costa, E.; Martins, A.; Pintado, M. (2014). Wild mushroom extracts as inhibitors of bacterial biofilm formation. *Pathogens*, 3(3), 667-679; <https://doi.org/10.3390/pathogens3030667>
- Alves, M., Ferreira, I., Dias, J., Teixeira, V., Martins, A., & Pintado, M. (2012). A Review on Antimicrobial Activity of Mushroom (Basidiomycetes) Extracts and Isolated Compounds. *Planta Medica*, 78(16), 1707–1718. doi:10.1055/s-0032-1315370
- Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., Bektas,oğlu, B., & Bener, M. (2008). Cupric Ion Reducing Antioxidant Capacity Assay for Food Antioxidants: Vitamins, Polyphenolics, and Flavonoids in Food Extracts. *Advanced Protocols in Oxidative Stress I*, 163–193. doi:10.1007/978-1-60327-517-0_14
- Arshadi, N., Nouri, H., & Moghimi, H. (2023). Increasing the production of the bioactive compounds in medicinal mushrooms: an omics perspective. In *Microbial Cell Factories*, 22 (11). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s12934-022-02013-x>
- Asfaw, N., Licence, P., Novitskii, A. A., & Poliakoff, M. (2005). Green Chemistry in Ethiopia: the cleaner extraction of essential oils from *Artemisia afra*: a comparison of

- clean technology with conventional methodology. *Green Chemistry*, 7(5), 352. doi:10.1039/b417961g
- Azmir, J., Zaidul, I. S. M., Rahman, M. M., Sharif, K. M., Mohamed, A., Sahena, F., Jahurul, M. H. A., Ghafoor, K., Norulaini, N. A. N., & Omar, A. K. M. (2013). Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review *Journal of Food Engineering*, 117(4), 426–436. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.01.014>
- Babitskaya, V. G., Shcherba, V. V., & Ikonnikova, N. V. (2000). Melanin Complex of the Fungus *Inonotus obliquus*. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 36(4), 377–381. doi:10.1007/bf02738046
- Babova, O., Occhipinti, A., Capuzzo, A., & Maffei, M. E. (2016). Extraction of bilberry (*Vaccinium myrtillus*) antioxidants using supercritical / subcritical CO₂ and ethanol as co-solvent. *The Journal of Supercritical Fluids*, 107, 358–363. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2015.09.029>
- Baek, J., Roh, H.-S., Baek, K.-H., Lee, S., Lee, S., Song, S.-S., & Kim, K. H. (2018). Bioactivity-based analysis and chemical characterization of cytotoxic constituents from Chaga mushroom (*Inonotus obliquus*) that induce apoptosis in human lung adenocarcinoma cells. *Journal of Ethnopharmacology*, 224, 63–75. doi:10.1016/j.jep.2018.05.025
- Bains, A., Chawla, P., & Inbaraj, B. S. (2023). Evaluation of In Vitro Antimicrobial, Antioxidant, and Anti-Quorum Sensing Activity of Edible Mushroom (*Agrocybe aegerita*). *Foods* 2023, 12(19), 3562. <https://doi.org/10.3390/foods12193562>
- Balandaykin, M. E.; Zmitrovich, I. V. (2015). Review on chaga medicinal mushroom, *Inonotus obliquus* (Higher Basidiomycetes): Realm of medicinal applications and approaches on estimating its resource potential. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 17(2), 95–104. doi: 10.1615/IntJMedMushrooms.v17.i2.10
- Balik, M., Sułkowska-Ziaja, K. J., Ziaja, M., & Muszyńska, B. (2020). Phenolic acids – Occurrence and Significance in the World of Higher Fungi. *Medicina Internacia Revuo - International Medicine Review*, 29(115), 72–81–72–81.
- Barba, F. J., & Grimi, N. (2015). New Approaches for the Use of Non-conventional Cell Disruption Technologies to Extract Potential Food Additives and Nutraceuticals from Microalgae. *Food Engineering Reviews*. 45–62. <https://doi.org/10.1007/s12393-014-9095-6>
- Barbolina, I., Woods, C. R., Lozano, N., Kostarelos, K., Novoselov, K. S., & Roberts, I. S. (2016). Purity of graphene oxide determines its antibacterial activity. *2D Materials*, 3(2), 025025. doi:10.1088/2053-1583/3/2/025025
- Barkwell, B. L. J. (2018). La Michinn Traditional Metis Medicines and Healing.
- Bézivin, C., Tomasi, S., Lohézic-Le Dévéhat, F., & Boustie, J. (2003). Cytotoxic activity of some lichen extracts on murine and human cancer cell lines. *Phytomedicine*, 10(6-7), 499–503. doi:10.1078/094471103322331458
- Bodoira, R., Velez, A., Andreatta, A. E., Martínez, M., & Maestri, D. (2017). Extraction of bioactive compounds from sesame (*Sesamum indicum* L.) defatted seeds using water and ethanol under sub-critical conditions. *Food Chemistry*, 237, 114–120. doi:10.1016/j.foodchem.2017.05.102
- Bolwell, P. P., Page, A., Piślewska, M., & Wojtaszek, P. (2001). Pathogenic infection and the oxidative defences in plant apoplast. *Protoplasma*, 217(1-3), 20–32. doi:10.1007/bf01289409
- Boussetta, N., Vorobiev, E., Le, L. H., Cordin-Falcimaigne, A., & Lanoisellé, J.-L. (2012). Application of electrical treatments in alcoholic solvent for polyphenols extraction from grape seeds. *LWT - Food Science and Technology*, 46(1), 127–134. doi:10.1016/j.lwt.2011.10.016

- Bouyahya, A., Dakka, N., Et-touys, A., Abrini, J., & Bakri, Y. (2017). Medicinal plant products targeting quorum sensing for combating bacterial infections. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 10(8), 729–743. <https://doi.org/10.1016/j.apjtm.2017.07.021>
- Bradru, P., Biswas, A., Nair, C., Sreevalsakumar, S., Patil, M., Kannampuzha, S., Mukherjee, A. G., Wanjari, U. R., Renu, K., Vellingiri, B., & Gopalakrishnan, A. V. (2023). Recent advances in green technology and Industrial Revolution 4.0 for a sustainable future. In *Environmental Science and Pollution Research*, 30(60), 1–32. <https://doi.org/10.1007/s11356-022-20024-4>
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., & Jemal, A. (2018). Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 68(6), 394–424. doi:10.3322/caac.21492
- Breitenbach, J. and Kränzlin, F. (1986). Floristic part. In: *Fungi of Switzerland*. Verlag mycologia, 2(1), Lucerne, Switzerland.
- Cascioferro, S., Carbone, D., Parrino, B., Pecoraro, C., Giovannetti, E., Cirrincione, G., & Diana, P. (2020). Therapeutic strategies to counteract antibiotic resistance in MRSA biofilm-associated infections. *ChemMedChem*, 16(1), 65–80. doi:10.1002/cmdc.202000677
- Cha, J. Y., Lee, S. Y., Lee, S. Y., & Chun, K. W. (2010). Basidiocarp formation by *Inonotus obliquus* on a living paper birch tree. *Forest Pathology*, 41(2), 163–164. doi:10.1111/j.1439-0329.2010.00687.x
- Chemat, F., Rombaut, N., Meullemiestre, A., Turk, M., Perino, S., & Abert-vian, M. (2017). Review of Green Food Processing techniques . Preservation , transformation , and extraction. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 41, 357–377. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2017.04.016>
- Chemat, F., Vian, M. A., & Cravotto, G. (2012). Green extraction of natural products: Concept and principles. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(7), 8615–8627. <https://doi.org/10.3390/ijms13078615>
- Chemat, F., Vian, M. A., Ravi, H. K., Khadhraoui, B., Hilali, S., Perino, S., & Tixier, A. F. (2019). Review of Alternative Solvents for Green Extraction of Food and Natural Products : *Panorama , Principles, Applications and Prospects*. *Molecules*, 24(16), 3007; <https://doi.org/10.3390/molecules24163007>
- Chen, H., Yan, M., & Zhu, J. (2011). Enhancement of exo-polysaccharide production and antioxidant activity in submerged cultures of *Inonotus obliquus* by lignocellulose decomposition. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 38 (2), 291–298. <https://doi.org/10.1007/s10295-010-0772-z>
- Chen, Y., Gu, X., Huang, S. quan, Li, J., Wang, X., & Tang, J. (2010). Optimization of ultrasonic/microwave assisted extraction (UMAE) of polysaccharides from *Inonotus obliquus* and evaluation of its anti-tumor activities. *International Journal of Biological Macromolecules*, 46(4), 429–435. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2010.02.003>
- Cheng, Y., Xue, F., Yu, S., & Du, S. (2021). Subcritical Water Extraction of Natural Products. *Molecules*, 26(13), 4004; <https://doi.org/10.3390/molecules26134004> 1–38.
- Cheung, Y.-C., Siu, K.-C., & Wu, J.-Y. (2012). Kinetic Models for Ultrasound-Assisted Extraction of Water-Soluble Components and Polysaccharides from Medicinal Fungi. *Food and Bioprocess Technology*, 6(10), 2659–2665. doi:10.1007/s11947-012-0929-z
- Cho, Y.N., Saravana, P. S., David, N., & Chun, B.S. (2020). Biofunctional properties of wild cultivated and cultivated Ginseng (*Panax ginseng* Meyer) extracts obtained using subcritical water extraction. *Separation Science and Technology*, 56(8), 1370–1382. doi:10.1080/01496395.2020.1781893

- Chye, C., Ngin, S., Wan, J., Yong, H., Sin, C., & Shi, E. (2010). Pressurized hot water extraction (PHWE). *Journal of Chromatography A*, 1217(16), 2484–2494. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.12.050>
- Ćilerdžić, J., Vukojević, J., Stajić, M., Stanojković, T., & Glamočlija, J. (2014). Biological activity of *Ganoderma lucidum* basidiocarps cultivated on alternative and commercial substrate. *Journal of Ethnopharmacology*, 155(1), 312–319. doi:10.1016/j.jep.2014.05.036
- Clardy, J., & Fischbach, M. A. (2007). Primer The natural history of antibiotics. 437–441.
- Costea, T., Vlad, O. C., Miclea, L., & Ganea, C. (2020). Alleviation of Multidrug Resistance by Flavonoid and Non-Flavonoid Compounds in Breast , Lung , Colorectal and Prostate Cancer. *Int. J. Mol. Sci.*, 21(2), 401; <https://doi.org/10.3390/ijms21020401>
- Croxatto, A., Lauritz, J., Chen, C., & Milton, D. L. (2007). *Vibrio anguillarum* colonization of rainbow trout integument requires a DNA locus involved in exopolysaccharide transport and biosynthesis. *Environmental Microbiology*, 9(2), 370–382. doi:10.1111/j.1462-2920.2006.01147.x
- Ćurčić J, Dinić M, Novović K, Vasiljević Z, Kojić M, Jovčić B, Malešević M. (2024). A novel thermostable YtnP lactonase from *Stenotrophomonas maltophilia* inhibits *Pseudomonas aeruginosa* virulence *in vitro* and *in vivo*. *International Journal of Biological Macromolecules*. 264(1), 130421. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2024.130421.
- Cvetković, S., Vuletić, S., Vunduk, J., Klaus, A., Mitić, D., & Nikolić, B. (2023). The role of *Gentiana lutea* extracts in reducing UV-induced DNA damage. *Mutagenesis*, 38, 71–80. <https://doi.org/10.1093/mutage/geac006>.
- Czajkowski, R., & Jafra, S. (2009). Quenching of acyl-homoserine lactone-dependent quorum sensing by enzymatic disruption of signal molecules. *Acta Biochimica Polonica*, 56(1), 1-16.
- Da Porto, C., Decorti, D., & Kikic, I. (2009). Flavour compounds of *Lavandula angustifolia* L. to use in food manufacturing: Comparison of three different extraction methods. *Food Chemistry*, 112(4), 1072–1078. doi:10.1016/j.foodchem.2008.07.01
- Daglia, M. (2012). Polyphenols as antimicrobial agents. *Current Opinion in Biotechnology*, 23(2), 174–181. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2011.08.007>
- Darmasiwi, S. (2022). Antibiofilm activity and bioactive phenolic compounds of ethanol extract from the *Hericium erinaceus* basidiome. *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research*, 13(2), 111-116. https://doi.org/10.4103/japtr.japtr_1_22
- Das, T., Manoharan, A., Whiteley, G., Glasbey, T., & Manos, J. (2020). *Pseudomonas aeruginosa* biofilms and infections: Roles of extracellular molecules. *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering: Microbial Biofilms*, 29–46. doi:10.1016/b978-0-444-64279-0.00003-7
- Deng, Q., Pu, Y., Sun, L., Wang, Y., Liu, Y., Wang, R., Liao, J., Xu, D., Liu, Y., Ye, R., Fang, Z., & Gooneratne, R. (2017). Antimicrobial peptide AMPNT-6 from *Bacillus subtilis* inhibits biofilm formation by *Shewanella putrefaciens* and disrupts its preformed biofilms on both abiotic and shrimp shell surfaces. *Food Research International*, 102, 8–13. doi:10.1016/j.foodres.2017.09.057
- Deveci, E., Tel-Çayan, G., Duru, M. E., & Öztürk, M. (2019). Isolation, characterization, and bioactivities of compounds from *Fuscoporia torulosa* mushroom. *Journal of Food Biochemistry*, 13074. doi:10.1111/jfbc.13074
- Devi K.S. and Maiti. T.K. (2016). Immunomodulatory and Anti-cancer Properties of Pharmacologically Relevant Mushroom Glycans. *Recent Patents on Biotechnology*, 10(1), 72-78(7) PMID 27456820
- Diao, B., Jin, W., & Yu, X. (2014). Protective Effect of Polysaccharides from *Inonotus obliquus* Streptozotocin-Induced Diabetic Symptoms and Their Potential Mechanisms

- in Rats. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 1–5. doi:10.1155/2014/841496
- Dimitrijevic, M., Jovanovic, V. S., Cvetkovic, J., Mihajilov-Krstev, T., Stojanovic, G., & Mitic, V. (2015). Screening of antioxidant, antimicrobial and antiradical activities of twelve selected Serbian wild mushrooms. *Analytical Methods*, 7(10), 4181–4191. doi:10.1039/c4ay03011g
- Dimkić, I., Gobin, I., Begić, G., Antić, D. R., Ristivojević, P., Jurica, K., ... Stanković, S. (2021). Antibacterial activity of herbal extracts towards uropathogenic *Enterococcus* isolates as a natural approach in control of urinary tract infections. *Journal of Herbal Medicine*, 28, 100445. doi:10.1016/j.hermed.2021.100445
- Dinis, T. C. P., Madeira, V. M. C., & Almeida, L. M. (1994). Action of Phenolic Derivatives (Acetaminophen, Salicylate, and 5-Aminosalicylate) as Inhibitors of Membrane Lipid Peroxidation and as Peroxyl Radical Scavengers. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 315(1), 161–169. doi:10.1006/abbi.1994.1485
- Dobiáš, P., Pavlíková, P., Adam, M., Eisner, A., Beňová, B., & Ventura, K. (2010). Comparison of pressurised fluid and ultrasonic extraction methods for analysis of plant antioxidants and their antioxidant capacity. *Open Chemistry*, 8(1). doi:10.2478/s11532-009-0125-9
- Dong, J.Y., Wang, Z.C., Wang, Y. (2011). Rapid extraction of polysaccharides from fruits of *Lycium barbarum* L. *Journal of Food Biochemistry*, 35(4), 1047–1057. doi:10.1111/j.1745-4514.2010.00433.x
- Donelli, G., & Vuotto, C. (2014). Biofilm-based infections in long-term care facilities. *Future Microbiology*, 9(2), 175–188. doi:10.2217/fmb.13.149
- 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>
- Du, N., Wu, K., Zhang, J., Wang, L., Pan, X., Zhu, Y., Wu, X., Liu, J., Chen, Y., Ye, Y., Wang, Y., Wu, W., Cheng, W., & Huang, Y. (2021). Inonotsuoxide B regulates M1 to M2 macrophage polarization through sirtuin-1/endoplasmic reticulum stress axis. *International Immunopharmacology*, 96, 107603. doi:10.1016/j.intimp.2021.107603
- Du, X., Mu, H., Zhou, S., Zhang, Y., & Zhu, X. (2013). Chemical analysis and antioxidant activity of polysaccharides extracted from *Inonotus obliquus* sclerotia. *International Journal of Biological Macromolecules*, 62, 691–696. doi:10.1016/j.ijbiomac.2013.10.01
- DuBois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., & Smith, F. (1956). Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Analytical Chemistry*, 28(3), 350–356. doi:10.1021/ac60111a017
- Duru, K. C., Kovaleva, E. G., Danilova, I. G., & Van der Bijl, P. (2019). The pharmacological potential and possible molecular mechanisms of action of *Inonotus obliquus* from preclinical studies. *Phytotherapy Research*, 33(8), 1966–1980. doi:10.1002/ptr.6384
- Eid, J. I., & Das, B. (2020). Molecular insights and cell cycle assessment upon exposure to Chaga (*Inonotus obliquus*) mushroom polysaccharides in zebrafish (*Danio rerio*). *Scientific Reports*, 10(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-64157-3>
- Fan, L., Ding, S., Ai, L., & Deng, K. (2012). Antitumor and immunomodulatory activity of water-soluble polysaccharide from *Inonotus obliquus*. *Carbohydrate Polymers*, 90(2), 870–874. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.06.013>
- Fathi F, Sadrnia M, Arjomandzadegan M, Mohajerani HR. (2021). *In vitro* and *in vivo* evaluation of antibacterial and anti-biofilm properties of five ethnomedicinal plants

- against oral bacteria by TEM. *Avicenna Journal of Phytomedicine*, 11(2): 180-189.
- Fetzner, S. (2015). Quorum quenching enzymes. *Journal of Biotechnology*, 201, 2–14. doi:10.1016/j.jbiotec.2014.09.001
- Filip, S., Vidović, S., Adamović, D., & Zeković, Z. (2014). Fractionation of non-polar compounds of basil (*Ocimum basilicum* L.) by supercritical fluid extraction (SFE). *The Journal of Supercritical Fluids*, 86, 85–90. doi:10.1016/j.supflu.2013.12.001
- Flemming, H. C., Wingender, J., Szewzyk, U., Steinberg, P., Rice, S. A., & Kjelleberg, S. (2016). Biofilms: An emergent form of bacterial life. *Nature Reviews Microbiology*, 14(9), 563–575. https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.94
- Fomo, G., Madzimbamuto, T. N., & Ojumu, T. V. (2020). Applications of nonconventional green extraction technologies in process industries: Challenges, limitations and perspectives. *Sustainability*, 12(13), 5244; https://doi.org/10.3390/su12135244
- Fong, J. N. C., & Yildiz, F. H. (2015). Biofilm Matrix Proteins. *Microbiology Spectrum*, 3(2), 201-222. doi:10.1128/microbiolspec.mb-0004-2014
- Fordjour E, Manful CF, Javed R, Galagedara LW, Cuss CW, Cheema M and Thomas R (2023). Chaga mushroom: a super-fungus with countless facets and untapped potential. *Frontiers Pharmacology*, 14, 1273786. doi: 10.3389/fphar.2023.1273786
- Fradj, N., Cristine, K., Montigny, N. De, Awwad, F., Boumghar, Y., Germain, H., & Desgagn, I. (2019). RNA-Seq de Novo Assembly and Differential Transcriptome Analysis of Chaga (*Inonotus obliquus*) Cultured with Different Betulin Sources and the Regulation of Genes Involved in Terpenoid Biosynthesis. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(18), 4334. https://doi.org/10.3390/ijms20184334
- Fraterrigo Garofalo, S., Tommasi, T., & Fino, D. (2021). A short review of green extraction technologies for rice bran oil. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 11(2), 569–587. https://doi.org/10.1007/s13399-020-00846-3
- Gachovska, T., Cassada, D., Subbiah, J., Hanna, M., Thippareddi, H., & Snow, D. (2010). Enhanced Anthocyanin Extraction from Red Cabbage Using Pulsed Electric Field Processing. *Journal of Food Science*, 75(6), E323–E329. doi:10.1111/j.1750-3841.2010.01699.x
- Galanakis, C. M. (2013). Food and Bioproducts Processing Short communication Emerging technologies for the production of nutraceuticals from agricultural by-products: A viewpoint of opportunities and challenges. *Food and Bioproducts Processing*, 91(4), 575–579. https://doi.org/10.1016/j.fbp.2013.01.004
- Garcia-Mendoza, M. P., Paula, J. T., Paviani, L. C., Cabral, F. A., & Martinez-Correa, H. A. (2015). Extracts from mango peel by-product obtained by supercritical CO₂ and pressurized solvent processes. *LWT - Food Science and Technology*, 62(1), 131–137. doi:10.1016/j.lwt.2015.01.026
- Gašić, U. M., Natić, M. M., Mišić, D. M., Lušić, D. V., Milojković-Opsenica, D. M., Tešić, Ž. L., & Lušić, D. (2015). Chemical markers for the authentication of unifloral *Salvia officinalis* L. honey. *Journal of Food Composition and Analysis*, 44, 128–138. https://doi.org/10.1016/j.jfca.2015.08.008
- Gbashi, S., Adebo, O. A., Piater, L., Madala, N. E., & Njobeh, P. B. (2016). Subcritical Water Extraction of Biological Materials. *Separation & Purification Reviews*, 46(1), 21–34. doi:10.1080/15422119.2016.1170035
- Géry, A., Dubreule, C., André, V., Rioult, J. P., Bouchart, V., Heutte, N., Eldin de Pécoulas, P., Krivomaz, T., & Garon, D. (2018). Chaga (*Inonotus obliquus*), a Future Potential Medicinal Fungus in Oncology? A Chemical Study and a Comparison of the Cytotoxicity Against Human Lung Adenocarcinoma Cells (A549) and Human Bronchial Epithelial Cells (BEAS-2B). *Integrative Cancer Therapies*, 17(3), 832–843. https://doi.org/10.1177/1534735418757912

- Ghosh, S., Nandi, S., Banerjee, A., Sarkar, S., Chakraborty, N., & Acharya, K. (2021). Prospecting medicinal properties of Lion's mane mushroom. *Journal of Food Biochemistry*, 45(8). doi:10.1111/jfbc.13833
- Giacometti, J., Bursać Kovačević, D., Putnik, P., Gabrić, D., Bilušić, T., Krešić, G., Stulić, V., Barba, F., Chemat, F., Barbosa-Canovas, G., & Režek Jambrak, A. (2018). Extraction of bioactive compounds and essential oils from mediterranean herbs by conventional and green innovative techniques: A review. *Food Research International*, 113, 245-262, <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.06.036>
- Glamočlija, J., Ćirić, A., Nikolić, M., Fernandes, Â., Barros, L., Calhelha, R. C., Ferreira, I., Soković, M., & van Griensven, L. J. L. D. (2015). Chemical characterization and biological activity of Chaga (*Inonotus obliquus*), a medicinal “mushroom.” *Journal of Ethnopharmacology*, 162, 323–332. doi:10.1016/j.jep.2014.12.069
- Golmohamadi, A., Möller, G., Powers, J., & Nindo, C. (2013). Ultrasoni cs Sonochemistry Effect of ultrasound frequency on antioxidant activity , total phenolic and anthocyanin content of red raspberry puree. *Ultrasonics - Sonochemistry*, 20(5), 1316–1323. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2013.01.020>
- González, A., Cruz, M., Losoya, C., Nobre, C., Loredó, A., Rodríguez, R., Contreras, J., & Belmares, R. (2020). Edible mushrooms as a novel protein source for functional foods. *Food and Function*, 11(9), 7400–7414. <https://doi.org/10.1039/d0fo01746a>
- Gu, X., Xu, Z., Gu, L., Xu, H., Han, F., Chen, B., & Pan, X. (2021). Preparation and antibacterial properties of gold nanoparticles : a review *Environmental Chemistry Letters*, 19(1), 167–187. <https://doi.org/10.1007/s10311-020-01071-0>
- Gupta, P., Sarkar, S., Das, B., & Bhattacharjee, S. (2016). Biofilm, pathogenesis and prevention - a journey to break the wall : a review. *Archives of Microbiology*, 198(1), 1–15. <https://doi.org/10.1007/s00203-015-1148-6>
- Haddad, O., Merghni, A., Elargoubi, A., Rhim, H., Kadri, Y., M., Mastouri. (2018). Comparative study of virulence factors among methicillin resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates. *BMC Infectious Diseases*, 18(1), 560–. doi:10.1186/s12879-018-3457-2
- Haghighi Asl A and Khajenoori M. (2013). Subcritical water extraction. In: Mass transfer—advances in sustainable energy and environment oriented numerical modeling, IntechOpen, pp 459–487
- Haider, T., Pandey, V., Banjare, N., Gupta, P. N., & Soni, V. (2020). Drug resistance in cancer : mechanisms and tackling strategies. *Pharmacological Reports*, 72(5), 1125–1151. <https://doi.org/10.1007/s43440-020-00138-7>
- Hall-Stoodley, L., Stoodley, P. (2009). Evolving concepts in biofilm infections. *Cellular Microbiology*, 11(7), 1034–1043. doi:10.1111/j.1462-5822.2009.01323.x
- Hall, C. W., & Mah, T. (2017). Molecular mechanisms of biofilm-based antibiotic resistance and tolerance in pathogenic bacteria. *Journals Investing in Science*, 41, 276–301. <https://doi.org/10.1093/femsre/fux010>
- Han, Y., Nan, S., Fan, J., Chen, Q., & Zhang, Y. (2019). *Inonotus obliquus* polysaccharides protect against Alzheimer ' s disease by regulating Nrf2 signaling and exerting antioxidative and antiapoptotic effects. *International Journal of Biological Macromolecules*, 131, 769–778. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.03.033>
- Hao, R., Li, Y., Shan, S., Xu, H., Li, J., & Li, Z. (2023). Antioxidant potential of styrene pyrone polyphenols from *Inonotus obliquus*: A combined experimental, density functional theory (DFT) approach and molecular dynamic (MD) simulation. *Journal of Saudi Chemical Society*, 27(4), 101652. <https://doi.org/10.1016/j.jsocs.2023.101652>
- Harmsen, M., Yang, L., Pamp, J. & Tolker-Nielsen, T. (2010). An update on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation, tolerance, and dispersal. *FEMS Immunology & Medical*

- Microbiology*, 59 (3), 253–268, <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2010.00690.x>
- Hassett, D. J., Borchers, M. T., & Panos, R. J. (2014). Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD): Evaluation From Clinical. *Immunological and Bacterial Pathogenesis Perspectives*, 52(3), 211–226. <https://doi.org/10.1007/s12275-014-4068-2>
- He, S.-H., & Dai, Y.-C. (2012). Taxonomy and phylogeny of *Hymenochaete* and allied genera of *Hymenochaetaceae* (Basidiomycota) in China. *Fungal Diversity*, 56(1), 77–93. doi:10.1007/s13225-012-0174-9
- He, C., Du, H., Tan, C., Chen, Z., Chen, Z., Yin, F., Xu, Y., & Liu, X. (2018). Semi-continuous pressurized hot water extraction of black tea. *Journal of Food Engineering*, 227, 30–41. doi:10.1016/j.jfoodeng.2018.02.001
- Heleno, S. A., Martins, A., Queiroz, M. J. R. P., & Ferreira, I. C. F. R. (2015). Bioactivity of phenolic acids: Metabolites versus parent compounds: A review *Food Chemistry*, 173, 501–513. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.10.057>
- Hendiani, S., Pornour, M., & Kashef, N. (2019). Quorum-sensing-regulated virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa* are affected by sub-lethal photodynamic inactivation. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 26, 8-12. doi:10.1016/j.pdpdt.2019.02.010
- Henri, I., Bassolé, N., & Juliani, H. R. (2012). Essential Oils in Combination and Their Antimicrobial Properties. *Molecules*, 17(4), 3989-4006; <https://doi.org/10.3390/molecules17043989>
- Herrero, M., Mendiola, J. A., Cifuentes, A., & Ibáñez, E. (2010). Supercritical fluid extraction: Recent advances and applications. *Journal of Chromatography A*, 1217(16), 2495–2511. doi:10.1016/j.chroma.2009.12.019
- Hossain, M.F. (2022). Green science and technology for designing sustainable world. In *Sustainable Design for Global Equilibrium*, 3–12.
- Hu, Y., Sheng, Y., Yu, M., Li, K., Ren, G., Xu, X., & Qu, J. (2016). Antioxidant activity of *Inonotus obliquus* polysaccharide and its amelioration for chronic pancreatitis in mice. *International Journal of Biological Macromolecules*, 87, 348–356. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.03.006>
- Hu, Y., Teng, C., Yu, S., Wang, X., Liang, J., Bai, X., Dong, L., Song, T., Yu, M., & Qu, Juanjuan. (2017). *Inonotus obliquus* polysaccharide regulates gut microbiota of chronic pancreatitis in mice. *AMB Express*, 7(1), 39–. doi:10.1186/s13568-017-0341-1
- Huang, S., Ding, S., & Fan, L. (2012). Antioxidant activities of five polysaccharides from *Inonotus obliquus*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 50(5), 1183–1187. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2012.03.019>
- Hutchings, M. I., Truman, A. W., & Wilkinson, B. (2020). Antibiotics : past , present and future. *Current Opinion in Microbiology*, 51(1), 72–80. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2019.10.008> ScienceDirect
- Hwang, A. Y., Chang Yang, S., Kim, J., Lim, T., Cho, H., & Hwang, K. T. (2019). Effects of non-traditional extraction methods on extracting bioactive compounds from chaga mushroom (*Inonotus obliquus*) compared with hot water extraction. *LWT - Food Science and Technology*, 110, 80–84. doi:10.1016/j.lwt.2019.04.073
- Hwang, B. S., Lee, I. K., & Yun, B. S. (2016). Phenolic compounds from the fungus *Inonotus obliquus* and their antioxidant properties. *Journal of Antibiotics*, 69(2), 108–110. <https://doi.org/10.1038/ja.2015.83>
- Islam, T., Yu, X., & Xu, B. (2016). LWT - Food Science and Technology Phenolic profiles, antioxidant capacities and metal chelating ability of edible mushrooms commonly consumed in China. *LWT - Food Science and Technology*, 72, 423–431. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.05.005>
- Jagani, S., Chelikani, R., Kim, D. (2009). Effects of phenol and natural phenolic compounds on biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa*. *Biofouling: The Journal of*

- Bioadhesion and Biofilm Research*, 25(4), 321–324. doi:10.1080/08927010802660854
- Jamal, M., Hussain, T., & Andleeb, S. (2015). Bacterial Biofilm: Its Composition, Formation and Role in Human Infections. *Research & Reviews: Journal of Microbiology and Bacterial Biofilm*, 1-22
- Janjušević, L., Karaman, M., Šibul, F., Tommonaro, G., Iodice, C., Jakovljević, D., & Pejin, B. (2017). The lignicolous fungus *Trametes versicolor* (L.) Lloyd (1920): a promising natural source of antiradical and AChE inhibitory agents. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 32(1), 355–362. <https://doi.org/10.1080/14756366.2016.1252759>
- Jayakumar, T., Thomas, P. A., & Geraldine, P. (2009). *In-vitro* antioxidant activities of an ethanolic extract of the oyster mushroom, *Pleurotus ostreatus*. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 10(2), 228–234. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2008.07.002>
- Jia, Q., Chen, X., Köllner, T.G., Rinkel, J., Fu, J., Labbé, J., Xiong, W., Dickschat, J.S., Gershenzon, J., Chen, F. (2019). Terpene Synthase Genes Originated from Bacteria through Horizontal Gene Transfer Contribute to Terpenoid Diversity in Fungi. *Scientific Reports*, 9(1), 9223–. doi:10.1038/s41598-019-45532-1
- Jiang, S., Shi, F., Lin, H., Ying, Y., Luo, L., Huang, D., & Luo, Z. (2020). *Inonotus obliquus* polysaccharides induces apoptosis of lung cancer cells and alters energy metabolism via the LKB1/AMPK axis. *International Journal of Biological Macromolecules*, 151, 1277–1286. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.10.174>
- Jo, E. K., Heo, D. J., Kim, J. H., Lee, Y. H., Ju, Y. C., & Lee, S. C. (2013). The Effects of Subcritical Water Treatment on Antioxidant Activity of Golden Oyster Mushroom. *Food and Bioprocess Technology*, 6(9), 2555–2561. <https://doi.org/10.1007/s11947-012-0793-x>
- Jokić, S., Svilović, S., Zeković, Z., Vidović, S. (2011): Mathematical modeling of soybean oil solubility in supercritical carbon dioxide. *International Journal of Food Science & Technology*, 46: 1031-1037. doi:10.1111/j.1365-2621.2011.02571.x
- Jr, C. J. S., Mende, K., Beckius, M. L., Akers, K. S., Romano, D. R., Wenke, J. C., & Murray, C. K. (2013). Biofilm formation by clinical isolates and the implications in chronic infections. *BMC Infectious Diseases*, 13(1), 47–. doi:10.1186/1471-2334-13-47
- Jurado-Mart, I., Sainz-Mej, M., & McClean, S. (2021). *Pseudomonas aeruginosa*: An Audacious Pathogen with an Adaptable Arsenal of Virulence Factors. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(6), 3128; <https://doi.org/10.3390/ijms22063128>
- Jurica, K., Brčić, Karačonji I., Šegan, S., Milojković, Opsenica D., Kremer, D. (2015). Quantitative analysis of arbutin and hydroquinone in strawberry tree leaves by GC-MS. *Arh Hig Rada Toksikol*, 66:197-202. doi: 10.1515/aiht-2015-66-2696
- Kafil, K.S., Asharzadeh, M. (2014). Vancomycin-Resistant *Enterococcus Faecium* and *Enterococcus Faecalis* isolated from education hospital of Iran. *The American Journal of Medicine*, 9(4): 323-327
- Kalia. (2013). Quorum sensing inhibitors: An overview. *Biotechnology Advances*, 31(2), 224–245. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2012.10.004>
- Karaman, M., Jovin E., Malbaša, R., Matavuly M., Popović, M. (2010). Medicinal and edible lignicolous fungi as natural sources of antioxidative and antibacterial agents. *Phytotherapy Research*, 24(10), 1473–1481. doi:10.1002/ptr.2969
- Kaur, V., Kumar, M., Kumar, A., Kaur, K., & Singh, V. (2018). Pharmacotherapeutic potential of phytochemicals: Implications in cancer chemoprevention and future perspectives. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 97, 564–586. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.10.124>
- Khan, M. K., Ahmad, K., Hassan, S., Imran, M., Ahmad, N., & Xu, C. (2018). Effect of novel technologies on polyphenols during food processing. *Innovative Food Science &*

- Emerging Technologies*, 45, 361–381. doi:10.1016/j.ifset.2017.12.006
- Khoroshutin, P., Reva, G., Yamamoto, T., & Reva, I. (2021). Pharmacokinetics and pharmacodynamics of Chaga birch mushroom components (*Inonotus obliquus*). *Archiv euromedica*, 11, 31–38. <http://dx.doi.org/10.35630/2199-885X/2021/11/2/9>
- Kim, Y. O., Park, H. W., Kim, J. H., Lee, J. Y., Moon, S. H., & Shin, C. S. (2006). Anti-cancer effect and structural characterization of endo-polysaccharide from cultivated mycelia of *Inonotus obliquus*. *Life Sciences*, 79(1), 72–80. doi:10.1016/j.lfs.2005.12.047
- Kimbaris, A. C., Siatis, N. G., Daferera, D. J., Tarantilis, P. A., Pappas, C. S., & Polissiou, M. G. (2006). Comparison of distillation and ultrasound-assisted extraction methods for the isolation of sensitive aroma compounds from garlic (*Allium sativum*). *Ultrasonics Sonochemistry*, 13(1), 54–60. doi:10.1016/j.ultsonch.2004.12.00
- Kit, Y., Yang, F., & Chang, J. (2021). Extraction of polysaccharides from edible mushrooms: Emerging technologies and recent advances. *Carbohydrate Polymers*, 251, 117006. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.117006>
- Klančnik, A., Megušar, P., Sterniša, M., Jeršek, B., Bucar, F., Smole M., Kos, J., & Sabotič, J. (2017). Aqueous Extracts of Wild Mushrooms Show Antimicrobial and Antiadhesion Activities against Bacteria and Fungi. *Phytotherapy Research*, 31 (12), 1971–1976. doi:10.1002/ptr.5934
- Klaus, A., Kozarski, M., Vunduk, J., Todorovic, N., Jakovljevic, D., Zizak, Z., Pavlovic, V., Levic, S., Niksic, M., & Van Griensven, L. J. L. D. (2015). Biological potential of extracts of the wild edible basidiomycete mushroom grifola frondosa. *Food Research International*, 67, 272–283. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.11.035>
- Ko, M. J., Nam, H. H., & Chung, M. S. (2020). Subcritical water extraction of bioactive compounds from *Orostachys japonicus* A. Berger (Crassulaceae). *Scientific Reports*, 10(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-67508-2>
- Kontoghiorghes, G. J., & Kontoghiorghes, C. N. (2020). Iron and Chelation in Biochemistry and Medicine: Treating Related Diseases. *Cells*, 9(6), 1456; <https://doi.org/10.3390/cells9061456>
- Kozarski, M., Klaus, A., van Griensven, L., Jakovljevic, D., Todorovic, N., Wan-Mohtar, W. A. A. Q. I., & Vunduk, J. (2023). Mushroom β -glucan and polyphenol formulations as natural immunity boosters and balancers: nature of the application. *Food Science and Human Wellness*, 12(2), 378–396. <https://doi.org/10.1016/j.fshw.2022.07.040>
- Kozarski, M., Klaus, A., Jakovljevic, D., Todorovic, N., Vunduk, J., Niksic, M., Vrvic, M. M., & Griensven, L. Van. (2015). Antioxidants of Edible Mushrooms. *Molecules*, 20(10), 19489–19525. <https://doi.org/10.3390/molecules201019489>
- Kozarski, M., Klaus, A., Niksic, M., Jakovljevic, D., Helsper, J. P. F. G., & van Griensven, L. J. L. D. (2011). Antioxidative and immunomodulating activities of polysaccharide extracts of the medicinal mushrooms *Agaricus bisporus*, *Agaricus brasiliensis*, *Ganoderma lucidum* and *Phellinus linteus*. *Food Chemistry*, 129(4), 1667–1675. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.06.029>
- Kozarski, M. S., Klaus, A. S., Vunduk, J., & Nikšić, M. P. (2020). the Influence of Mushroom *Coriolus Versicolor* and Hazelnuts Enrichment on Antioxidant Activities and Bioactive Content of Dark Chocolate. *Food and Feed Research*, 47(1), 23–32. <https://doi.org/10.5937/FFR2001023K>
- Kūka, M., Čakste, I., & Geršebeka, E. (2013). Determination of Bioactive Compounds and Mineral Substances in Latvian Birch and Maple Saps. *Proceedings of the Latvian Academy of Sciences*. Section B. Natural, Exact, and Applied Sciences, 67(4-5), 437–441. doi: 10.2478/prolas-2013-0069
- Kumar, R., Chhibber, S., & Harjai, K. (2009). Quorum sensing is necessary for the virulence of *Pseudomonas aeruginosa* during urinary tract infection. *Kidney International*, 76(3),

- 286–292. <https://doi.org/10.1038/ki.2009.183>
- Lade, H., Paul, D., & Kweon, J. H. (2014). Quorum Quenching Mediated Approaches for Control of Membrane Biofouling. *International Journal of Biological Sciences* 10(5): 550-565. doi: 10.7150/ijbs.9028
- Lazić, V., Klaus, A., Kozarski, M., Doroški, A., Tosti T., Simić, S., Vunduk, J. (2024). The Effect of Green Extraction Technologies on the Chemical Composition of Medicinal Chaga Mushroom Extracts. *Journal of Fungi*, 10(3), 225; <https://doi.org/10.3390/jof10030225>
- Lee, H. S., Kim, E. J., & Kim, S. H. (2015). Ethanol extract of *Innotus obliquus* (Chaga mushroom) induces G 1 cell cycle arrest in HT-29 human colon cancer cells. *Nutrition Research and Practice*, 9(2), 111–116. <https://doi.org/10.4162/nrp.2015.9.2.111>
- Lee, J., Zhang. (2015). The hierarchy quorum sensing network in *Pseudomonas aeruginosa*. *Protein & Cell*, 6(1), 26–41. doi:10.1007/s13238-014-0100-x
- Lee, Min-Woong; Hur, Hyeon; Chang, Kwang-Choon; Lee, Tae-Soo; Ka, Kang-Hyeon; Jankovsky, L. . (2008). Introduction to Distribution and Ecology of Sterile Conks of *Inonotus obliquus*. *Mycobiology*, 36(4), 199–. doi:10.4489/MYCO.2008.36.4.199
- Lee, P., & Tan, K. S. (2015). Effects of Epigallocatechin gallate against *Enterococcus faecalis* biofilm and virulence. *Archives of Oral Biology*, 60(3), 393–399. doi:10.1016/j.archoralbio.2014.11.014
- Leisner, J. J. (2020). The Diverse Search for Synthetic , Semisynthetic and Natural Product Antibiotics From the 1940s and Up to 1960 Exemplified by a Small Pharmaceutical Player. *Frontiers Microbiology*, 11, 976. doi: 10.3389/fmicb.2020.00976
- Li, J., Qu, C., Li, F., Chen, Y., Zheng, J., Xiao, Y., & Jin, Q. (2021). *Inonotus obliquus* Polysaccharide Ameliorates Azoxymethane / Dextran Sulfate Sodium-Induced Colitis-Associated Cancer in Mice via Activation of the NLRP3 In fl ammasome. *Frontiers in Pharmacology*, 11:621835. doi: 10.3389/fphar.2020.621835
- Li, Y., Fabiano-Tixier, A. S., Vian, M. A., & Chemat, F. (2013). Solvent-free microwave extraction of bioactive compounds provides a tool for green analytical chemistry. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 47, 1–11. doi:10.1016/j.trac.2013.02.007
- Lin, J., & Cheng, J. (2019). Quorum Sensing in *Pseudomonas aeruginosa* and Its Relationship to Biofilm Development [Chapter]. *Introduction to Biofilm Engineering, Part 1 - Quorum Sensing in Pseudomonas Aeruginosa and Its Relationship to Biofilm Development*, 1–16. <https://doi.org/10.1021/bk-2019-1323.ch001>
- Lin, P., Yan, Z.F., Li, C.T. (2020). Effects of Exogenous Elicitors on Triterpenoids Accumulation and Expression of Farnesyl Diphosphate Synthase Gene in *Inonotus obliquus*. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 588, 580–588. doi:10.1007/s12257-019-0502-y
- Liu, K., Xiao, X., Wang, J., Chen, C.-Y. O., & Hu, H. (2017). Polyphenolic composition and antioxidant, antiproliferative, and antimicrobial activities of mushroom *Inonotus sanghuang*. *LWT - Food Science and Technology*, 82, 154–161. doi:10.1016/j.lwt.2017.04.041
- Liu, L., Li, T., Cheng, X.J., Peng, C.T., Li, C.C., He, L.H., Ju, S.M., Wang, N.Y., Ye, T.H., Lian, M., Xiao, Q.J., Song, Y.J., Zhu, Y.B., Yu, L.T., Wang, Z.L., Bao, R. (2018). Structural and functional studies on *Pseudomonas aeruginosa* Dspl: implications for its role in DSF biosynthesis. *Scientific Reports*, 8(1), 3928–. doi:10.1038/s41598-018-22300-1
- Liu, Y., Li, J., Li, H., Deng, S., & Jia, A. (2021). Quorum sensing inhibition of hordenine analogs on *Pseudomonas aeruginosa* and *Serratia marcescens*. *Synthetic and Systems Biotechnology*, 6(4), 360–368. <https://doi.org/10.1016/j.synbio.2021.09.010>
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using

- Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods*, 25(4), 402–408. doi:10.1006/meth.2001.1262
- Llor, C., Bjerrum, L. (2014). Antimicrobial resistance: risk associated with antibiotic overuse and initiatives to reduce the problem. *Therapeutic Advances in Drug Safety*, 5(6), 229–241. doi:10.1177/2042098614554919
- Lobanovska, M., & Pilla, G. (2017). Penicillin's Discovery and Antibiotic Resistance: Lessons for the Future? *Yale Journal of biology and medicine*, 90, 135-145
- Lobo, J., Rodrigues, L., Regina, P., Araújo, L. De, Pacífico, J., Neto, B., Amélia, M., Maciel, V., Maria, M., & Morais, C. De. (2018). Original article Biofilm production by clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and structural changes in LasR protein of isolates non biofilm-producing. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 22(2), 129–136. <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2018.03.003>
- Lord, J., Gikonyo, A., Miwa, A., & Odoi, A. (2021). Antimicrobial resistance among *Enterobacteriaceae*, *Staphylococcus aureus*, and *Pseudomonas spp.* isolates from clinical specimens from a hospital in Nairobi, Kenya. *PeerJ*, 9:e11958 <https://doi.org/10.7717/peerj.11958>
- Lu, L., Li, M., Yi, G., Liao, L., Cheng, Q., Zhu, J., Zhang, B., Wang, Y., Chen, Y., & Zeng, M. (2022). Screening strategies for quorum sensing inhibitors in combating bacterial infections. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 12(1), 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2021.03.009>
- Lu, X., Wang, M., Zhao, Z., Hu, J., & Zhang, J. (2021). Effect of Different Pretreatment of Birch Sawdust on the Production of Active Polysaccharides by *Inonotus obliquus* Under Submerged Fermentation and Its Structural Mechanism. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 193:1545–1557. doi:10.1007/s12010-021-03508-w
- Luís, Â., Silva, F., Sousa, S., Duarte, A. P., & Domingues, F. (2013). Antistaphylococcal and biofilm inhibitory activities of gallic, caffeic, and chlorogenic acids. *Biofouling*, 30(1), 69–79. doi:10.1080/08927014.2013.845878
- Luo, L.-, Wang, Y., & Jiu-, H. (2021). Triterpenoid acids from medicinal mushroom *Inonotus obliquus* (Chaga) alleviate hyperuricemia and inflammation in hyperuricemic mice: Possible inhibitory effects on xanthine oxidase activity. *Journal of Food Biochemistry*, 1–13. <https://doi.org/10.1111/jfbc.13932>
- Luthria, D. L. (2012). Optimization of extraction of phenolic acids from a vegetable waste product using a pressurized liquid extractor. *Journal of Functional Foods*, 4(4), 842–850. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2012.06.001>
- Ma, L., Chen, H., Zhang, Y., Zhang, N., & Fu, L. (2012). Chemical modification and antioxidant activities of polysaccharide from mushroom *Inonotus obliquus*. *Carbohydrate Polymers*, 89(2), 371–378. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.03.016>
- Ma, Y.; Chu, Z.; Nan,W.; Zheng, X.; Zhao, Y.; Bai, Y.; Ma, X.; Ma, R.; Jia, Y.; Lü, X. (2023). Optimization of Polysaccharide Extraction from *Inonotus obliquus* by Subcritical Water and Characterization of its Physiochemical Properties and Bioactivity. *Social Science Research Network*, 1-43
- Mahtab, T., Jyoti, A., Khusro, A., Redwan, B. M., Zidan, M., Mitra, S., Bin, T., Dhama, K., Hossain, K., Gajdacs, M., Umar, M., Sahibzada, K., Hossain, J., & Koirala, N. (2021). Antibiotic resistance in microbes: History, mechanisms, therapeutic strategies and future prospects. *Journal of Infection and Public Health*, 14(12), 1750–1766. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2021.10.020>
- Majid, A., Phull, A. R., Khaskheli, A. H., Abbasi, S., Sirohi, M. H., Ahmed, I., Ujjan, S. H., Jokhio, I. A., & Ahmed, W. (2019). Applications and opportunities of supercritical fluid extraction in food processing technologies: A review *International Journal of Advanced and Applied Sciences* 6(7), 99–103.

- Majid, I., Khan, S., Aladel, A., Dar, A. H., Adnan, M., Khan, M. I., Mahgoub Awadelkareem, A., & Ashraf, S. A. (2023). Recent insights into green extraction techniques as efficient methods for the extraction of bioactive components and essential oils from foods. *CYTA - Journal of Food*, 21(1), 101–114. <https://doi.org/10.1080/19476337.2022.2157492>
- Malešević, M., Di Lorenzo, F., Filipić, B., Stanisavljević, N., Novović, K., Senerovic, L., Polović, N., Molinaro, A., Kojić, M., Jovčić, B. (2019). *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing inhibition by clinical isolate *Delftia tsuruhatensis* 11304: involvement of N-octadecanoylhomoserine lactones. *Scientific Reports*, 9(1), 16465–. doi:10.1038/s41598-019-52955-3
- Malešević, M., Stanisavljević, N., Novović, K., Polović, N., Vasiljević, Z., Kojić, M., Jovčić, B. (2020). *Burkholderia cepacia* YtnP and Y2-aiiA lactonases inhibit virulence of *Pseudomonas aeruginosa* via quorum quenching activity. *Microbial Pathogenesis*, 149:104561. doi: 10.1016/j.micpath.2020.104561.
- Martínez, P., & Martín-Belloso, O. (2007). Effects of high intensity pulsed electric field processing conditions on vitamin C and antioxidant capacity of orange juice and gazpacho, a cold vegetable soup. *Food Chemistry*, 102(1), 201–209. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.04.048>
- Matsugo, S., Sakamoto, T., Wakame, K., Nakamura, Y., Watanabe, K., & Konishi, T. (2022). Mushrooms as a Resource for Mibyou-Care Functional Food; The Role of Basidiomycetes-X (Shirayukidake) and Its Major Components. *Nutraceuticals*, 2(3), 132–149. <https://doi.org/10.3390/nutraceuticals2030010>
- Medina, M. B. (2011). Determination of the total phenolics in juices and superfruits by a novel chemical method. *Journal of Functional Foods*, 3(2), 79–87. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2011.02.007>
- Menezes, M., Bindes, M., Hespanhol, M., Reis, M., Luiz, V., & Camilla, D. (2019). Ultrasonics - Sonochemistry Ultrasound-assisted extraction of bioactive compounds from green tea leaves and clarification with natural coagulants (chitosan and *Moringa oleifera* seeds). *Ultrasonics - Sonochemistry*, 51, 111–119. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2018.10.014>
- Micić, D., Đurović, S., Riabov, P., Tomić, A., Šovljanski, O., Filip, S., Tosti, T., Dojčinović, B., Božović, R., Jovanović, D., & Blagojević, S. (2021). Rosemary essential oils as a promising source of bioactive compounds: Chemical composition, thermal properties, biological activity, and gastronomical perspectives. *Foods*, 10(11), 2734. <https://doi.org/10.3390/foods10112734>
- Miina, J., Peltola, R., Veteli, P., Linnakoski, R., Cortina, M., Sarjala, T., Silvan, N., Kurttila, M., & Vanhanen, H. (2021). Inoculation success of *Inonotus obliquus* in living birch (*Betula* spp). *Forest Ecology and Management*, 492, 119244 <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2021.119244>
- Milyuhina, A. K., Zabolalova, L. A., Kyzdarbek, U., Romazyayeva, I. R., & Kurbonova, M. K. (2021). Assessment of antimicrobial and antioxidant components of *Inonotus obliquus* extract as a food ingredient. IOP Conference Series: *Earth and Environmental Science*, 689(1), 012025. doi:10.1088/1755-1315/689/1/012025
- Mingaila, J., Čiuldiene, D., Viškelis, P., Bartkevičius, E., Vilimas, V., & Armolaitis, K. (2020). The quantity and biochemical composition of sap collected from silver birch (*Betula pendula* Roth) trees growing in different soils. *Forests*, 11(4), 365. <https://doi.org/10.3390/F11040365>
- Minh, T., Nguyet, N., Lomunova, M., Vinh, B., Sun, J., & Kyu, S. (2018). The mast cell stabilizing activity of Chaga mushroom critical for its therapeutic effect on food allergy is derived from inotodiol. *International Immunopharmacology*, 54, 286–295. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2017.11.025>

- Mironczuk-Chodakowska, I., Kujawowicz, K., & Witkowska, A. M. (2021). Beta-glucans from fungi: Biological and health-promoting potential in the covid-19 pandemic era. *Nutrients*, 13(11), 3960. <https://doi.org/10.3390/nu13113960>
- Mishra, J., Khan, W., Ahmad, S., & Misra, K. (2021). Supercritical Carbon Dioxide Extracts of *Cordyceps sinensis*: Chromatography-based Metabolite Profiling and Protective Efficacy Against Hypobaric Hypoxia. *Frontiers in Pharmacology*, 12, 628924, 1–20. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.628924>
- Mohamed, R. S., & Mansoori, G. A. (2002). The Use of Supercritical Fluid Extraction Technology in Food Processing. *Food Technology Magazine*, 20, 134–139
- Morales, D., Ribeiro, F., Villalva, M., Abreu, H., Rico, C., Santoyo, S., Iacomini, M., & Soler-rivas, C. (2019). Testing the effect of combining innovative extraction technologies on the biological activities of obtained β -glucan-enriched fractions from *Lentinula edodes*. *Journal of Functional Foods*, 60, 103446. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.103446>
- Morshedloo, M. R., Ebadi, A., Maggi, F., Fattahi, R., Yazdani, D., & Jafari, M. (2015). Chemical characterization of the essential oil compositions from Iranian populations of *Hypericum perforatum* L. *Industrial Crops and Products*, 76, 565–573. doi:10.1016/j.indcrop.2015.07.033
- Mu, H., Zhang, A., Zhang, W., Cui, G., & Wang, S. (2012). Antioxidative Properties of Crude Polysaccharides from *Inonotus obliquus*. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(7), 9194–9206. <https://doi.org/10.3390/ijms13079194>
- Murray, C. J. L., Ikuta, K.S., Sharara, F., Swetschinski, L., Aguilar, G.R., Gray, A., Han, C., Bisignano, C. (2022). Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *Lancet*, 399, 629–655. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)02724-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)02724-0)
- Nakajima, Y., Nishida, H., Matsugo, S., Konishi, T. (2009). Cancer Cell Cytotoxicity of Extracts and Small Phenolic Compounds from Chaga [*Inonotus obliquus* (persoon) Pilat]. *Journal of Medicinal Food*, 12(3), 501–507. doi:10.1089/jmf.2008.1149
- Ncube, E. N., Mhlongo, M. I., Piater, L. A., Steenkamp, P. A., Dubery, I. A., & Madala, N. E. (2014). Analyses of chlorogenic acids and related cinnamic acid derivatives from *Nicotiana tabacum* tissues with the aid of UPLC-QTOF-MS/MS based on the in-source collision-induced dissociation method. *Chemistry Central Journal*, 8(1), 66, 1–10. <https://doi.org/10.1186/s13065-014-0066-z>
- Nguyen, P. C., Tuyen, M., Nguyen, T., Truong, B. T., Kim, D., Shin, S., & Kim, J. (2023). Isolation, Physicochemical Characterization, and Biological Properties of Inotodiol, the Potent Pharmaceutical Oxysterol from Chaga Mushroom. *Antioxidants*, 12(2), 447; <https://doi.org/10.3390/antiox12020447>
- Nomura, M., Takahashi, T., Uesugi, A., Tanaka, R., & Kobayashi, S. (2008). Inotodiol, a Lanostane Triterpenoid, from *Inonotus obliquus* Inhibits Cell Proliferation through Caspase-3-dependent Apoptosis. *Anticancer research*, 28, 2691–2696
- Nowacka-Jechalke, N., Olech, M., & Nowak, R. (2018). Mushroom Polyphenols as Chemopreventive Agents. *Polyphenols: Prevention and Treatment of Human Disease*, 137–150. doi:10.1016/b978-0-12-813008-7.00011-4
- Nowak, R., Olech, M., & Nowacka, N. (2014). Plant Polyphenols as Chemopreventive Agents. *Polyphenols in Human Health and Disease*, 1289–1307. doi:10.1016/b978-0-12-398456-2.00086-4
- Okshesky, M., Meyer, Rikke L. (2015). The role of extracellular DNA in the establishment, maintenance and perpetuation of bacterial biofilms. *Critical Reviews in Microbiology*, 41(3), 341–352. doi:10.3109/1040841X.2013.841639
- Oli, A.K., R.S., Rajeshwari, Nagaveni, S., Chandrakanth, R. Biofilm formation by

- Multidrugresistant *Enterococcus faecalis* (MDEF) originated from clinical samples. (2012). *Journal of Microbiology and Biotechnology Research*, 2(2), 284-288
- Oteef, M. D. Y. (2022). Comparison of Different Extraction Techniques and Conditions for Optimizing an HPLC-DAD Method for the Routine Determination of the Content of Chlorogenic Acids in Green Coffee Beans. *Separations*, 9(12), 396. <https://doi.org/10.3390/separations9120396>
- Özyürek, M., Bener, M., & Güçlü, K. (2014). Antioxidant / antiradical properties of microwave-assisted extracts of three wild edible mushrooms. *Food Chemistry*, 157, 323–331. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.02.053>
- Özyürek, M., Güçlü, K., & Apak, R. (2011). The main and modified CUPRAC methods of antioxidant measurement. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 30(4), 652–664. doi:10.1016/j.trac.2010.11.016
- Pal, B., Sougata, S., & Chauhan, A. (2021). Development , dynamics and control of antimicrobial - resistant bacterial biofilms : a review *Environmental Chemistry Letters*, 19(3), 1983–1993. <https://doi.org/10.1007/s10311-020-01169-5>
- Paluch, E., Rewak-Soroczyńska, J., Jędrusik, I., Mazurkiewicz, E., Jermakow, K. (2020). Prevention of biofilm formation by quorum quenching. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104, 1871–1881. doi:10.1007/s00253-020-10349-w
- Pan, X., Jiang, L., Chu, Y., Gao, S., Jiang, X., Zhang, Y., Chen, Y., Luo, S., & Peng, C. (2022). The Biological Activity Mechanism of Chlorogenic Acid and Its Applications in Food Industry: A Review *Frontiers in Nutrition*, 9, 943911, 1–22. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.943911>
- Papoutsis, K., Vuong, Q. V, Pristijono, P., Golding, J. B., Bowyer, M. C., Scarlett, C. J., & Stathopoulos, C. E. (2016). Enhancing the Total Phenolic Content and Antioxidants of Lemon Pomace Aqueous Extracts by Applying UV-C Irradiation to the Dried Powder. *Foods*, 5(3), 55. <https://doi.org/10.3390/foods5030055>
- Park, Y.-M., Won, J.-H., Kim, Y.-H., Choi, J.-W., Park, H.-J., & Lee, K.-T. (2005). *In vivo* and *in vitro* anti-inflammatory and anti-nociceptive effects of the methanol extract of *Inonotus obliquus*. *Journal of Ethnopharmacology*, 101(1-3), 120–128. doi:10.1016/j.jep.2005.04.003
- Parrino, B., Carbone, D., Cirrincione, G., Diana, P., Cascioferro, S. (2020). Inhibitors of Antibiotic Resistance Mechanisms: Clinical Applications and Future Perspectives. *Future Medicinal Chemistry*, 357-359. <https://doi.org/10.4155/fmc-2019-0326>
- Paterson, R. R. M., & Lima, N. (2014). Biomedical Effects of Mushrooms with Emphasis on Pure Compounds. *Biomedical journal*, 37, 375-368. doi: 10.4103/2319-4170.143502
- Peng, H., & Shahidi, F. (2022). Qualitative analysis of secondary metabolites of chaga mushroom (*Inonotus obliquus*): phenolics, fatty acids, and terpenoids. *Journal of Food Bioactives*, 17, 56–72. <https://doi.org/10.31665/jfb.2022.17304>
- Périno-Issartier, S., Zill-e-Huma, Abert-Vian, M., Chemat, F. (2011). Solvent Free Microwave-Assisted Extraction of Antioxidants from Sea Buckthorn (*Hippophae rhamnoides*) Food By-Products. *Food Bioprocess Technology*, 4(6), 1020 – 1028. doi:10.1007/s11947-010-0438-x
- Peterson, E., & Kaur, P. (2018). Antibiotic Resistance Mechanisms in Bacteria: Relationships Between Resistance Determinants of Antibiotic Producers, Environmental Bacteria, and Clinical Pathogens. *Frontiers in Microbiology*, 9, 2928. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02928>
- Petrović, J., Papandreou, M., Glamočlija, J., Ćirić, A., Baskakis, C., Proestos, C., Fotini, L., Panagiotis, Z., Soković, M. (2014). Different extraction methodologies and their influence on the bioactivity of the wild edible mushroom *Laetiporus sulphureus* (Bull.) Murrill. *Food Function.*, 5(11), 2948–2960. doi:10.1039/c4fo00727a

- Picot-Allain, C., Mahomoodally, M. F., Ak, G., & Zengin, G. (2021). Conventional versus green extraction techniques - a comparative perspective. *Current Opinion in Food Science*, 40, 144–156. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2021.02.009>
- Platzer, M., Kiese, S., Herfellner, T., Schweiggert-Weisz, U., Miesbauer, O., & Eisner, P. (2021). Common trends and differences in antioxidant activity analysis of phenolic substances using single electron transfer based assays. *Molecules*, 26(5), 1244. <https://doi.org/10.3390/molecules26051244>
- Pompilio, A., Scocchi, M., Mangoni, M. L., Shirooie, S., Serio, A., Ferreira, Y., Alves, M. S., Karatoprak, Ş., Süntar, I., Khan, H., Bonaventura, G. Di, (2023). Bioactive compounds: a goldmine for defining new strategies against pathogenic bacterial biofilms. *Critical Reviews in Microbiology*, 49(1), 117–149. <https://doi.org/10.1080/1040841X.2022.2038082>
- Prestinaci, F., Pezzotti, P., & Pantosti, A. (2015). Antimicrobial resistance: a global multifaceted phenomenon. *Pathogens and Global Health*, 109(7), 309-318. <https://doi.org/10.1179/2047773215Y.0000000030>
- Quiroz, J. Q., Torres, A.C., Ramirez, L. M., Garcia, M.S., Gomez, G.C., and Camargo, J.R. (2019). Optimization of the Microwave-Assisted Extraction Process of Bioactive Compounds from Annatto Seeds (*Bixa orellana* L.). *Antioxidants*, 8, 37. doi:10.3390/antiox8020037
- Rafiee, Z., Jafari, S. M., Alami, M., & Khomeiri, M. (2011). Microwave-assisted extraction of phenolic compounds from olive leaves; a comparison with maceration. *The Journal of Animal & Plant Sciences*, 21(4), 738-745.
- Raj, B.; John, S.; Chandrakala, V.; Kumari, G.H. (2023). Green extraction techniques for phytoconstituents from natural products. In *Medicinal Plants*; Kumar, S., Ed.; IntechOpen Ltd.: London, UK.
- Ratajczak, M., Kamińska, D., Nowak-Malczewska, D., Schneider, A., Długaszewska, J. (2021). Relationship between antibiotic resistance biofilm formation, genes coding virulence factors and source of origin of *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 28(2), 306–313. <https://doi.org/10.26444/aaem/122682>
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9-10), 1231–1237. doi:10.1016/s0891-5849(98)00315-3
- Reiser, J. (1995). Autoinducer-mediated regulation of rhamnolipid biosurfactant synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(14), 6424–6428. doi:10.1073/pnas.92.14.6424
- Ren, L., Hemar, Y., Perera, C. O., Lewis, G., Krissansen, G. W., & Buchanan, P. K. (2014). Antibacterial and antioxidant activities of aqueous extracts of eight edible mushrooms. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*, 3(2), 41–51. <https://doi.org/10.1016/j.bcdf.2014.01.003>
- Rodrigues Barbosa, J., dos Santos Freitas, M. M., da Silva Martins, L. H., & de Carvalho, R. N. (2020). Polysaccharides of mushroom *Pleurotus* spp.: New extraction techniques, biological activities and development of new technologies. *Carbohydrate Polymers*, 229, 115550. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115550>
- Rodríguez-Seoane, P., Torres Perez, M. D., Fernández de Ana, C., Sinde-Stompel, E., & Domínguez, H. (2022). Antiradical and functional properties of subcritical water extracts from edible mushrooms and from commercial counterparts. *International Journal of Food Science and Technology*, 57(3), 1420–1428. <https://doi.org/10.1111/ijfs.15383>

- Rodsamran, P., & Sothornvit, R. (2019). Food Bioscience Extraction of phenolic compounds from lime peel waste using ultrasonic- assisted and microwave-assisted extractions. *Food Bioscience*, 28, 66–73. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2019.01.017>
- Rogers, R. (2016). *Mushroom essences: vibrational healing from the kingdom fungi*. North Atlantic Books.
- Roselló-Soto, E., Parniakov, O., Deng, Q., Patras, A., Koubaa, M., Grimi, N., Boussetta, N., Tiwari, B. K., Vorobiev, E., Lebovka, N., & Barba, F. J. (2016). Application of Non-conventional Extraction Methods: Toward a Sustainable and Green Production of Valuable Compounds from Mushrooms. *Food Engineering Reviews*, 8(2), 214–234. <https://doi.org/10.1007/s12393-015-9131-1>
- Sadekuzzaman, M., Yang, S., Mizan, M.F.R., Ha, S.D. (2015). Current and Recent Advanced Strategies for Combating Biofilms. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 14(4), 491–509. doi:10.1111/1541-4337.12144
- Sahena, F., Zaidul, I. S. M., Jinap, S., Karim, A. A., Abbas, K. A., Norulaini, N. A. N., & Omar, A. K. M. (2009). Application of supercritical CO₂ in lipid extraction. A review *Journal of Food Engineering*, 95(2), 240–253. doi:10.1016/j.jfoodeng.2009.06.026
- Salinas, F., Vardanega, R., Espinosa-álvarez, C., Jiménez, D., Ruiz-domínguez, M. C., Meireles, M. A. A., Bugue, W., & Mezquita, P. C. (2020). Supercritical fluid extraction of of chañar (*Geoffroea decorticans*) almond oil: Global yield, kinetics and oil characterization. *The Journal of Supercritical Fluids*, 161, 104824. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2020.104824>
- Sánchez, C. (2017). Reactive oxygen species and antioxidant properties from mushrooms. *Synthetic and Systems Biotechnology*, 2(1), 13–22. doi:10.1016/j.synbio.2016.12.001
- Saar, M. (1991). Fungi in khanty folk medicine. *Journal of Ethnopharmacology*, 31(2), 175–179. [https://doi.org/10.1016/0378-8741\(91\)90003-V](https://doi.org/10.1016/0378-8741(91)90003-V).
- Saxena, P., Joshi, Y., Rawat, K., Bisht, R. (2018). Biofilms: Architecture, Resistance, Quorum Sensing and Control Mechanisms. *Indian Journal of Microbiology*, 59(1), 3–12 doi:10.1007/s12088-018-0757-6
- Scerbak, C., Vayndorf, E. M., Hernandez, A., McGill, C., & Taylor, B. E. (2016). Mechanosensory Neuron Aging: Differential Trajectories with Lifespan-Extending Alaskan Berry and Fungal Treatments in *Caenorhabditis elegans*. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 8, 173. doi:10.3389/fnagi.2016.00173
- Scheffler, Armin. (2019). The Wound Healing Properties of Betulin from Birch Bark from Bench to Bedside. *Planta Medica*, 524–527. doi:10.1055/a-0850-0224
- Schwermer, C. U., Lavik, G., Abed, R. M. M., Dunsmore, B., Ferdelman, T. G., Stoodley, P., Gieseke, A., de Beer, D. (2008). Impact of Nitrate on the Structure and Function of Bacterial Biofilm Communities in Pipelines Used for Injection of Seawater into Oil Fields. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(9), 2841–2851. doi:10.1128/aem.02027-07
- Seo, H. K., & Lee, S. C. (2010). Antioxidant activity of subcritical water extracts from chaga mushroom (*Inonotus obliquus*). *Separation Science and Technology*, 45(2), 198–203. <https://doi.org/10.1080/01496390903423899>
- Sharma, E., Anand, G., & Kapoor, R. (2017). Terpenoids in plant and arbuscular mycorrhiza-reinforced defence against herbivorous insects. *Annals of Botany*, 119, 791–801. doi:10.1093/aob/mcw263
- Sharma, G., Rao, S., Bansal, A., Dang, S., Gupta, S., & Gabrani, R. (2013). *Pseudomonas aeruginosa* biofilm: Potential therapeutic targets. *Biologicals*, 42(1), 1–7. doi:10.1016/j.biologicals.2013.11.001
- Shcherbakov, D. N., Kukina, T. P., Elshin, I. A., Panteleeva, N. V., Teplyakova, T. V., & Salnikova, O. I. (2022). GC-MS analysis of lipophilic Chaga mushroom constituents.

- AIP Conference Proceedings*, 2390(1). <https://doi.org/10.1063/5.0070158>
- Shikov, A. N., Pozharitskaya, O. N., Makarov, V. G., Wagner, H., Verpoorte, R., & Heinrich, M. (2014). Medicinal Plants of the Russian Pharmacopoeia; their history and applications. *Journal of Ethnopharmacology*, 154(3), 481–536. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2014.04.007>
- Shomali N, Onar O, Karaca B, Demirtas N, Cihan AC, Akata I, Yildirim, O. (2019). Antioxidant, anticancer, antimicrobial, and antibiofilm properties of the culinary-medicinal fairy ring mushroom, *Marasmius oreades* (Agaricomycetes). *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 21 (6), 571-582. doi: 10.1615/IntJMedMushrooms.2019030874
- Siddeeg, A., Alkehayez, N. M., Abu-hiamed, H. A., Al-sanea, E. A., & Al-farga, A. M. (2021). Mode of action and determination of antioxidant activity in the dietary sources: An overview. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 28(3), 1633–1644. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.11.064>
- Simić, S., Aćimović, M., Vidović, S., Banožić, M., & Vladić, J. (2021). *Viola odorata*: Influence of supercritical fluid extraction on the efficiency of ultrasound- and microwave-assisted extraction of bioactive compounds. *Croatian Journal of Food Science and Technology*, 13(2), 191–200. <https://doi.org/10.17508/cjfst.2021.13.2.08>
- Singh, N. P., McCoy, M. T., Tice, R. R., & Schneider, E. L. (1988). A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research*, 175(1), 184–191. doi:10.1016/0014-4827(88)90265-0
- Singdevsachan, S. K., Auroshree, P., Mishra, J., Baliyarsingh, B., Tayung, K., & Thatoi, H. (2016). Mushroom polysaccharides as potential prebiotics with their antitumor and immunomodulating properties: A review *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*, 7(1), 1–14. doi:10.1016/j.bcdf.2015.11.001
- Slobodníková, L.; Fialová, S.; Hupková, H.; Grančai, D. (2013). Rosmarinic Acid Interaction with Planktonic and Biofilm *Staphylococcus aureus*. *Natural Product Communications*, 8(12), 1747–1750. doi:10.1177/1934578X1300801223
- Smiderle, F. R., Morales, D., Gil-Ramírez, A., de Jesus, L. I., Gilbert-López, B., Iacomini, M., & Soler-Rivas, C. (2017). Evaluation of microwave-assisted and pressurized liquid extractions to obtain β-D-glucans from mushrooms. *Carbohydrate Polymers*, 156, 165–174. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.09.029>
- Sofrenić, I., Anđelković, B., Todorović, N., Stanojković, T., Vujisić, Lj., Novaković, M., Milosavljević, S., & Tešević, V. (2021). Phytochemistry Cytotoxic triterpenoids and triterpene sugar esters from the medicinal mushroom *Fomitopsis betulina*. *Phytochemistry*, 181, 112580 <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2020.112580>
- Softa, M., Percoco, G., Lati, E., & Bony, P. (2019). Birch Sap (*Betula alba*) and Chaga Mushroom (*Inonotus obliquus*) Extracts Show Anti-Oxidant, Anti-Inflammatory and DNA Protection/ Repair Activity *In Vitro*. *Journal of Cosmetics, Dermatological Sciences and Applications*, 9(2), 188–205. <https://doi.org/10.4236/jcdsa.2019.92016>
- Song, F., Liu, Y., Kong, X., Chang, W., & Song, G. (2013). MINI-REVIEW Progress on Understanding the Anticancer Mechanisms of Medicinal Mushroom: *Inonotus obliquus*. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 14(3), 1571-8 <https://doi.org/10.7314/APJCP.2013.14.3.1571>
- Sousa, T. De, Michel, H., Dapkevicius, M. L. N. E., Pereira, E., Capita, R., Alonso-calleja, C., & Igrejas, G. (2021). Genomic and Metabolic Characteristics of the Pathogenicity in *Pseudomonas aeruginosa*. *International Journal of Molecular Sciences*, 22, 12892. <https://doi.org/10.3390/ijms222312892>
- Staniszewska, J., Szymański, M., & Ignatowicz, E. W. A. (2017). Antitumor and immunomodulatory activity of *Inonotus obliquus*. *Herba Polonica*, 63(2), 48–58.

<https://doi.org/10.1515/hepo-2017-0013>

- Stepanović, S., Vuković, D., Dakić, I., Savić, B., & Švabić-Vlahović, M. (2000). A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *Journal of Microbiological Methods*, 40(2), 175–179. doi:10.1016/s0167-7012(00)00122-6
- 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 Histochemica*, 120(3), 159-167. <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2018.02.005>
- Su, C., Lai, M., & Ng, L. (2017). Effects of different extraction temperatures on the physicochemical properties of bioactive polysaccharides from *Grifola frondosa*. *Food Chemistry*, 220, 400–405. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.09.181>
- Sudha, G., Vadivukkarasi, S., Babu, R., Shree, 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>
- Sułkowska-Ziaja, K., Robak, J., Szczepkowski, A., Gunia-Krzyzak, A., Popiół, J., Piotrowska, J., Rospond, B., Szewczyk, A., Kała, K. & Muszynska, B. (2023). Comparison of Bioactive Secondary Metabolites and Cytotoxicity of Extracts from *Inonotus obliquus* Isolates from Different Host Species. *Molecules* 2023, 28(13), 4907; <https://doi.org/10.3390/molecules28134907>
- Sun, J.-E., Ao, Z.-H., Lu, Z.-M., Xu, H.-Y., Zhang, X.-M., Dou, W.-F., & Xu, Z.-H. (2008). Antihyperglycemic and antilipidperoxidative effects of dry matter of culture broth of *Inonotus obliquus* in submerged culture on normal and alloxan-diabetes mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 118(1), 7–13. doi:10.1016/j.jep.2008.02.030
- Sun, Y., He, H., Wang, Q., Yang, X., Jiang, S., & Wang, D. (2022). A Review of Development and Utilization for Edible Fungal Polysaccharides: Extraction, Chemical Characteristics, and Bioactivities. *Polymers*, 14(20), 4454. <https://doi.org/10.3390/polym14204454>
- Süntar, I., Oyardı, O., Akkol, E. K., & Özçelik, B. (2016). Antimicrobial effect of the extracts from *Hypericum perforatum* against oral bacteria and biofilm formation. *Pharmaceutical Biology*, 1-6. <https://doi.org/10.3109/13880209.2015.1102948>
- Szczepkowski A, Piętko J, Grzywacz A. (2013). [Biology and medicinal properties of the chaga mushroom *Inonotus obliquus* (Fr.) Pilat]. *Sylwan*. 157(3), 223–233
- Szychowski, K. A., Rybczy, K., Tobiasz, J., Yelnytska-stawasz, V., Pomianek, T., & Gmi, J. (2018). Biological and anticancer properties of *Inonotus obliquus* extracts. *Process Biochemistry*. 73, 180-187. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2018.07.015>
- Tang, K., & Zhang, X. (2014). Quorum Quenching Agents: Resources for Antivirulence Therapy. *Marine Drugs*, 12(6), 3245–3282. <https://doi.org/10.3390/md12063245>
- Tchachedre, M., Kiendrebeogo, M., & Lagnika, L. (2019). Anti-Quorum Sensing, Antibacterial, Antioxidant Activity and Acute Oral Toxicity of *Acacia hockii* De Wild. (*Fabaceae*). *EC MICROBIOLOGY Research*, 15(8), 744-758.
- Tepljakova, T. V, Ilyicheva, T. N., & Markovich, N. A. (2020). Prospects for the Development of Anti-Influenza Drugs Based on Medicinal Mushrooms (Review). *Applied Biochemistry and Microbiology*, 56(5), 489–496. <https://doi.org/10.1134/S0003683820050142>
- Terreni, M., Taccani, M., & Pregnolato, M. (2021). New Antibiotics for Multidrug-Resistant Bacterial Strains: Latest Research Developments and Future Perspectives. *Molecules*, 26(9), 2671; <https://doi.org/10.3390/molecules26092671>
- Theuretzbacher, U., Bush, K., Harbarth, S., Paul, M., Rex, J. H., Tacconelli, E., & Thwaites, G. E. (2020). Critical analysis of antibacterial agents in clinical development. *Nature Reviews Microbiology*. 18, 286–298. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-0340-0>

- Thirugnanasambandham, K., Sivakumar, V., & Maran, J. P. (2015). Microwave-assisted extraction of polysaccharides from mulberry leaves. *International Journal of Biological Macromolecules*, 72, 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.07.031>
- Thomas, P. W., Elkhateeb, W. A., & Daba, G. M. (2020). Chaga (*Inonotus obliquus*): a medical marvel but a conservation dilemma? *Sydowia*, 72, 123–130. <https://doi.org/10.12905/0380.sydowia72-2020-0123>
- Tiwari, B. K. (2015). Ultrasound: A clean, green extraction technology. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 71, 100–109. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.04.013>
- Tomšik, A., Pavlič, B., Vladić, J., Cindrić, M., Jovanov, P., Sakač, M., Mandić, A., & Vidović, S. (2017). Subcritical water extraction of wild garlic (*Allium ursinum* L.) and process optimization by response surface methodology. *The Journal of Supercritical Fluids* 128, 79–88. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2017.05.012>
- Tran, H. M., Tran, H., Booth, M. A., Fox, K. E., Nguyen, T. H., Tran, N., & Tran, P.A. (2020). Nanomaterials for Treating Bacterial Biofilms on Implantable Medical Devices. *Nanomaterials*, 10(11), 2253. <https://doi.org/10.3390/nano10112253>
- Tuon, F. F., Dantas, L. R., Suss, P. H., Stadler, V., & Ribeiro, T. (2022). Pathogenesis of the *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm. A Review *Pathogens*, 11(3), 300, <https://doi.org/10.3390/pathogens11030300>
- Uluseker, C., Kaster, K. M., Thorsen, K., Basiry, D., Shobana, S., Jain, M., Kumar, G., Kommedal, R., & Marti, E. (2021). A Review on Occurrence and Spread of Antibiotic Resistance in Wastewaters and in Wastewater Treatment Plants: Mechanisms and Perspectives. *Frontiers in Microbiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.717809>
- Upska, K., Klavins, L., Radenkovs, V., Nikolajeva, V., Faven, L., Isosaari, E., Lauberts, M., Busa, L., Viksna, A., & Klavins, M. (2023). Extraction possibilities of lipid fraction and authentication assessment of chaga (*Inonotus obliquus*). *Biomass Conversion and Biorefinery*, 13(15), 14005–14021. <https://doi.org/10.1007/s13399-021-02210-5>
- Valadez-Carmona, L., Ortiz-Moreno, A., Ceballos-Reyes, G., Mendiola, J. A., & Ibáñez, E. (2018). Valorization of cacao pod husk through supercritical fluid extraction of phenolic compounds. *The Journal of Supercritical Fluids*, 131, 99–105. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2017.09.011>
- Vandermolen, K. M., Little, J. G., Sica, V. P., El-elimat, T., Raja, H. A., Oberlies, N. H., Baker, T. R., & Mahony, C. (2017). Safety assessment of mushrooms in dietary supplements by combining analytical data with *in silico* toxicology evaluation. *Food and Chemical Toxicology*, 103, 133–147. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.03.005>
- Varaee, M., Honarvar, M., Eikani, M. H., & Omidkhah, Moraki, R. (2019). Supercritical fluid extraction of free amino acids from sugar beet and sugar cane molasses. *The Journal of Supercritical Fluids*, 144, 48–55. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2018.10.007>
- Velazquez, E., Tournier, H. A., Saavedra, Mordujovich de Buschiazzo, P., Saavedra, G., & Schinella, G. R. (2003). Antioxidant activity of Paraguayan plant extracts. *Fitoterapia*, 74(1-2), 91–97. doi:10.1016/s0367-326x(02)00293-9
- Vestby, L. K., Grønseth, T., & Simm, R. & Ness, L.L. (2020). Bacterial Biofilm and its Role in the Pathogenesis of Disease. *Antibiotics*, 9(2), 59. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9020059>
- Vidović, S., Mujić, I., Zeković, Ž., Lepojević, Ž., Milošević, S., & Jokić, S. (2011). Extraction of Fatty Acids from *Boletus edulis* by Subcritical and Supercritical Carbon Dioxide. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 88(8), 1189–1196. doi:10.1007/s11746-011-1772-5
- Vieira, V., Barros, L., Martins, A., & Ferreira, I. C. F. R. (2016). Nutritional and biochemical profiling of *Leucopaxillus candidus* (Bres.) singerwild mushroom. *Molecules*, 21(1), 99.

- <https://doi.org/10.3390/molecules21010099>
- Vladić, J., Jakovljević Kovač, M., Pavić, V., Jokić, S., Simić, S., Paiva, A., Jerković, I., & Duarte, A. R. (2023). Towards a Greener Approach for Biomass Valorization: Integration of Supercritical Fluid and Deep Eutectic Solvents. *Antibiotics*, 12, 1031. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12061031>
- Vladić, J., Nastić, N., Stanojković, T., Žizak, Z., Cakarević, J., Popović, L., & Vidović, S. (2019). Subcritical water for recovery of polyphenols from comfrey root and biological activities of extracts. *Acta Chimica Slovenica*, 66(2), 473–483. <https://doi.org/10.17344/acsi.2019.5011>
- Vunduk, J., Klaus, A., Lazić, V., Kozarski, M., Radić, D., Šovljanski, O., & Pezo, L. (2023). Artificial Neural Network Prediction of Antiadhesion and Antibiofilm-Forming Effects of Antimicrobial Active Mushroom Extracts on Food-Borne Pathogens. *Antibiotics*, 12(3), 627; <https://doi.org/10.3390/antibiotics12030627>
- Wah, K., Tang, K., Millar, B. C., Moore, J. E., & Moore, J. E. (2023). Antimicrobial Resistance (AMR). *British Journal of Biomedical Science*, 80, 1–11. <https://doi.org/10.3389/bjbs.2023.11387>
- Wang, C., Chen, Z., Pan, Y., Gao, X., & Chen, H. (2017). Anti-diabetic effects of *Inonotus obliquus* polysaccharides-chromium (III) complex in type 2 diabetic mice and its sub-acute toxicity evaluation in normal mice. *Food and Chemical Toxicology*, 108, 498–509. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.01.007>
- Wang, Q., Mu, H., Zhang, L., Dong, D., Zhang, W., & Duan, J. (2015). Characterization of two water-soluble lignin metabolites with antiproliferative activities from *Inonotus obliquus*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 74(20120731), 507–514. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.12.044>
- Wang, Y., Gao, L., Rao, X., Wang, J., Yu, H., Jiang, J., & Zhou, W., Wang, W., Xiao, J., Mengwen, L., Zhang, Y., Kebin, Z., Li, S., & Ziyu, H. (2018). Characterization of *lasR* -deficient clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Scientific Reports*, 8(1), 13344. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-30813-y>
- Wang, Yu, Ouyang, F., Teng, C., & Qu, J. (2021). Optimization for the extraction of polyphenols from *Inonotus obliquus* and its antioxidation activity. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 51(9), 852–859. <https://doi.org/10.1080/10826068.2020.1864642>
- Wang, Y., Jia, J., Ren, X., Li, B., & Zhang, Q. (2018). Extraction, preliminary characterization and *in vitro* antioxidant activity of polysaccharides from *Oudemansiella radicata* mushroom. *International Journal of Biological Macromolecules*, 120, 1760 - 1769. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.09.209>
- Welsh, M. A., Eibergen, N. R., Moore, J. D., & Blackwell, H. E. (2014). Small Molecule Disruption of Quorum Sensing Cross-Regulation in *Pseudomonas aeruginosa* Causes Major and Unexpected Alterations to Virulence Phenotypes. *Journal of the American Chemical Society*, 137(4), 1510–1519. <https://doi.org/10.1021/ja5110798>
- Wen, L., Zhang, Z., Sun, D., Sivagnanam, S. P., & Tiwari, B. K. (2019). Combination of emerging technologies for the extraction of bioactive compounds. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 60(11), 1826-1841. <https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1602823>
- Wontcheu Fotso, Y. A., Ghazi, S., Belkaid, A., Soucy, J., Tremblay, L., Lamarre, S., Clarisse, O., & Touaibia, M. (2023). Extraction, Chemical Composition, Antiradical Capacity, and Photoprotective Effect of *Inonotus obliquus* from Eastern Canada. *Nutraceuticals*, 3(3), 380–402. <https://doi.org/10.3390/nutraceuticals3030029>
- WHO. 2018. Thirteenth General Programme of Work 2019–2023. World Health Organization, Geneva (2018), <https://www.who.int/about/what-wedo/>

- World Health Organization. Antimicrobial Resistance: Global Report on Surveillance; World Health Organization: Geneva, Switzerland, 2014; Available online: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/112642> (accessed on 19 December 2021).
- Wu, H., Li, C., Li, Z., Liu, R., Zhang, A., Xiao, Z., Ma, L., Li, J., & Deng, S. (2018). Simultaneous extraction of oil and tea saponin from *Camellia oleifera* Abel. seeds under subcritical water conditions. *Fuel Processing Technology*, 174, 88–94. <https://doi.org/10.1016/j.fuproc.2018.02.014>
- Xi, Y. (2017). Subcritical Water Extraction and Characterization of Polysaccharides and Phenolic Compounds from *Inonotus obliquus*. Doctoral dissertation.
- Xu, L., Yu, Y., Sang, R., Ge, B., Wang, M., Zhou, H., & Zhang, X. (2019). *Inonotus obliquus* polysaccharide protects against adverse pregnancy caused by *Toxoplasma gondii* infection through regulating Th17/Treg balance via TLR4/NF- κ B pathway. *International Journal of Biological Macromolecules*, 146, 832–840. doi:10.1016/j.ijbiomac.2019.10.051
- Yan, S., Pan, C., Yang, X., Chen, S., Qi, B., & Huang, H. (2021). Degradation of *Codium cylindricum* polysaccharides by H₂O₂-Vc-ultrasonic and H₂O₂-Fe²⁺-ultrasonic treatment: Structural characterization and antioxidant activity. *International Journal of Biological Macromolecules*, 182, 129–135. doi:10.1016/j.ijbiomac.2021.03.193
- Yano, Y., Satomi, M., & Oikawa, H. (2006). Antimicrobial effect of spices and herbs on *Vibrio parahaemolyticus*. *International Journal of Food Microbiology*, 111(1), 6–11. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.04.031>
- Yn, P., Maza, M. A., Lee, J., Kim, Y., Sun, G., Sung, Y., Ponomarenko, L. P., Stonik, V. A., & Ryu, M. (2021). Inotodiol From *Inonotus obliquus* Chaga Mushroom Induces Atypical Maturation in Dendritic Cells. *Frontiers in Immunology* 12, 1–16. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.650841>
- Yoo, H. U., Ko, M. J., & Chung, M. S. (2020). Hydrolysis of beta-glucan in oat flour during subcritical-water extraction. *Food Chemistry*, 308, 125670. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125670>
- Youn, M., Kim, J., Park, S., Kim, Y., Park, C., Sook, E., Park, K., Seob, H., & Park, R. (2009). Potential anticancer properties of the water extract of *Inonotus obliquus* by induction of apoptosis in melanoma B16-F10 cells. *Journal of Ethnopharmacology*, 121, 221–228. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2008.10.016>
- Yu, J., Xiang, H. & Xie, Q. (2021). The difference of regulatory effect of two *Inonotus obliquus* extracts on high-fat diet mice in relation to the fatty acid elongation function of gut microbiota. *Food Science & Nutrition*, 9, 449–458. <https://doi.org/10.1002/fsn3.2012>
- Yue, F., Zhang, J., Xu, J., Niu, T., Lü, X., & Liu, M. (2022). Effects of monosaccharide composition on quantitative analysis of total sugar content by phenol-sulfuric acid method. *Frontiers in Nutrition*, 9(3). <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.963318>
- Yulianto, M. E., Hartati, I., & Amalia, R. (2018). Response surface methodology of pressurized liquid water extraction of curcumin from *Curcuma domestica* Val.. *11*(4), 1564–1571.
- Zakaria, S. M., & Kamal, S. M. M. (2016). Subcritical Water Extraction of Bioactive Compounds from Plants and Algae: Applications in Pharmaceutical and Food Ingredients. *Food Engineering Reviews*, 8(1), 23–34. <https://doi.org/10.1007/s12393-015-9119-x>
- Zhang, C., Guo, J., Cheng, H., Li, L., Liu, Y., Shi, Y., Xu, J., & Yu, H. (2020). Spatial structure and anti-fatigue of polysaccharide from *Inonotus obliquus*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 151, 855–860. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.02.147>

- Zhang, H., Yang, X., & Wang, Y. (2011). Microwave assisted extraction of secondary metabolites from plants: Current status and future directions. *Trends in Food Science & Technology*, 22(12), 672–688. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2011.07.003>
- Zhang, L., Zhang, H., Liang, X., Zhang, H., Zhang, T., & Liu, F. (2013). Melatonin ameliorates cognitive impairment induced by sleep deprivation in rats: Role of oxidative stress, BDNF and CaMKII. *Behavioural Brain Research*, 256, 72-81. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2013.07.051>
- Zhang, X., Bao, C., & Zhang, J. (2018). Biomedicine & Pharmacotherapy Inotodiol suppresses proliferation of breast cancer in rat model of type 2 diabetes mellitus via downregulation of β -catenin signaling. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 99, 142–150. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.12.084>
- Zhao, J., Li, X., Hou, X., Quan, C., & Chen, M. (2019). Widespread Existence of Quorum Sensing Inhibitors in Marine Bacteria: Potential Drugs to Combat Pathogens with Novel Strategies. *Marine Drugs*, 17(5), 275; <https://doi.org/10.3390/md17050275>
- Zhao, X., Zhao, F., Wang, J., & Zhong, N. (2017). Biofilm formation and control strategies of foodborne pathogens: food safety perspectives. *RSC Advances*, 7(58), 36670–36683. doi:10.1039/c7ra02497e
- Zhao, Y. X., & Zheng, W.-F. (2021). Deciphering the antitumoral potential of the bioactive metabolites from medicinal mushroom *Inonotus obliquus*. *Journal of Ethnopharmacology*, 265, 113321. doi:10.1016/j.jep.2020.113321
- Zhao, Yong, Song, J., Wang, J., Yang, J., Wang, Z., & Liu, Y. (2016). Optimization of cellulase-assisted extraction process and antioxidant activities of polysaccharides from *Tricholoma mongolicum* Imai. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96(13), 4484–4491. <https://doi.org/10.1002/jsfa.7662>
- Zheng, W., Miao, K., Liu, Y., Zhao, Y., Zhang, M., Pan, S. & Dai, Y. (2010). Chemical diversity of biologically active metabolites in the sclerotia of *Inonotus obliquus* and submerged culture strategies for up-regulating their production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87, 1237–1254. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2682-4>
- Zheng, W., Zhang, M., Zhao, Y., Wang, Y., Miao, K., & Wei, Z. (2009). Accumulation of antioxidant phenolic constituents in submerged cultures of *Inonotus obliquus*. *Bioresource Technology*, 100(3), 1327–1335. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.05.002>
- Zhou, L., & Wang, X. (2015). *Inonotus griseus* sp. nov. from eastern China, *Mycotaxon*, 130(3), 661-669. <https://doi.org/10.5248/130.661>
- Zhu, Y., Li, Q., Mao, G., Zou, Y., Feng, W., Zheng, D., Wang, W., Zhou, L., Zhang, T., Yang, J., Yang, L., & Wu, X. (2014). Optimization of enzyme-assisted extraction and characterization of polysaccharides from *Hericium erinaceus*. *Carbohydrate Polymers*, 101, 606–613. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.09.099>
- Zhu, Z., Guan, Q., Guo, Y., He, J., Liu, G., Li, S., Barba, F. J., & Jaffrin, M. Y. (2016). Green ultrasound-assisted extraction of anthocyanin and phenolic compounds from purple sweet potato using response surface methodology. *International Agrophysics* 30,113–122. <https://doi.org/10.1515/intag-2015-0066>
- Zmitrovich, I.V., Denisova, N.P., Balandaykin, M. E., J., Belova, N. V., Bondartseva, A., Perevedentseva, L. G., et al. (2020). Chaga and its bioactive complexes: history and perspectives. *Pharmacy formulas*, (2), 84–93. doi:10.17816/phf34803

PRILOZI

Prilog 1. Sadržaj različitih šećera u ekstraktima mongolske *I. obliquus* dobijenih različitim zelenim tehnikama ekstrakcije (g/kg)

g/kg		IM-MW 96% ETOH	IM- MW 50% ETOH	IM- MW water	IM- VAE 96% ETOH	IM- VAE 50% ETOH	IM- VAE water	IM- SWE 200°C	IM- SWE 120°C
Sorbitol	avg	1.552	1.986	2.014	2.024	2.236	2.526	4.775	4.769
	sd	0.021 ^{bc}	0.034 ^e	0.022 ^e	0.053 ^e	0.085 ^f	0.102 ^g	0.039 ⁱ	0.118 ⁱ
	RSD	1.350	1.712	1.112	2.622	3.790	4.028	0.824	2.472
Trehaloza	avg	0.256	0.335	0.825	0.785	0.896	0.994	1.107	0.606
	sd	0.003 ^{ab}	0.005 ^{cd}	0.009 ⁱ	0.013 ⁱ	0.020 ^j	0.022 ^k	0.031 ^l	0.004 ^g
	RSD	1.108	1.464	1.102	1.684	2.270	2.164	2.770	0.670
Arabinoza	avg	0.452	0.501	0.689	1.087	1.552	1.583	1.715	1.645
	sd	0.010 ^d	0.011 ^d	0.017 ^e	0.023 ^f	0.032 ^h	0.026 ^h	0.042 ^j	0.033 ^{ij}
	RSD	2.170	2.104	2.462	2.136	2.046	1.316	2.470	1.992
Glukoza	avg	16.789	18.663	21.023	22.657	25.852	28.114	64.545	54.842
	sd	0.316 ^a	0.371 ^b	0.368 ^c	0.044 ^{cd}	0.036 ^f	0.571 ^h	0.733 ^k	0.924 ^j
	RSD	1.884	1.986	1.750	0.104	0.064	0.904	1.136	1.684
Fruktoza	avg	7.996	8.322	11.356	4.332	6.332	12.536	2.262	4.277
	sd	0.079 ^d	0.110 ^d	0.168 ^f	0.062 ^b	0.104 ^c	0.221 ^g	0.062 ^a	0.107 ^b
	RSD	0.986	1.316	1.482	1.424	1.644	1.764	2.730	2.512
Saharoza	avg	5.663	8.652	13.223	5.214	7.896	10.336	0.931	0.990
	sd	0.151 ^f	0.210 ^h	0.415 ^j	0.128 ^f	0.204 ^g	0.312 ⁱ	0.027 ^b	0.025 ^b
	RSD	2.672	2.428	3.136	2.446	2.589	3.023	2.874	2.552
Turanoza	avg	1.332	1.542	1.986	0.908	1.425	1.789	6.623	8.758
	sd	0.042 ^{bc}	0.055 ^{cd}	0.061 ^e	0.037 ^a	0.063 ^{bc}	0.092 ^{de}	0.109 ^g	0.376 ^h
	RSD	3.185	3.582	3.050	4.117	4.413	5.123	1.648	4.290
Glicerol	avg	2.145	3.562	5.333	0.881	1.224	1.456	1.211	1.192
	sd	0.054 ^{de}	0.118 ^g	0.122 ^h	0.073 ^a	0.144 ^b	0.132 ^{bc}	0.035 ^b	0.117 ^{ab}
	RSD	2.523	3.321	2.285	8.285	11.784	9.095	2.900	9.785
Galaktitol	avg	1.985	2.356	3.014	1.012	1.109	1.552	1.389	1.483
	sd	0.062 ^{ef}	0.055 ^g	0.091 ^h	0.024 ^a	0.023 ^a	0.052 ^{bc}	0.056 ^b	0.079 ^{bc}
	RSD	3.149	2.328	3.018	2.378	2.048	3.368	4.021	5.300
Galaktoza	avg	2.992	3.145	4.025	0.986	1.537	3.665	5.545	3.572
	sd	0.159 ^d	0.251 ^{de}	0.179 ^{fg}	0.044 ^a	0.061 ^b	0.062 ^{ef}	0.240 ^l	0.151 ^{ef}
	RSD	5.300	7.984	4.456	4.456	3.984	1.692	4.332	4.228
Riboza	avg	1.856	2.563	3.222	0.117	0.853	1.114	0.965	1.314
	sd	0.058 ^g	0.101 ^h	0.131 ^l	0.006 ^a	0.051 ^b	0.048 ^{cd}	0.038 ^{bc}	0.064 ^{def}
	RSD	3.140	3.944	4.056	5.370	6.028	4.272	3.970	4.884
Izomaltoza	avg	0.837	0.968	1.025	0.223	0.573	1.063	1.588	1.616
	sd	0.058 ^e	0.058 ^f	0.073 ^f	0.012 ^b	0.020 ^{cd}	0.061 ^f	0.019 ⁱ	0.053 ⁱ
	RSD	6.970	5.992	7.136	5.504	3.552	3.874	1.224	3.256
Izomaltotrioza	avg	0.585	0.677	0.985	0.658	0.985	1.112	0.791	0.809
	sd	0.027 ^{bc}	0.052 ^d	0.042 ^g	0.027 ^{cd}	0.046 ^g	0.059 ^h	0.004 ^f	0.031 ^f

	RSD	4.622	7.712	4.256	4.038	4.664	5.308	0.558	3.864
Maltoza	avg	0.351	0.552	0.789	1.221	1.527	2.356	2.022	2.054
	sd	0.003 ^a	0.007 ^{abc}	0.009 ^{bc}	0.059 ^{dc}	0.095 ^e	0.141 ^f	0.185 ^f	0.287 ^f
	RSD	0.942	1.242	1.196	4.872	6.228	5.970	9.172	13.996
Maltotrioza	avg	0.008	0.009	0.012	1.114	1.983	2.999	4.564	1.355
	sd	0.000 ^a	0.000 ^a	0.000 ^a	0.028 ^b	0.007 ^c	0.005 ^e	0.196 ^g	0.024 ^b
	RSD	3.570	2.370	3.264	2.506	0.354	0.178	4.284	1.766
Manitol	avg	1.631	1.896	2.014	5.632	7.662	10.233	9.525	12.455
	sd	0.036 ^c	0.059 ^d	0.043 ^d	0.125 ^e	0.153 ^f	0.016 ^h	0.003 ^g	0.005 ^j
	RSD	2.226	3.112	2.124	2.226	1.992	0.156	0.032	0.044
Ksilozna	avg	0.856	0.993	1.258	0.568	0.754	0.963	0.973	0.981
	sd	0.000 ^c	0.011 ^{ef}	0.015 ^h	0.008 ^a	0.015 ^b	0.019 ^{ef}	0.038 ^{ef}	0.037 ^{ef}
	RSD	0.018	1.136	1.228	1.482	1.986	1.986	3.926	3.748
Manoza	avg	0.072	0.088	0.102	0.885	0.993	1.563	1.327	1.339
	sd	0.004 ^a	0.004 ^a	0.006 ^a	0.036 ^b	0.056 ^c	0.059 ^e	0.031 ^d	0.029 ^d
	RSD	5.178	4.226	5.570	4.024	5.652	3.774	2.332	2.166
Panoza	avg	0.011	0.018	0.021	0.425	0.558	0.658	0.625	0.542
	sd	0.000 ^a	0.001 ^a	0.001 ^a	0.011 ^b	0.016 ^{cd}	0.020 ^f	0.024 ^{ef}	0.022 ^c
	RSD	2.663	3.826	2.562	2.511	2.845	2.998	3.829	4.056
Ramnoza	avg	1.109	1.526	1.996	0.223	0.356	0.452	0.388	0.345
	sd	0.017 ^f	0.032 ⁱ	0.030 ^j	0.003 ^a	0.005 ^b	0.006 ^c	0.001 ^{bc}	0.002 ^b
	RSD	1.559	2.119	1.527	1.183	1.376	1.282	0.298	0.721
Rafinoza	avg	0.856	1.243	2.012	2.141	2.853	3.114	2.415	2.443
	sd	0.031 ^a	0.025 ^c	0.050 ^e	0.043 ^f	0.043 ^h	0.018 ⁱ	0.050 ^g	0.053 ^g
	RSD	3.663	2.012	2.498	2.002	1.496	0.578	2.056	2.166
Stahiloza	avg	0.617	0.882	1.022	1.025	0.995	0.896	0.569	0.542
	sd	0.013 ^d	0.025 ^f	0.027 ^g	0.008 ^g	0.007 ^g	0.001 ^f	0.015 ^c	0.020 ^c
	RSD	2.163	2.845	2.611	0.762	0.661	0.057	2.668	3.663

Rezultati su izraženi kao srednja vrednost za tri ponavljanja ± standardna devijacija (n=3). Različita slova u kolonama označavaju statistički različite vrednosti ($p \leq 0.05$). IM – mongolska Čaga, MW 96% EtOH, 50% EtOH, H₂O - mikrotalasna ekstrakcija; VAE 96% EtOH, 50% EtOH, H₂O – ultrazvučna ekstrakcija; SWE 200°C, 120°C – subkritična vodena ekstrakcija

Prilog 2. Sadržaj različitih šećera u ekstraktima srpske *I. obliquus* dobijenih različitim zelenim tehnikama ekstrakcije (g/kg)

g/kg		IS-MW 96% ETOH	IS-MW 50% ETOH	IS- MW water	IS-VAE 96% ETOH	IS- VAE 50% ETOH	IS- VAE water	IS- SWE 200°C	IS- SWE 120°C
Sorbitol	avg	1.213	1.425	1.632	1.698	1.783	2.012	4.897	3.304
	sd	0.014 ^a	0.039 ^b	0.037 ^{cd}	0.067 ^{cd}	0.081 ^d	0.086 ^e	0.048 ⁱ	0.043 ^h
	RSD	1.164	2.704	2.294	3.970	4.536	4.298	0.972	1.304
Trehaloza	avg	0.234	0.266	0.287	0.352	0.405	0.425	0.521	0.676
	sd	0.005 ^a	0.007 ^{ab}	0.006 ^{bc}	0.011 ^d	0.017 ^e	0.021 ^e	0.015 ^f	0.027 ^h
	RSD	1.950	2.648	1.926	3.136	4.164	4.824	2.850	3.926
Arabinoza	avg	0.189	0.211	0.223	0.232	0.152	0.352	1.445	1.597
	sd	0.003 ^{ab}	0.001 ^{ab}	0.001 ^{ab}	0.005 ^b	0.003 ^a	0.008 ^c	0.038 ^g	0.053 ^{hi}
	RSD	1.336	0.410	0.370	1.976	1.706	2.198	2.642	3.304
Glukoza	avg	24.356	26.985	28.632	18.962	22.245	26.358	66.308	52.131
	sd	0.309 ^e	0.467 ^f	0.416 ^g	0.085 ^b	0.233 ^{cd}	0.104 ^f	0.593 ^l	0.586 ⁱ
	RSD	1.270	1.730	1.452	0.448	1.046 ^e	0.396	1.138	0.884
Fruktoza	avg	10.233	12.356	14.653	11.325	13.989	16.856	2.547	2.106
	sd	0.340 ^e	0.494 ^g	0.388 ^h	0.450 ^f	0.718 ^h	0.176 ⁱ	0.057 ^a	0.048 ^a
	RSD	3.326	3.996	2.650	3.970	5.136	1.046	2.228	2.290
Saharoza	avg	2.456	3.114	4.325	1.041	2.653	2.986	0.423	0.314
	sd	0.051 ^c	0.064 ^d	0.136 ^e	0.023 ^b	0.070 ^{ed}	0.059 ^d	0.036 ^a	0.010 ^a
	RSD	2.064	2.046	3.136	2.228	2.652	1.978	2.542	3.114
Turanoza	avg	1.124	1.325	1.563	1.087	1.986	2.966	1.635	1.828
	sd	0.014 ^{ab}	0.036 ^{bc}	0.062 ^{cd}	0.034 ^{ab}	0.071 ^e	0.118 ^f	0.028 ^{cd}	0.056 ^{de}
	RSD	1.216	2.747	3.956	3.132	3.559	3.976	1.700	3.060
Glicerol	avg	2.321	2.014	2.584	1.563	1.996	2.147	1.229	1.239
	sd	0.103 ^{ef}	0.107 ^{de}	0.104 ^f	0.086 ^c	0.130 ^d	0.147 ^{de}	0.038 ^b	0.047 ^b
	RSD	4.428	5.306	4.024	5.528	6.534	6.845	3.087	3.830
Galaktitol	avg	1.653	1.896	1.993	1.815	1.963	2.056	1.457	1.482
	sd	0.025 ^{cd}	0.032 ^{ef}	0.003 ^{ef}	0.079 ^{de}	0.078 ^{ef}	0.063 ^f	0.063 ^b	0.102 ^{bc}
	RSD	1.494	1.688	0.143	4.340	3.978	3.087	4.332	6.895
Galaktoza	avg	4.325	3.586	4.856	2.325	3.856	4.658	3.554	4.660
	sd	0.261 ^{gh}	0.241 ^{ef}	0.291 ^h	0.080 ^c	0.172 ^{fg}	0.153 ^h	0.093 ^{ef}	0.073 ^h
	RSD	6.042	6.730	5.996	3.452	4.456	3.288	2.612	1.556
Riboza	avg	0.986	1.124	1.365	1.312	2.523	3.411	1.282	1.459
	sd	0.031 ^{bc}	0.037 ^{cde}	0.073 ^{ef}	0.061 ^{d^{ef}}	0.163 ^h	0.122 ^l	0.077 ^{def}	0.077 ^f
	RSD	3.124	3.326	5.332	4.644	6.446	3.584	5.996	5.306
Izomaltoza	avg	0.008	0.007	1.241	0.495	0.459	0.663	1.412	1.580
	sd	0.000 ^a	0.000 ^a	0.059 ^g	0.020 ^c	0.030 ^c	0.036 ^d	0.030 ^h	0.030 ⁱ
	RSD	3.963	4.726	4.730	4.112	6.506	5.370	2.156	1.896
Izomaltotrioza	avg	0.009	0.010	0.015	0.563	0.689	0.852	0.786	0.774
	sd	0.000 ^a	0.000 ^a	0.000 ^a	0.001 ^b	0.004 ^{de}	0.002 ^f	0.004 ^f	0.009 ^{ef}
	RSD	0.378	1.812	1.136	0.224	0.536	0.242	0.482	1.108
Maltoza	avg	1.245	1.235	1.523	0.293	0.452	0.896	2.005	1.998
	sd	0.031 ^{de}	0.038 ^{de}	0.034 ^e	0.015 ^a	0.031 ^{ab}	0.066 ^{cd}	0.187 ^f	0.240 ^f
	RSD	2.470	3.084	2.228	5.102	6.830	7.316	9.306	11.992

Maltotrioza	avg	0.005	0.007	0.011	0.008	0.009	0.009	3.554	2.638
	sd	0.000 ^a	0.000 ^a	0.000 ^a	0.000 ^a	0.000 ^a	0.000 ^a	0.182 ^f	0.172 ^d
	RSD	2.650	1.556	1.272	3.970	3.242	3.624	5.126	6.512
Manitol	avg	0.896	0.925	0.986	0.852	0.963	1.042	11.539	10.332
	sd	0.020 ^{ab}	0.023 ^{ab}	0.021 ^{ab}	0.005 ^a	0.009 ^{ab}	0.006 ^b	0.023 ⁱ	0.018 ^h
	RSD	2.224	2.516	2.170	0.616	0.904	0.596	0.202	0.178
Ksilozna	avg	1.023	1.234	1.425	0.885	0.996	1.147	0.942	0.947
	sd	0.002 ^f	0.002 ^h	0.047 ⁱ	0.001 ^{cd}	0.001 ^{ef}	0.000 ^g	0.025 ^{de}	0.031 ^{de}
	RSD	0.178	0.136	3.316	0.084	0.112	0.024	2.664	3.306
Manoza	avg	0.031	0.042	0.058	0.029	0.041	0.063	1.323	1.312
	sd	0.001 ^a	0.002 ^a	0.003 ^a	0.001 ^a	0.002 ^a	0.002 ^a	0.039 ^d	0.028 ^d
	RSD	2.066	3.970	5.578	4.130	4.642	3.792	2.985	2.145
Panoza	avg	0.010	0.012	0.018	0.008	0.012	0.015	0.563	0.589
	sd	0.000 ^a	0.000 ^a	0.000 ^a	0.000 ^a	0.001 ^a	0.000 ^a	0.021 ^{cd}	0.025 ^{de}
	RSD	1.206	2.058	1.761	3.163	4.478	2.011	3.706	4.318
Ramnoza	avg	1.025	1.235	1.412	0.856	0.963	1.023	0.325	0.355
	sd	0.036 ^{ef}	0.053 ^g	0.064 ^h	0.023 ^d	0.035 ^e	0.027 ^{ef}	0.001 ^b	0.001 ^b
	RSD	2.721	3.662	2.616	3.518	4.332	4.507	0.316	0.376
Rafinoza	avg	1.325	1.452	1.568	0.752	0.863	0.996	2.426	2.410
	sd	0.022 ^c	0.014 ^d	0.012 ^d	0.006 ^a	0.006 ^a	0.036 ^b	0.053 ^g	0.081 ^g
	RSD	1.663	0.948	0.776	0.762	0.666	3.613	2.166	3.350
Stahiloza	avg	0.563	0.633	0.741	0.114	0.358	0.552	0.556	0.561
	sd	0.007 ^c	0.012 ^d	0.007 ^c	0.003 ^a	0.015 ^b	0.011 ^c	0.000 ^c	0.000 ^c
	RSD	1.163	1.948	1.006	2.329	4.316	1.948	0.089	0.062

Rezultati su izraženi kao srednja vrednost za tri ponavljanja ± standardna devijacija (n=3). Različita slova u kolonama označavaju statistički različite vrednosti ($p \leq 0.05$). IS – srpska Čaga, MW 96% EtOH, 50% EtOH, H₂O - mikrotalasna ekstrakcija; VAE 96% EtOH, 50% EtOH, H₂O – ultrazvučna ekstrakcija; SWE 200°C, 120°C – subkritična vodena ekstrakcija

Prilog 3. Polifenolni profil dobijen u ekstraktima srpske *I. obliquus* dobijenih različitim zelenim tehnikama ekstrakcije (mg/kg)

mg/kg		IS-MW 96% ETOH	IS-MW 50% ETOH	IS-MW water	IS- VAE 96% ETOH	IS- VAE 50% ETO H	IS- VAE water	IS- SWE 200°C	IS- SWE 120°C
Protokatchinska kiselina	avg	0.99	0.97	0.83	1.24	1.31	0.98	0.99	1.49
	sd	0.01 ^d	0.01 ^d	0.01 ^b	0.01 ^f	0.02 ^g	0.01 ^d	0.00 ^d	0.00 ^h
	RSD	1.00	0.89	1.11	1.04	1.33	1.21	1.16	1.43
Hlorogena kiselina	avg	812.32	897.32	741.27	795.32	845.36	658.63	840.35	697.42
	sd	0.12 ^h	0.16 ^l	0.21 ^d	0.16 ^f	0.20 ^k	0.22 ^b	1.09 ^j	0.93 ^c
	RSD	0.95	1.45	1.55	1.24	1.69	1.46	9.12	6.5
p- hidroksibenzojev a kiselina	avg	0.33	0.38	0.15	0.51	0.47	0.39	0.23	0.55
	sd	0.00 ^f	0.00 ^g	0.00 ^a	0.00 ^j	0.00 ⁱ	0.00 ^{gh}	0.01 ^c	0.01 ^k
	RSD	0.13	0.04	0.04	0.11	0.14	0.31	1.65	1.03
Katehin	avg	2.80	2.99	2.94	3.49	3.39	2.99	1.80	2.41
	sd	0.02 ^d	0.03 ^b	0.08 ^d	0.04 ^e	0.07 ^e	0.03 ^d	0.05 ^b	0.10 ^c
	RSD	0.88	1.42	2.82	1.11	1.99	1.02	2.86	4.01
p- hidroksifenilaceta tna kiselina	avg	0.11	0.14	0.15	0.15	0.13	0.11	0.11	0.12
	sd	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	RSD	0.70	0.40	0.43	0.87	0.91	0.63	0.66	0.92
Kafeinska kiselina	avg	0.84	0.85	0.78	0.94	0.88	0.76	0.98	2.66
	sd	0.02 ^{ab}	0.03 ^{ab}	0.06 ^a	0.04 ^{abc}	0.04 ^{ab}	0.03 ^a	0.04 ^{bc}	0.14 ^f
	RSD	2.05	3.99	2.86	3.73	4.91	4.02	4.08	5.36
Vanilinska kiselina	avg	0.27	0.29	0.42	0.27	0.29	0.24	0.27	0.44
	sd	0.00 ^c	0.00 ^e	0.00 ⁱ	0.00 ^c	0.00 ^e	0.01 ^a	0.00 ^c	0.00 ^j
	RSD	0.16	0.23	0.15	1.27	1.75	2.28	0.31	0.39
Siriginska kiselina	avg	0.12	0.14	0.23	0.52	0.52	0.50	0.13	0.11
	sd	0.00 ^{bc}	0.00 ^d	0.00 ^e	0.00 ^k	0.00 ^k	0.00 ^j	0.00 ^{cd}	0.00 ^b
	RSD	0.47	0.13	0.11	0.37	0.25	0.61	3.79	2.82
Rutin	avg	0.10	0.10	0.08	0.08	0.09	0.08	0.09	0.07
	sd	0.00 ^d	0.00 ^d	0.00 ^b	0.00 ^f	0.01 ^c	0.00 ^b	0.00 ^c	0.00 ^a
	RSD	1.05	1.37	0.97	1.55	2.06	1.48	4.11	5.02
Kvercetin 3-O- glukozid	avg	0.41	0.45	0.59	0.24	0.28	0.23	1.35	1.22
	sd	0.01 ^d	0.00 ^e	0.01 ^g	0.01 ^a	0.01 ^b	0.01 ^a	0.00 ⁱ	0.01 ^h
	RSD	1.38	1.10	0.54	2.23	3.31	3.56	0.46	0.89
p-Kumarinska kiselina	avg	1.42	1.59	1.10	1.46	1.41	1.40	1.55	3.07
	sd	0.02 ^f	0.04 ^{gh}	0.02 ^c	0.00 ^f	0.00 ^f	0.00 ^{ef}	0.01 ^g	0.04 ⁱ
	RSD	1.49	2.31	2.02	0.65	1.05	0.37	0.86	1.20
Izoramnatin_3-O- rutinozid	avg	0.12	0.13	0.13	1.12	1.06	0.98	0.11	0.11
	sd	0.00 ^a	0.00 ^a	0.00 ^a	0.01 ⁱ	0.01 ^h	0.02 ^f	0.00 ^a	0.00 ^a
	RSD	2.43	3.26	2.24	0.82	1.02	1.60	1.00	1.38
Sinapinska kiselina	avg	0.10	0.10	0.11	0.10	0.11	0.10	0.11	0.12
	sd	0.00 ^a	0.00 ^a	0.00 ^{ab}	0.00 ^a	0.00 ^{ab}	0.00 ^{ab}	0.00 ^{ab}	0.00 ^b
	RSD	0.52	1.27	1.24	1.19	0.85	0.82	1.97	1.14

Ferulinska kiselina	avg	0.26	0.27	0.63	0.23	0.29	0.28	0.29	0.47
	sd	0.01 ^{cd}	0.01 ^d	0.02 ^h	0.00 ^{bc}	0.00 ^d	0.00 ^d	0.01 ^d	0.01 ^g
	RSD	3.51	4.45	3.36	0.98	1.58	0.85	3.21	2.55
Cimetna kiselina	avg	4.33	4.56	5.69	2.65	4.52	1.87	4.33	8.94
	sd	0.13 ^c	0.15 ^{cd}	0.23 ^{efg}	0.02 ^b	0.08 ^{cd}	0.06 ^a	0.24 ^c	0.74 ⁱ
	RSD	2.97	3.22	3.99	0.64	1.85	3.23	5.62	8.24
Kvercetin 3-O-ramnozid	avg	0.33	0.33	0.14	0.09	0.09	0.08	4.47	4.06
	sd	0.01 ^{ab}	0.05 ^{ab}	0.01 ^{ab}	0.00 ^a	0.00 ^a	0.00 ^a	0.22 ^f	0.26 ^e
	RSD	0.52	2.12	0.97	1.17	2.15	1.86	5.02	6.32
Kaempferol_7-O-glukozid	avg	0.06	0.08	0.06	0.04	0.05	0.04	1.53	1.49
	sd	0.05 ^a	0.07 ^a	0.00 ^a	0.00 ^a	0.00 ^a	0.00 ^a	0.05 ^c	0.06 ^c
	RSD	2.90	3.78	2.77	3.53	4.11	5.05	3.21	5.26
Florizin	avg	0.83	0.87	0.54	0.40	0.44	0.39	0.78	0.36
	sd	0.02 ^{cd}	0.00 ^d	0.00 ^b	0.01 ^a	0.01 ^a	0.00 ^a	0.02 ^c	0.01 ^a
	RSD	2.00	0.30	0.27	1.58	1.33	1.26	2.69	1.77
Eriodiktiol	avg	0.06	0.06	0.03	0.23	0.21	0.20	0.03	0.05
	sd	0.00 ^b	0.00 ^b	0.00 ^a	0.01 ^d	0.01 ^c	0.00 ^c	0.00 ^a	0.00 ^b
	RSD	3.25	3.90	3.09	2.46	4.66	2.02	0.65	1.03
Kvercetin	avg	1.45	1.65	1.75	1.25	1.46	1.10	0.34	0.49
	sd	0.02 ^{de}	0.04 ^{ef}	0.03 ^{ef}	0.04 ^{cd}	0.02 ^{de}	0.03 ^c	0.04 ^a	0.05 ^{ab}
	RSD	1.12	2.63	4.33	3.26	1.33	2.65	1.95	2.35
Floretin	avg	0.02	0.04	0.03	0.06	0.07	0.05	0.02	0.04
	sd	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	RSD	4.93	4.78	2.58	2.29	2.55	1.35	0.58	0.68
Naringenin	avg	0.02	0.03	0.02	0.03	0.04	0.03	0.02	0.02
	sd	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	RSD	1.01	1.24	0.95	0.76	0.90	0.94	0.45	0.50
Galna kiselina	avg	1.26	1.57	1.00	2.15	2.56	1.87	0.42	0.13
	sd	0.01 ^f	0.01 ^h	0.00 ^d	0.01 ^k	0.01 ^m	0.01 ⁱ	0.01 ^c	0.01 ^a
	RSD	0.44	0.35	0.33	0.47	0.45	0.62	0.44	0.46

Rezultati su izraženi kao srednja vrednost za tri ponavljanja \pm standardna devijacija (n=3). Različita slova u kolonama označavaju statistički različite vrednosti ($p \leq 0.05$). IS – srpska Čaga, MW 96% EtOH, 50% EtOH, H₂O - mikrotalasna ekstrakcija; VAE 96% EtOH, 50% EtOH, H₂O – ultrazvučna ekstrakcija; SWE 200°C, 120°C – subkritična vodena ekstrakcija

Prilog 4. Polifenolni profil dobijen u ekstraktima mongolske *I. obliquus* dobijenih različitim zelenim tehnikama ekstrakcije (mg/kg)

mg/kg		IM-MW 96% ETOH	IM- MW 50% ETOH	IM- MW water	IM- VAE 96% ETOH	IM- VAE 50% ETOH	IM- VAE water	IM- SWE 200°C	IM- SWE 120°C
Protokatehinska kiselina	avg	1.03	1.26	0.97	0.85	0.91	0.79	0.83	1.25
	sd	0.00 ^e	0.00 ^f	0.00 ^d	0.00 ^b	0.00 ^c	0.00 ^a	0.00 ^b	0.00 ^f
	RSD	0.09	0.24	0.30	0.18	0.23	0.21	0.21	0.36
Hlorogena kiselina	avg	825.32	798.63	897.32	742.63	768.96	642.12	741.27	970.56
	sd	0.24 ⁱ	0.32 ^g	0.21 ^l	0.63 ^d	0.73 ^e	1.28 ^a	1.23 ^d	0.89 ^m
	RSD	1.95	2.56	1.9	4.64	5.58	8.21	9.14	8.66
p-hidroksibenzojeva kiselina	avg	0.30	0.32	0.28	0.38	0.41	0.29	0.15	0.20
	sd	0.00 ^{de}	0.00 ^{ef}	0.01 ^d	0.00 ^g	0.02 ^h	0.01 ^d	0.00 ^a	0.00 ^b
	RSD	0.33	1.14	1.82	1.24	4.65	2.78	0.98	1.13
Katehin	avg	5.99	5.24	4.99	5.76	6.10	4.33	2.94	1.51
	sd	0.06 ^{hi}	0.07 ^g	0.04 ^g	0.15 ^h	0.12 ⁱ	0.20 ^f	0.07 ^d	0.05 ^a
	RSD	1.00	1.26	0.90	2.65	2.01	4.59	2.22	3.25
p- hidroksifenilacetatna kiselina	avg	0.15	0.18	0.14	0.13	0.14	0.11	0.15	0.07
	sd	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	RSD	0.68	1.26	2.01	1.39	2.37	3.11	0.80	0.82
Kafeinska kiselina	avg	4.01	4.26	3.97	2.05	2.53	1.86	2.24	1.13
	sd	0.03 ^g	0.16 ^h	0.09 ^g	0.01 ^{de}	0.02 ^f	0.02 ^d	0.09 ^e	0.01 ^e
	RSD	0.71	3.77	2.23	0.49	0.92	1.26	4.10	1.33
Vanilinska kiselina	avg	0.33	0.36	0.28	0.25	0.29	0.24	0.42	0.38
	sd	0.00 ^f	0.00 ^g	0.00 ^d	0.00 ^b	0.00 ^e	0.00 ^a	0.00 ⁱ	0.00 ^h
	RSD	0.38	0.47	0.35	1.02	1.71	1.35	0.28	0.53
Siriginska kiselina	avg	0.39	0.41	0.31	0.36	0.41	0.30	0.23	0.04
	sd	0.00 ^h	0.00 ⁱ	0.00 ^f	0.00 ^g	0.01 ⁱ	0.01 ^f	0.01 ^e	0.00 ^a
	RSD	0.62	0.58	0.61	0.58	2.25	1.99	2.85	3.97
Rutin	avg	0.35	0.46	0.30	0.30	0.36	0.28	0.28	0.24
	sd	0.00 ^h	0.00 ^j	0.00 ^g	0.00 ^g	0.00 ⁱ	0.01 ^f	0.00 ^f	0.00 ^e
	RSD	0.16	0.21	0.18	1.11	1.00	3.13	4.12	3.24
Kvercetin 3-O- glukozid	avg	0.46	0.53	0.34	0.29	0.31	0.24	1.59	1.42
	sd	0.02 ^e	0.01 ^f	0.01 ^c	0.01 ^b	0.01 ^{bc}	0.01 ^a	0.01 ^j	0.01 ⁱ
	RSD	3.33	2.46	2.90	3.11	4.03	3.58	0.77	0.76
p-Kumarinska kiselina	avg	1.24	1.66	0.99	1.43	1.56	1.33	1.10	0.85
	sd	0.03 ^d	0.05 ^h	0.01 ^b	0.02 ^f	0.03 ^g	0.03 ^e	0.01 ^c	0.01 ^a
	RSD	2.28	3.12	1.51	1.75	2.11	2.47	0.82	1.31
Izoramnetin 3-O- rutinozid	avg	1.01	1.36	0.89	0.39	0.43	0.29	0.13	0.12
	sd	0.00 ^g	0.00 ^j	0.00 ^e	0.01 ^c	0.01 ^d	0.01 ^b	0.00 ^a	0.00 ^a
	RSD	0.23	0.28	0.22	2.65	3.32	2.85	0.89	1.79
Sinapinska kiselina	avg	0.43	0.65	0.16	0.25	0.36	0.20	0.27	0.26
	sd	0.01 ^h	0.01 ⁱ	0.01 ^{de}	0.00 ^d	0.01 ^f	0.00 ^c	0.00 ^e	0.00 ^{de}
	RSD	0.73	0.72	0.81	0.77	3.16	1.79	0.90	1.32
Ferulinska kiselina	avg	0.43	0.67	0.23	0.21	0.35	0.19	0.63	0.64
	sd	0.01 ^f	0.02 ⁱ	0.01 ^{bc}	0.01 ^{ab}	0.02 ^e	0.00 ^a	0.02 ^h	0.02 ^h

	RSD	2.25	3.38	2.85	6.52	5.79	1.33	3.14	3.85
Cimetna kiselina	avg	5.21	5.66	4.21	6.33	7.00	5.87	5.69	6.43
	sd	0.12 ^{de}	0.22 ^{ef}	0.17 ^c	0.18 ^{fgh}	0.07 ^h	0.11 ^{efg}	0.34 ^{efg}	0.09 ^{gh}
	RSD	2.24	3.86	4.11	2.89	1.05	1.89	5.99	1.33
Kvercetin 3-O-ramnozid	avg	0.31	0.36	0.20	0.08	0.08	0.07	1.14	1.88
	sd	0.01 ^{ab}	0.01 ^b	0.00 ^{ab}	0.00 ^a	0.00 ^a	0.00 ^a	0.05 ^c	0.06 ^d
	RSD	1.87	2.99	1.75	2.00	2.69	3.05	4.77	3.00
Kaempferol 7-O-glukozid	avg	0.09	0.11	0.04	0.01	0.02	0.01	1.33	1.51
	sd	0.00 ^a	0.00 ^a	0.00 ^a	0.00 ^a	0.00 ^a	0.00 ^a	0.04 ^b	0.13 ^c
	RSD	1.79	2.37	1.63	3.12	4.33	3.90	3.00	8.45
Florizin	avg	1.64	1.76	1.43	1.40	1.46	1.30	1.54	1.22
	sd	0.02 ^h	0.07 ⁱ	0.07 ^f	0.02 ^f	0.01 ^{fg}	0.00 ^e	0.02 ^g	0.00 ^e
	RSD	1.22	3.99	5.25	4.25	1.52	0.85	1.21	1.57
Eriodiktiol	avg	0.49	0.52	0.41	0.05	0.05	0.05	0.75	0.65
	sd	0.01 ^f	0.01 ^g	0.00 ^e	0.00 ^b	0.00 ^b	0.00 ^b	0.00 ⁱ	0.00 ^h
	RSD	1.33	1.65	1.11	2.77	2.65	1.86	0.66	0.65
Kvercetin	avg	4.33	6.85	2.33	2.11	2.56	1.85	0.75	0.65
	sd	0.16 ^j	0.27 ^k	0.04 ^{hi}	0.05 ^{gh}	0.09 ⁱ	0.05 ^{fg}	0.05 ^b	0.06 ^b
	RSD	3.68	4.01	1.89	2.35	3.37	2.86	2.88	3.11
Floretin	avg	0.07	0.10	0.04	0.07	0.07	0.06	0.07	0.05
	sd	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	RSD	1.29	2.00	1.13	0.53	0.83	0.87	0.57	1.87
Naringenin	avg	0.04	0.05	0.02	0.05	0.06	0.05	0.02	0.05
	sd	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	RSD	0.39	0.40	0.37	0.52	0.62	0.54	0.43	0.65
Galna kiselina	avg	1.14	1.43	1.32	2.33	2.69	2.00	0.34	0.40
	sd	0.01 ^e	0.01 ^g	0.01 ^f	0.02 ^l	0.08 ⁿ	0.05 ^j	0.00 ^b	0.00 ^{bc}
	RSD	0.63	0.68	0.83	0.75	2.90	2.29	2.11	2.86

Rezultati su izraženi kao srednja vrednost za tri ponavljanja ± standardna devijacija (n=3). Različita slova u kolonama označavaju statistički različite vrednosti ($p \leq 0.05$). IM – mongolska Čaga, MW 96% EtOH, 50% EtOH, H₂O - mikrotalasna ekstrakcija; VAE 96% EtOH, 50% EtOH, H₂O – ultrazvučna ekstrakcija; SWE 200°C, 120°C – subkritična vodena ekstrakcija

Prilog 5. Profil masnih kiselina (mg/100 g) ekstrakata srpske *I. obliquus* dobijenih različitim zelenim tehnikama ekstrakcije

mg/100 g		IS- MW 96% ETOH	IS- MW 50% ETOH	IS- MW water	IS- VAE 96% ETOH	IS- VAE 50% ETOH	IS- VAE water	IS- SWE 200°C	IS- SWE 120°C
C4:0 buterna kiselina	avg	0.030	0.020	0.020	0.060	0.060	0.040	0.090	0.080
	sd	0.000 ^b	0.000 ^a	0.000 ^a	0.002 ^e	0.002 ^e	0.001 ^c	0.005 ^g	0.002 ^f
	RSD	1.178	0.777	1.073	3.166	3.663	2.163	5.166	2.166
C6:0 kapronska kiselina	avg	0.020	0.030	0.010	0.040	0.040	0.020	0.090	0.040
	sd	0.000 ^b	0.000 ^c	0.000 ^a	0.001 ^d	0.000 ^d	0.000 ^b	0.002 ^h	0.001 ^d
	RSD	1.011	1.343	1.663	1.556	1.073	0.997	2.045	3.112
C8:0 kaprilna kiselina	avg	0.050	0.060	0.030	0.110	0.090	0.060	0.160	0.170
	sd	0.001 ^b	0.002 ^c	0.001 ^a	0.003 ^f	0.003 ^e	0.000 ^c	0.001 ⁱ	0.001 ^j
	RSD	2.090	3.956	2.816	2.311	3.866	0.697	0.674	0.787
C10:0 kaprinska kiselina	avg	0.230	0.210	0.140	0.320	0.330	0.190	0.580	0.420
	sd	0.012 ^{bc}	0.013 ^{bc}	0.007 ^a	0.019 ^d	0.025 ^d	0.015 ^b	0.008 ^g	0.008 ^e
	RSD	5.062	6.064	4.899	5.986	7.456	8.156	1.437	1.842
C11:0 undekanska kiselina	avg	0.110	0.100	0.070	0.160	0.150	0.060	0.650	0.320
	sd	0.001 ^b	0.001 ^b	0.000 ^a	0.006 ^c	0.005 ^c	0.002 ^a	0.015 ⁱ	0.013 ^f
	RSD	0.803	0.718	0.674	3.665	3.261	3.014	2.279	3.936
C12:0 laurinska kiselina	avg	0.120	0.120	0.040	0.110	0.130	0.060	0.420	0.190
	sd	0.001 ^{de}	0.001 ^{de}	0.000 ^a	0.001 ^d	0.001 ^e	0.000 ^b	0.000 ^k	0.000 ^g
	RSD	0.690	1.161	0.638	0.865	1.098	0.732	0.062	0.053
C13:0 tridekanska kiselina	avg	0.040	0.030	0.020	0.050	0.050	0.020	0.140	0.110
	sd	0.001 ^{bc}	0.000 ^{ab}	0.000 ^a	0.001 ^{cd}	0.001 ^{cd}	0.000 ^a	0.005 ^h	0.003 ^g
	RSD	1.479	0.547	1.861	2.027	2.255	0.552	3.725	3.032
C14:0 miristinska kiselina	avg	0.660	0.690	0.230	0.740	0.720	0.330	0.930	0.620
	sd	0.018 ^{ef}	0.017 ^{fg}	0.003 ^a	0.010 ^h	0.015 ^{gh}	0.005 ^b	0.019 ^j	0.015 ^e
	RSD	2.790	2.468	1.416	1.376	2.097	1.651	2.033	2.411
C14:1 miristoleinska kiselina	avg	0.580	0.510	0.320	0.670	0.640	0.330	0.650	0.410
	sd	0.003 ^g	0.016 ^f	0.007 ^b	0.016 ⁱ	0.018 ^h	0.001 ^b	0.008 ^h	0.007 ^c
	RSD	0.442	3.124	2.044	2.442	2.852	0.304	1.224	1.792
C15:0 pentadecilna kiselina	avg	0.870	0.860	0.330	0.960	1.030	0.420	1.450	1.230
	sd	0.013 ^d	0.020 ^d	0.005 ^a	0.011 ^e	0.017 ^g	0.008 ^b	0.008 ^k	0.010 ^j
	RSD	1.548	2.330	1.484	1.182	1.628	1.990	0.536	0.842
C15:1 pentadekanska kiselina	avg	0.060	0.050	0.020	0.030	0.020	0.010	0.120	0.080
	sd	0.000 ^e	0.000 ^d	0.000 ^b	0.000 ^c	0.000 ^b	0.000 ^a	0.001 ^h	0.001 ^g
	RSD	0.664	0.712	0.534	1.136	1.198	0.764	1.148	1.570
C16:0 palmitinska kiselina	avg	18.320	16.220	15.660	19.320	18.880	14.320	18.650	16.520
	sd	0.122 ^e	0.149 ^d	0.101 ^{cd}	0.318 ^e	0.411 ^e	0.228 ^b	0.282 ^e	0.194 ^d
	RSD	0.668	0.916	0.642	1.646	2.178	1.592	1.512	1.176
C16:1 palmitoleinska	avg	0.670	0.630	0.230	0.750	0.740	0.330	0.560	0.420
	sd	0.018 ^j	0.011 ⁱ	0.001 ^a	0.020 ^k	0.028 ^k	0.001 ^d	0.007 ^h	0.005 ^e
	RSD	2.672	1.802	0.504	2.712	3.770	0.266	1.316	1.304
C17:0 margarinska	avg	0.480	0.420	0.210	0.560	0.590	0.220	0.520	0.420

kiselina	sd	0.004 ^e	0.005 ^d	0.004 ^a	0.010 ^g	0.012 ^h	0.004 ^a	0.010 ^f	0.006 ^d
	RSD	0.778	1.306	1.972	1.770	2.070	1.812	1.882	1.436
C17:1 heptadezenska kiselina	avg	0.160	0.150	0.040	0.110	0.110	0.030	0.210	0.110
	sd	0.003 ^h	0.004 ^g	0.001 ^c	0.003 ^d	0.004 ^d	0.001 ^b	0.001 ^j	0.000 ^d
	RSD	1.856	2.957	2.152	3.012	3.995	3.442	0.289	0.258
C18:0 stearinska kiselina	avg	6.580	6.960	3.120	7.560	7.990	4.110	5.630	4.250
	sd	0.199 ^{ef}	0.301 ^{efg}	0.094 ^b	0.260 ^{hi}	0.380 ⁱ	0.205 ^c	0.111 ^d	0.086 ^c
	RSD	3.018	4.325	2.998	3.441	4.756	4.998	1.963	2.022
C18:1 trans-oleinska kiselina	avg	0.230	0.220	0.100	0.190	0.210	0.110	0.230	0.110
	sd	0.003 ^h	0.003 ^{gh}	0.001 ^{bc}	0.010 ^f	0.009 ^g	0.002 ^c	0.005 ^h	0.004 ^c
	RSD	1.325	1.503	1.145	5.112	4.245	2.268	2.145	3.689
C18:1 cis-oleinska kiselina	avg	52.320	55.630	12.360	38.250	34.520	14.220	25.630	12.360
	sd	0.583 ^h	0.791 ⁱ	0.134 ^a	0.989 ^{ef}	1.495 ^d	0.315 ^a	0.425 ^c	0.122 ^a
	RSD	1.114	1.423	1.084	2.585	4.332	2.214	1.658	0.986
C18:2 trans-linolna kiselina	avg	0.070	0.070	0.020	0.080	0.060	0.040	0.060	0.050
	sd	0.004 ^f	0.003 ^f	0.000 ^b	0.002 ^g	0.002 ^e	0.000 ^c	0.001 ^e	0.001 ^d
	RSD	5.623	4.112	1.542	2.774	3.235	1.112	2.336	2.114
C18:2 cis-linolna kiselina	avg	0.290	0.280	0.150	0.190	0.190	0.090	0.150	0.110
	sd	0.004 ^{ab}	0.003 ^{ab}	0.001 ^{ab}	0.002 ^{ab}	0.001 ^{ab}	0.002 ^a	0.001 ^{ab}	0.001 ^a
	RSD	1.021	2.356	2.985	2.114	1.985	1.665	2.883	2.898
C18:3 linolenska kiselina	avg	0.240	0.230	0.120	0.180	0.190	0.080	0.160	0.110
	sd	0.006 ^g	0.005 ^g	0.004 ^d	0.006 ^f	0.009 ^f	0.005 ^{bc}	0.008 ^e	0.007 ^d
	RSD	2.412	2.125	2.983	3.224	4.863	5.635	4.863	6.042
C18:3 gama kiselina	avg	1.040	1.090	0.520	0.650	0.680	0.230	0.260	0.150
	sd	0.021 ^{hi}	0.036 ⁱ	0.022 ^c	0.013 ^f	0.024 ^f	0.010 ^c	0.008 ^{cd}	0.008 ^b
	RSD	2.035	3.325	4.325	1.996	3.487	4.235	3.025	5.023
C20:0 arahidinska kiselina	avg	0.350	0.380	0.210	0.540	0.560	0.240	0.230	0.150
	sd	0.008 ^h	0.013 ^h	0.003 ^f	0.022 ⁱ	0.035 ⁱ	0.011 ^{fg}	0.004 ^{fg}	0.005 ^{de}
	RSD	2.252	3.356	1.332	4.021	6.258	4.563	1.853	3.124
C20:1 eikosenoična kiselina	avg	0.170	0.190	0.140	0.160	0.120	0.090	0.230	0.110
	sd	0.003 ^e	0.010 ^f	0.005 ^d	0.007 ^e	0.003 ^c	0.002 ^b	0.008 ^g	0.002 ^c
	RSD	1.896	5.423	3.321	4.658	2.332	1.996	3.562	2.112
C20:2 eikozadienska kiselina	avg	0.120	0.150	0.110	0.210	0.150	0.070	0.150	0.120
	sd	0.004 ^c	0.006 ^d	0.004 ^c	0.004 ^c	0.003 ^d	0.001 ^b	0.003 ^d	0.003 ^c
	RSD	3.658	4.321	3.323	2.142	1.785	2.036	2.065	2.498
C21:0 heneikosanoična kiselina	avg	0.130	0.110	0.070	0.120	0.110	0.050	0.120	0.090
	sd	0.003 ^g	0.003 ^e	0.002 ^c	0.000 ^f	0.001 ^e	0.000 ^b	0.000 ^f	0.000 ^d
	RSD	2.256	2.853	2.996	0.285	0.998	0.743	0.233	0.284
C20:3 n = 3 cis-11,14,17-eikozatrienska kiselina	avg	0.110	0.090	0.030	0.130	0.080	0.020	0.110	0.060
	sd	0.000 ^g	0.000 ^f	0.000 ^b	0.001 ^h	0.001 ^e	0.000 ^a	0.000 ^g	0.000 ^c
	RSD	0.314	0.398	0.521	0.511	0.756	0.488	0.156	0.175
C20:4 arahidonska kiselina	avg	0.180	0.150	0.080	0.090	0.070	0.040	0.150	0.080
	sd	0.001 ⁱ	0.000 ^h	0.000 ^e	0.000 ^f	0.000 ^d	0.000 ^b	0.000 ^h	0.006 ^e
	RSD	0.285	0.255	0.506	0.489	0.110	0.075	0.296	7.226
C20:3 n = 6 cis-8,11,14-eikozatrienska kiselina	avg	0.260	0.210	0.040	0.050	0.030	0.010	0.130	0.090
	sd	0.001 ^l	0.001 ^k	0.000 ^d	0.000 ^e	0.000 ^e	0.000 ^a	0.001 ^j	0.000 ^h
	RSD	0.511	0.281	0.331	0.268	0.235	0.356	0.489	0.165

C22:0 behenska kiselina	avg	0.430	0.450	0.210	0.390	0.430	0.250	0.530	0.390
	sd	0.014 ^g	0.018 ^h	0.008 ^b	0.001 ^f	0.001 ^g	0.000 ^c	0.003 ^j	0.001 ^f
	RSD	3.336	3.983	4.014	0.189	0.203	0.188	0.523	0.195
C20:5 eikozapentaenska kiselina	avg	0.230	0.210	0.110	0.320	0.240	0.150	0.180	0.110
	sd	0.001 ⁱ	0.000 ^g	0.000 ^b	0.001 ^k	0.001 ^j	0.001 ^d	0.001 ^e	0.001 ^b
	RSD	0.245	0.223	0.325	0.332	0.425	0.665	0.283	1.245
C22:1 eurisinska kiselina	avg	0.190	0.170	0.100	0.310	0.250	0.190	0.160	0.090
	sd	0.002 ^j	0.003 ⁱ	0.001 ^d	0.003 ^l	0.006 ^k	0.004 ^j	0.002 ^h	0.001 ^c
	RSD	1.104	1.548	1.442	1.124	2.326	1.886	1.083	1.653
C22:2 dokozienska kiselina	avg	0.530	0.480	0.360	0.480	0.190	0.330	0.250	0.140
	sd	0.005 ^j	0.010 ⁱ	0.004 ^h	0.008 ⁱ	0.005 ^c	0.010 ^g	0.000 ^e	0.000 ^b
	RSD	1.021	2.032	0.996	1.563	2.441	2.896	0.189	0.252
C23:0 trihozilna kiselina	avg	0.560	0.510	0.310	0.560	0.470	0.350	0.360	0.250
	sd	0.013 ^l	0.004 ^k	0.002 ^c	0.006 ^l	0.005 ^j	0.007 ^{gh}	0.006 ^h	0.008 ^{bc}
	RSD	2.331	0.752	0.552	1.025	0.998	1.885	1.589	3.057
C24:0 lignocerinska kiselina	avg	0.420	0.440	0.210	0.590	0.510	0.330	0.420	0.360
	sd	0.002 ^g	0.002 ^h	0.001 ^a	0.002 ^j	0.002 ⁱ	0.001 ^d	0.008 ^g	0.004 ^f
	RSD	0.452	0.568	0.402	0.352	0.458	0.336	1.986	1.112
C22:6 dokosaheksaenoična kiselina	avg	0.510	0.530	0.390	0.610	0.580	0.430	0.590	0.410
	sd	0.005 ^g	0.004 ^h	0.003 ^d	0.004 ^k	0.006 ^j	0.004 ^f	0.007 ^j	0.004 ^e
	RSD	0.989	0.711	0.893	0.689	0.998	1.001	1.114	1.012

Rezultati su izraženi kao srednja vrednost za tri ponavljanja \pm standardna devijacija (n=3). Različita slova u kolonama označavaju statistički različite vrednosti ($p \leq 0.05$). IS – srpske Čaga, MW 96% EtOH, 50% EtOH, H₂O - mikrotalasna ekstrakcija; VAE 96% EtOH, 50% EtOH, H₂O – ultrazvučna ekstrakcija; SWE 200°C, 120°C – subkritična vodena ekstrakcija

Prilog 6. Profil masnih kiselina (mg/100 g) ekstrakata srpske *I. obliquus* dobijenih različitim zelenim tehnikama ekstrakcije

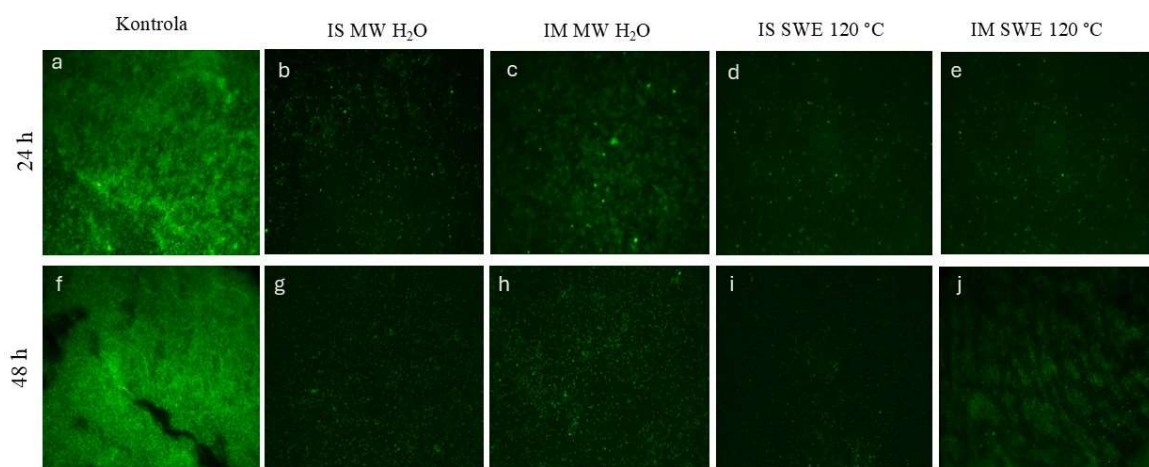
g/ 100g		IM-MW 96%ETOH	IM-MW 50% ETOH	IM- MW water	IM- VAE 96% ETOH	IM- VAE 50% ETOH	IM- VAE water	IM- SWE 200°C	IM- SWE 120°C
C4:0 C4:0 buterna kiselina	avg	0.090	0.110	0.060	0.050	0.050	0.030	0.110	0.100
	sd	0.002 ^g	0.001 ⁱ	0.001 ^e	0.001 ^d	0.002 ^d	0.001 ^b	0.001 ⁱ	0.001 ^h
	RSD	1.999	0.666	0.998	2.845	3.162	3.668	1.239	0.968
C6:0 kapronska kiselina	avg	0.080	0.070	0.050	0.090	0.080	0.040	0.110	0.080
	sd	0.001 ^g	0.001 ^f	0.001 ^e	0.001 ^h	0.002 ^g	0.001 ^d	0.002 ⁱ	0.001 ^g
	RSD	1.345	1.228	1.493	1.371	1.896	2.331	1.852	1.452
C8:0 kaprilna kiselina	avg	0.150	0.130	0.080	0.130	0.110	0.080	0.150	0.180
	sd	0.001 ^h	0.004 ^g	0.001 ^d	0.006 ^g	0.005 ^f	0.004 ^d	0.001 ^h	0.006 ^k
	RSD	0.920	3.194	0.948	4.899	4.999	5.426	0.568	3.326
C10:0 kaprinska kiselina	avg	0.480	0.490	0.240	0.330	0.360	0.140	0.630	0.520
	sd	0.019 ^f	0.023 ^f	0.007 ^c	0.001 ^d	0.002 ^d	0.001 ^a	0.009 ^h	0.012 ^f
	RSD	3.936	4.778	2.965	0.366	0.457	0.386	1.395	2.281
C11:0 undekanska kiselina	avg	0.210	0.230	0.110	0.250	0.210	0.110	0.530	0.410
	sd	0.006 ^d	0.003 ^{de}	0.002 ^b	0.004 ^e	0.006 ^d	0.002 ^b	0.012 ^h	0.005 ^g
	RSD	2.816	1.423	1.950	1.486	2.708	2.185	2.255	1.299
C12:0 laurinska kiselina	avg	0.180	0.170	0.070	0.230	0.220	0.080	0.330	0.210
	sd	0.008 ^{fg}	0.009 ^f	0.003 ^{bc}	0.007 ⁱ	0.006 ^{hi}	0.000 ^c	0.015 ^j	0.011 ^h
	RSD	4.432	5.312	4.278	2.979	2.697	0.044	4.568	5.128
C13:0 tridekanska kiselina	avg	0.060	0.070	0.030	0.080	0.080	0.400	0.130	0.110
	sd	0.000 ^{de}	0.002 ^{ef}	0.001 ^{ab}	0.002 ^f	0.003 ^f	0.013 ⁱ	0.002 ^h	0.001 ^g
	RSD	0.519	2.258	3.056	3.035	3.580	3.266	1.320	1.242
C14:0 miristinska kiselina	avg	0.810	0.830	0.320	0.720	0.750	0.410	0.840	0.520
	sd	0.021 ^j	0.012 ^j	0.006 ^b	0.012 ^{gh}	0.012 ^h	0.008 ^c	0.022 ^j	0.016 ^d
	RSD	2.556	1.492	1.775	1.623	1.542	1.985	2.568	3.124
C14:1 miristoleinska kiselina	avg	0.480	0.440	0.210	0.520	0.530	0.220	0.670	0.320
	sd	0.007 ^e	0.017 ^d	0.003 ^a	0.007 ^f	0.008 ^f	0.004 ^a	0.008 ⁱ	0.003 ^b
	RSD	1.522	3.790	1.316	1.424	1.578	1.624	1.266	0.796
C15:0 pentadecilna kiselina	avg	0.990	1.010	0.330	1.150	1.080	0.520	1.660	1.110
	sd	0.012 ^{ef}	0.016 ^{fg}	0.004 ^a	0.005 ⁱ	0.007 ^h	0.003 ^c	0.008 ^l	0.012 ^h
	RSD	1.226	1.622	1.104	0.464	0.622	0.596	0.470	1.072
C15:1 pentadekanska kiselina	avg	0.080	0.070	0.020	0.090	0.060	0.020	0.140	0.090
	sd	0.001 ^g	0.001 ^f	0.000 ^b	0.001 ^h	0.000 ^e	0.000 ^b	0.001 ^j	0.001 ^h
	RSD	0.756	1.316	1.792	1.224	0.650	0.258	1.046	0.904
C16:0 palmitinska kiselina	avg	14.630	13.890	10.320	15.630	16.010	10.630	21.350	18.630
	sd	0.231 ^{bc}	0.293 ^b	0.153 ^a	0.059 ^{cd}	0.052 ^d	0.139 ^a	0.800 ^e	0.869 ^e
	RSD	1.578	2.112	1.482	0.378	0.326	1.306	3.748	4.664
C16:1 palmitoleinska	avg	0.530	0.490	0.210	0.280	0.290	0.180	0.630	0.510
	sd	0.001 ^{gh}	0.007 ^f	0.004 ^{ab}	0.002 ^c	0.003 ^c	0.002 ^a	0.012 ⁱ	0.010 ^{fg}
	RSD	0.272	1.430	1.748	0.824	1.046	1.094	1.926	1.906
C17:0 margarinska kiselina	avg	0.620	0.650	0.250	0.710	0.760	0.320	0.680	0.520
	sd	0.004 ⁱ	0.005 ^j	0.002 ^b	0.005 ^l	0.010 ^m	0.007 ^c	0.009 ^k	0.010 ^f
	RSD	0.712	0.698	0.846	0.730	1.296	2.110	1.308	1.982

C17:1 heptadezenska kiselina	avg	0.160	0.140	0.030	0.110	0.110	0.020	0.190	0.130
	sd	0.006 ^h	0.002 ^f	0.001 ^b	0.003 ^d	0.003 ^d	0.001 ^a	0.000 ⁱ	0.003 ^e
	RSD	3.562	1.553	2.856	2.994	2.452	3.325	0.241	2.141
C18:0 stearinska kiselina	avg	6.420	6.56	3.880	7.010	7.230	4.110	2.530	2.110
	sd	0.227 ^e	0.156 ^{ef}	0.121 ^c	0.130 ^{fgh}	0.161 ^{gh}	0.084 ^c	0.045 ^a	0.068 ^a
	RSD	3.542	2.371	3.114	1.852	2.231	2.035	1.785	3.221
C18:1 trans-oleinska kiselina	avg	0.180	0.190	0.090	0.150	0.130	0.040	0.250	0.160
	sd	0.004 ^f	0.004 ^f	0.003 ^b	0.003 ^e	0.002 ^d	0.000 ^a	0.005 ⁱ	0.002 ^e
	RSD	2.310	2.289	2.986	2.199	1.422	0.785	2.002	1.458
C18:1 cis-oleinska kiselina	avg	48.630	49.210	21.330	36.520	39.780	14.330	35.850	12.230
	sd	1.408 ^g	1.636 ^g	0.523 ^b	1.676 ^{de}	1.295 ^f	0.159 ^a	0.881 ^{de}	0.381 ^a
	RSD	2.896	3.325	2.452	4.589	3.256	1.112	2.458	3.114
C18:2 trans-linolna kiselina	avg	0.070	0.060	0.020	0.080	0.040	0.020	0.010	0.010
	sd	0.001 ^f	0.001 ^e	0.000 ^b	0.002 ^g	0.001 ^c	0.000 ^b	0.000 ^a	0.000 ^a
	RSD	1.085	0.989	1.254	2.117	3.256	1.985	1.236	1.023
C18:2 cis-linolna kiselina	avg	1.109	1.526	1.996	0.223	0.356	0.452	0.388	0.345
	sd	0.210 ^c	0.230 ^d	0.090 ^e	0.150 ^{ab}	0.160 ^{ab}	0.080 ^b	0.100 ^{ab}	0.090 ^{ab}
	RSD	2.852	2.481	3.256	2.856	2.542	3.952	3.256	2.921
C18:3 linolenska kiselina	avg	0.180	0.160	0.080	0.090	0.080	0.020	0.120	0.070
	sd	0.009 ^f	0.008 ^e	0.005 ^{bc}	0.002 ^c	0.004 ^{bc}	0.001 ^a	0.011 ^d	0.006 ^b
	RSD	5.114	5.032	6.521	2.021	5.003	7.065	8.768	9.032
C18:3 gama kiselina	avg	0.990	0.850	0.140	0.120	0.150	0.050	0.310	0.140
	sd	0.032 ^h	0.009 ^g	0.003 ^b	0.002 ^b	0.002 ^b	0.002 ^a	0.014 ^d	0.006 ^b
	RSD	3.225	1.023	1.856	1.562	1.335	3.253	4.633	4.589
C20:0 arahidinska kiselina	avg	0.150	0.160	0.080	0.130	0.110	0.060	0.260	0.120
	sd	0.003 ^{de}	0.003 ^e	0.001 ^{ab}	0.008 ^{cde}	0.003 ^{bc}	0.002 ^a	0.004 ^g	0.004 ^{cd}
	RSD	2.325	1.856	1.221	6.214	2.956	3.889	1.623	3.224
C20:1 eikosenoična kiselina	avg	0.110	0.120	0.040	0.080	0.080	0.050	0.230	0.140
	sd	0.003 ^c	0.004 ^c	0.001 ^a	0.002 ^b	0.003 ^b	0.002 ^a	0.005 ^g	0.003 ^d
	RSD	2.358	3.124	2.258	2.998	3.385	3.118	2.325	1.996
C20:2 eikozadienska kiselina	avg	0.080	0.070	0.050	0.110	0.120	0.080	0.180	0.140
	sd	0.001 ^b	0.001 ^b	0.001 ^a	0.004 ^c	0.004 ^c	0.002 ^b	0.004 ^e	0.005 ^d
	RSD	1.089	0.996	2.325	3.326	2.998	2.323	2.331	3.332
C21:0 heneikosanoična kiselina	avg	0.130	0.150	0.070	0.090	0.090	0.030	0.140	0.090
	sd	0.001 ^g	0.001 ⁱ	0.001 ^c	0.000 ^d	0.001 ^d	0.000 ^a	0.000 ^h	0.000 ^d
	RSD	0.712	0.963	0.822	0.426	0.689	0.411	0.314	0.114
C20:3 n = 3 cis-11,14,17-eikozatrienska kiselina	avg	0.140	0.140	0.080	0.060	0.070	0.020	0.150	0.020
	sd	0.001 ⁱ	0.001 ⁱ	0.000 ^e	0.000 ^c	0.000 ^d	0.000 ^a	0.000 ^j	0.000 ^a
	RSD	0.433	0.568	0.612	0.441	0.562	0.411	0.163	0.085
C20:4 arahidonska kiselina	avg	0.060	0.040	0.030	0.070	0.070	0.030	0.130	0.090
	sd	0.000 ^c	0.000 ^b	0.000 ^a	0.000 ^d	0.000 ^d	0.000 ^a	0.005 ^g	0.000 ^f
	RSD	0.163	0.141	0.285	0.293	0.288	0.355	3.526	0.523
C20:3 n = 6 cis-8,11,14-eikozatrienska kiselina	avg	0.060	0.060	0.010	0.050	0.050	0.020	0.110	0.070
	sd	0.000 ^f	0.000 ^f	0.000 ^a	0.000 ^e	0.000 ^e	0.000 ^b	0.000 ⁱ	0.000 ^g
	RSD	0.204	0.432	0.568	0.399	0.523	0.632	0.174	0.235
C22:0 behenska kiselina	avg	0.360	0.900	0.150	0.320	0.360	0.210	0.480	0.210
	sd	0.001 ^f	0.005 ^k	0.001 ^a	0.003 ^d	0.004 ^f	0.001 ^b	0.001 ⁱ	0.001 ^b

	RSD	0.332	0.568	0.865	0.998	1.024	0.487	0.206	0.336
C20:5 eikozapentaenska kiselina	avg	0.190	0.140	0.080	0.230	0.220	0.110	0.220	0.150
	sd	0.001 ^f	0.000 ^c	0.000 ^a	0.001 ⁱ	0.001 ^h	0.000 ^b	0.006 ^h	0.003 ^d
	RSD	0.542	0.213	0.135	0.356	0.331	0.368	2.896	2.114
C22:1 eurisinska kiselina	avg	0.150	0.120	0.070	0.100	0.090	0.060	0.160	0.110
	sd	0.001 ^g	0.002 ^f	0.001 ^b	0.001 ^d	0.001 ^c	0.001 ^a	0.002 ^h	0.002 ^e
	RSD	0.993	1.856	0.874	1.125	1.563	1.983	1.112	1.941
C22:2 dokoziadienska kiselina	avg	0.250	0.210	0.180	0.190	0.150	0.110	0.290	0.210
	sd	0.001 ^e	0.002 ^d	0.001 ^c	0.001 ^c	0.002 ^b	0.001 ^a	0.001 ^f	0.002 ^d
	RSD	0.452	0.883	0.398	0.623	1.124	0.853	0.177	1.022
C23:0 trihozilna kiselina	avg	0.290	0.260	0.230	0.420	0.340	0.260	0.330	0.240
	sd	0.005 ^d	0.003 ^c	0.005 ^a	0.005 ⁱ	0.002 ^{fg}	0.001 ^c	0.004 ^f	0.001 ^{ab}
	RSD	1.632	1.256	2.325	1.268	0.562	0.421	1.121	0.401
C24:0 lignocerinska kiselina	avg	0.230	0.250	0.210	0.350	0.360	0.210	0.510	0.420
	sd	0.002 ^b	0.003 ^c	0.002 ^a	0.001 ^e	0.002 ^f	0.003 ^a	0.001 ⁱ	0.001 ^g
	RSD	0.993	1.256	0.945	0.423	0.554	1.325	0.258	0.347
C22:6 dokosaheksaenoična kiselina	avg	0.510	0.560	0.330	0.370	0.390	0.260	0.630	0.510
	sd	0.005 ^g	0.003 ⁱ	0.002 ^b	0.003 ^c	0.003 ^d	0.002 ^a	0.004 ^l	0.003 ^g
	RSD	0.997	0.604	0.689	0.699	0.741	0.883	0.652	0.526

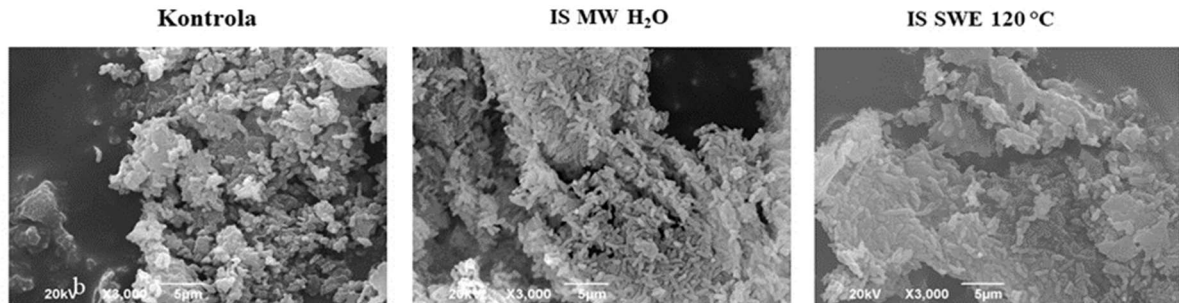
Rezultati su izraženi kao srednja vrednost za tri ponavljanja ± standardna devijacija (n=3). Različita slova u kolonama označavaju statistički različite vrednosti ($p \leq 0.05$). IM – mongolska Čaga, MW 96% EtOH, 50% EtOH, H₂O - mikrotalasna ekstrakcija; VAE 96% EtOH, 50% EtOH, H₂O – ultrazvučna ekstrakcija; SWE 200 °C, 120°C – subkritična vodena ekstrakcija

Prilog 7.



Vizualizacija biofilma fluorescentnom mikroskopijom. Uticaj IS MW H₂O, IM MW H₂O, IS SWE 120°C, IM SWE 120°C ekstrakata na formiranje (b, c, d, e) i dekompoziciju formiranog biofilma (g, h, i, j). *P. aeruginosa* MMA83 klinički izolat inkubiran je 24 h sa 5 mg/ml analiziranih ekstrakata u cilju vizualizacije njegovog efekta na formiranje biofilma (b, c, d, e). Uticaj ekstrakata na dekompoziciju 24 h starog formiranog biofilma praćen je nakon 24 h tretmana ekstraktima (g, h, i, j). Fluorescentne mikrografije netretiranih biofilmova *P. aeruginosa* MMA83 starih 24 h (a) i 48 h (f) (uz dodatak DMSO 0,5% v/v) na pokrovnim staklima. Fluorescentne boje SYTO9 (zelena) i PI (crvena) su korišćene za bojenje biofilma.

Prilog 8.



Vizualizacija biofilma skenirajućom elektronskom mikroskopijom. Uticaj IS MW H₂O i IS SWE 120°C ekstrakata na formiranje biofilma *P. aeruginosa* MMA83. SEM mikrografije netretiranih biofilмова (kontrola) *P. aeruginosa* MMA83 (uveličanje x3000). Mikrografije sa uticajem IM MW H₂O i IM SWE 120°C nisu bile odgovarajućeg kvaliteta.

BIOGRAFIJA KANDIDATA

Vesna Lazić rođena je 15.11.1993. godine u Bajinoj Bašti, gde je 2012. godine završila gimnaziju "Josif Pančić". Iste godine upisala je Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu na studijskom programu Biologija. Osnovne studije završila 2016. godine sa prosekom 8,93. Master akademske studije je upisala iste godine na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, na modulu Biologija mikroorganizama i odbranila master rad septembra 2017. godine sa prosečnom ocenom 9,83. U oktobru 2017. godine upisuje Doktorske akademske studije na modulu Prehrambena tehnologija, smer tehnološka mikrobiologija.

Tokom osnovnih i master studija bila je stipendista Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije (MPNTR). Od juna 2018. godine je preko poziva za talentovane mlade istraživače MPNTR uključena u naučno-istraživački rad i zaposlena kao istraživač-saradnik na Poljoprivrednom fakultetu Univerziteta u Beogradu (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 januara 2022. godine angažovana je na projektu pod nazivom "Composite clays as advanced materials in animal nutrition and biomedicine - AniNutBiomedCLAYs" u okviru projektnog ciklusa IDEJE Fonda za Nauku Republike Srbije. Od januara 2024. godine anagažovana je na još jednom projektu pod nazivom "Activated Charcoal as a Carrier of Probiotics: A New Approach for Pathogen Elimination in Wounds - ProHealingAC" u okviru projektnog ciklusa PROMIS Fonda za Nauku Republike Srbije.

Od 2018. godine učesvuje u održavanju i organizaciji praktične nastave na sledećim predmetima: Opšta mikrobiologija, Mikrobiologija biljnih proizvoda, Industrijski mikroorganizmi u hrani biljnog porekla, Mikrobiološko kvarenje hrane i Bioaktivne materije mikrobiološkog porekla.

Kao autor i koautor objavila je šest naučnih radova, od kojih su dva nastala iz istraživanja u okviru doktorske disertacije, na kojima je prvi autor. Na naučnim skupovima u zemlji i inostranstvu učestovala je sa 25 saopštenja.

Izjava o autorstvu

Ime i prezime autora: Vesna Lazić

Broj indeksa: TH170007

Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom:

Uticaj načina ekstrakcije na antiadhezivni i antibiofilmski potencijal i biološka svojstva gljive *Inonotus obliquus*

- 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: Vesna Lazić

Broj indeksa: TH170007

Studijski program: Prehrambena tehnologija

Naslov rada: Uticaj načina ekstrakcije na antiadhezivni i antibiofilmski potencijal i biološka svojstva gljive *Inonotus obliquus*

Mentor : 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:

Uticao načina ekstrakcije na antiadhezivni i antibiofilmski potencijal i biološka svojstva gljive *Inonotus obliquus*

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.