

# Nutritivna vrijednost i antioksidacijska svojstva gljive *Amanita caesarea* u različitim stadijima zrelosti plodnih tijela

---

Mihalj, Nika

Undergraduate thesis / Završni rad

2017

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:659922>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom](#).

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-29**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Preddiplomski studij Biotehnologija

**Nika Mihalj**  
6889/BT

**NUTRITIVNA VRIJEDNOST I ANTIOKSIDACIJSKA  
SVOJSTVA GLJIVE *Amanita caesarea* U RAZLIČITIM  
FAZAMA ZRELOSTI PLODNIH TIJELA**

**ZAVRŠNI RAD**

**Predmet:** Biotehnologija 2

**Mentor:** Izv. prof. dr. sc. *Sunčica Beluhan*

**Zagreb, 2017.**

Ovaj rad je izrađen u Laboratoriju za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju slada i piva, Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod stručnim vodstvom izv. prof. dr. sc. Sunčice Beluhan.

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Preddiplomski studij Biotehnologija

Zavod za biokemijsko inženjerstvo  
Laboratorij za biokemijsko inženjerstvo,  
industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju piva i slada

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti  
Znanstveno polje: Biotehnologija

### NUTRITIVNA VRIJEDNOST I ANTIOKSIDACIJSKA SVOJSTVA GLJIVE *Amanita caesarea* U RAZLIČITIM STADIJIMA ZRELOSTI PLODNIH TIJELA

*Nika Mihalj, 0058204893*

**Sažetak:** U ovom radu je ispitana nutritivna vrijednost, udjel bioaktivnih sastojaka i antioksidacijska aktivnost ekstrakata gljive *Amanita caesarea* u vrućoj vodi (90 °C) i metanolu (37 °C) iz 5 stadija zrelosti (mala i velika jaja, vrlo mlada, mlada i zrela plodna tijela). Određen je i uspoređen kemijski sastav (proteini, šećeri, masne kiseline, pepeo, tokoferoli, askorbinska kiselina i fenolni spojevi) ove smonikle jestive gljive koja je cijenjena u gastronomiji. Prosječne vrijednosti proteina, masti i sadržaja pepela iznosile su 17, 11 i 3 g suhe tvari. Provedena su četiri testa: sposobnost uklanjanja radikala, reducirajuća snaga, inhibicija lipidne peroksidacije i sposobnost keliranja Fe<sup>2+</sup> iona kako bi se izmjerila antioksidacijska aktivnost ekstrakata. Svi ekstrakti su imali usporedivu antioksidacijsku sposobnost. Redukcijska snaga ekstrakata pokazala se izvrsnom, a sposobnost keliranja se povećavala s povećanjem koncentracije ekstrakata. Rezultati su pokazali da je gljiva *A. caesarea* izvrstan izvor nutritivnih, bioaktivnih i antioksidacijskih sastojaka u svim stadijima zrelosti.

**Ključne riječi:** *Amanita caesarea*, analize nutrienata, bioaktivni sastojci, antioksidacijska aktivnost

**Rad sadrži:** 41 stranicu, 9 slika, 5 tablica, 147 literaturnih navoda

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb**

**Mentor:** *Izv. prof. dr. sc. Sunčica Beluhan*

**Datum obrane:** 8. rujna 2017.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

**University of Zagreb**  
**Faculty of Food Technology and Biotechnology**  
**Undergraduate studies Biotechnology**

**Department of Biochemical engineering**  
**Laboratory for Biochemical Engineering,**  
**Industrial Microbiology, Brewing and Malting Technology**

**Scientific area: Biotechnical Sciences**  
**Scientific field: Biotechnology**

### **NUTRITIVE VALUE AND ANTIOXIDATIVE PROPERTIES OF *Amanita caesarea* AT DIFFERENT FRUITING BODIES MATURITY STAGES**

***Nika Mihalj, 0058204893***

**Abstract:** The nutritive analysis, bioactive components content and antioxidant activity of hot water (90 °C) and methanolic (37 °C) extracts of *Amanita caesarea* in five stages of maturity (small and big eggs, very young, young, and mature fruiting bodies) were evaluated in this work. We describe and compare the chemical constituents (proteins, sugars, fatty acids, tocopherols, ascorbic acid and phenolic compounds) of this wild edible mushroom appreciated in gastronomy. Medians of protein, lipid and ash content were about 17, 11 and 3 g of dry matter, respectively. Four assays, radical scavenging capacity, reducing power, inhibition of lipid peroxidation and chelating ability for ferrous ions were used to screen the antioxidant capability of extracts. All extracts had comparable antioxidant capacity. The reducing power of the extracts was excellent, and chelating capacity was increased with the increasing concentration. Our results support the use of all five stages of maturity of *A. caesarea* as source of nutritive, bioactive and antioxidant compounds.

**Keywords:** *Amanita caesarea*, nutritive analysis, bioactive components, antioxidant activity

**Thesis contains:** 41 pages, 9 figures, 5 tables, 147 references

**Original in:** Croatian

**Thesis is in printed and electronic form deposited in the library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb**

**Mentor:** *Sunčica Beluhan, PhD, Associate Professor*

**Defence date:** September 8<sup>th</sup> 2017

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>2. TEORIJSKI DIO</b> .....	<b>2</b>
2.1. Carstvo gljiva .....	2
2.2. Nutritivna vrijednost i ljekovitost gljiva .....	3
2.3. Kemijski sastav gljiva .....	4
2.4. Ljekoviti značaj gljiva.....	5
2.5. Gljive iz roda <i>Amanita</i> .....	6
2.5.1. <i>A. caesarea</i> .....	7
2.6. Antioksidacijsko djelovanje.....	8
2.6.1. Oksidacijski stres .....	9
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....	<b>13</b>
3.1. Materijali i metode rada .....	14
3.1.1. Uzorci gljiva .....	14
3.1.2. Standardi i reagensi .....	14
3.1.3. Reagensi za određivanje ukupnih fenola .....	15
3.2. Aparati .....	15
3.3. Analitičke metode.....	16
3.3.1. Kemijski sastav gljiva .....	16
3.3.2. Ekstrakcija bioaktivnih sastojaka .....	18
3.3.3. Određivanje udjela bioaktivnih sastojaka .....	19
3.3.4. Određivanje antioksidacijske aktivnosti .....	20
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA</b> .....	<b>22</b>
4.1. Nutritivna vrijednost i kemijski sastav gljive <i>A. caesarea</i> .....	22
4.2. Bioaktivni spojevi i antioksidacijska svojstva .....	23
<b>5. ZAKLJUČCI</b> .....	<b>29</b>
<b>6. LITERATURA</b> .....	<b>30</b>

## **1. UVOD**

Posljednjih se godina razvila višestruka otpornost na lijekove protiv ljudskih patogenih mikroorganizama zbog pretjerane upotrebe tržišnih antimikrobnih lijekova koji se obično koriste u liječenju zaraznih bolesti. Takvo stanje je ponukalo znanstvenike da intenzivnije počnu istraživati nove antioksidacijske supstancije iz raznih biljaka koje su dobri izvori novih antimikrobnih kemoterapijskih agenasa (Karaman i sur., 2003; Turkoglu i sur., 2007).

Gljive su bogat izvor prirodnih antibiotika pa je zato ispitivana antimikrobna aktivnost ekstrakata gljiva.

Povezanost ljudi s gljivama traje od davnina. Još su stari Egipćani vjerovali da su gljive dar boga Ozirisa, dok su u antičkom Rimu nazivane božanskom hranom. Gljive se i danas smatraju delikatesom, osobito zbog svoje specifične arome i teksture. Izvrsno su balansirana hrana čijom je konzumacijom omogućena definirana prehrana i unos zdravih sastojaka u organizam. Poznato je da su izvor brojnih bioaktivnih supstancija, uglavnom vezanih na staničnu stijenku, koje pomažu u poboljšanju imunostava organizma u borbi protiv malignih bolesti (Ramesh i Pattar, 2010). Te bioaktivne supstancije su fenoli (fenolne kiseline i flavonoidi), karotenoidi, tokoferol te askorbinska kiselina i važni su zaštitni agensi za ljudsko zdravlje (Block i sur., 1992).

Osim svojih farmakoloških (Bobek i sur., 1991; Bobek i Galbavy, 1999) svojstava, samonikle gljive su sve važnije u našoj prehrani i zbog svoje nutritivne vrijednosti, visokog udjela proteina i niskog udjela masti (Aletor, 1995; Longvah i Deosthale, 1998; Diéz i Alvarez, 2001; Agrahar-Murugkar i Subbulakshmi, 2005; Barros i sur., 2007a), no važno je istaknuti da nutritivne vrijednosti, odnosno kemijski sastav ovise o stadiju zrelosti gljiva i kulinarskoj obradi (Dikeman i sur., 2005).

Cilj ovoga rada bio je proučiti kemijski sastav i antioksidacijska svojstva samonikle vrhunske gljive *Amanita caesarea* (blagva). Pokusi su bili podijeljeni i provedeni u 3 nezavisna koraka kako bi se:

- 1) odredio prosječni kemijski sastav gljiva (udjel suhe tvari, proteina, masti, pepela i ukupnih šećera) te njihova energijska vrijednost,
- 2) usporedio prinos ekstrakta iz gljiva nakon ekstrakcije s dva ekstrakcijska sredstva; vrućom vodom i metanolom,
- 3) provela ekstrakcija bioaktivnih sastojaka (ukupni fenoli i flavonoidi), istražila antioksidacijska svojstva gljiva (udjel askorbinske kiseline,  $\beta$ -karotena i likopena) te reducirajuća snaga i sposobnost keliranja.



## **2. TEORIJSKI DIO**

## 2.1. Carstvo gljiva

Organizmi koji pripadaju lozi gljiva uključuju: gljive, hrđe, snijeti, puhare, tartufe, smrčke, plijesni i kvasce, kao i brojne manje poznate organizme (Alexopoulos i sur., 1996). Whittaker je 1969. godine gljive svrstao u zasebno kraljevstvo, odvojeno od biljaka. Razlog tome je što niti jedna gljiva ne vrši fotosintezu. Gljive moraju upijati hranjive tvari koje proizvedu drugi organizmi, a razlikuju se od biljaka i po sastavu stanične stijenke, strukturi tijela i načinu razmnožavanja (Whittaker, 1969).

Gljive karakteriziraju nepokretna tijela (talus) koja su građena od apikalnih izduženih niti stijenke (hife), životni ciklus sa seksualnim i neseksualnim razmnožavanjem, obično iz zajedničkog talusa, haploidnim talusima koji proizlaze iz zigotske mejoze te heterotrofnom prehranom. Polarna tijela diobenih vretena, a ne centrioli, obično su povezani s jezgrinom ovojnicom tijekom diobe stanica. Karakteristični dijelovi stijenke su hitin ( $\beta$ -1,4-vezani homopolimeri N-acetilglukozamina u mikrokristalnom stanju) te glukani, u prvom redu  $\alpha$ -glukani ( $\alpha$ -1,3 i  $\alpha$ -1,6 veze) (Griffin, 1994; Alexopoulos i sur., 1996). Carstvo Gljiva klasificira se nadalje u četiri različita koljena: 1) Basidiomycota (club fungi) (stapčarke), 2) Ascomycota (sac fungi) (mješinarke), 3) Zygomycota (conjugation fungi) (zigomiceti), i 4) Deuteromycota (imperfect fungi) (nesavršene gljive).

Vrste koljena Basidiomycota uključuju vrste iz razreda *Basidiomycetes* koje imaju makroskopska plodna tijela, dovoljno velika da se mogu vidjeti golim okom. Mnoge gljive u ovom koljenu izgledaju kao kišobrani koji rastu iz zemlje. Među poznatijim rodovima u ovom koljenu su: *Agaricus* (uključujući tip šampinjona koji se može naći u supermarketima), *Amanita* (uključujući vrste koje su smrtonosne, ukusne ili čak halucinogene), *Boletus* (najpoznatiji je ljetni vrganj) i *Cantharellus* (poznat po ukusnoj i prekrasnoj lisički). Cijenjeni smrčci i tartufi vrsta su koljena Ascomycota. *Saccharomyces cerevisiae* još je jedna vrsta ovog koljena cijenjena zbog svojih biotehnoloških primjena. Najpoznatija je vrsta koljena Zygomycota, koje sadrži oko 600 vrsta, plijesan kruha, kao što je *Rhizopus stolonifer*. Deuteromycota, nesavršene gljive, uključuju rodove kao što su *Trichophyton* (atletsko stopalo), *Penicillium* (penicilin), i *Candida albicans* („kvasac“ infekcije) (Arora, 1986; Margulis i Schwartz, 1988; Alexopoulos i sur., 1996).

Iako postoje rane reference o antibakterijskim aktivnostima koje su pokazale gljive koje pripadaju podjeli Basidiomycota (Robbins i sur., 1947; Brian, 1951; Takeuchi, 1969), tek je unatrag zadnjih 20 godina širi raspon rodova, vrsta i izolata unutar ove podjele detaljnije

ispitan za antibiotska svojstva (Anke i sur., 1980; Coletto i Mondino, 1991; Lorenzen i Anke, 1998; Wasser i Weis, 1999; Rosecke i Konig, 2000; Wasser, 2002).

## **2.2. Nutritivna vrijednost i ljekovitost gljiva**

Gljive se odavno koriste u ljekovite i prehranbene svrhe. Sve smo više svjesni toga da pravilna prehrana utječe na brojne funkcije ljudskog tijela te sudjeluje u održavanju dobrog zdravlja, što je nužno za smanjenje rizika od brojnih bolesti. Moderna farmakološka istraživanja potvrđuju tradicionalna znanja vezana uz zdravstvene učinke gljiva, koje imaju protugljivična, antibakterijska, antioksidativna i antivirusna svojstva uz dodatak da su i funkcionalna hrana.

Makrofungi su s distinktivnim plodnim tijelom koje može biti nadzemno ili podzemno te dovoljno veliko da bude vidljivo golim okom i da se može ubrati rukom (Chang i Miles, 1992). Vidljivo je samo plodno tijelo gljive, a ostatak gljive nalazi se ispod zemlje u obliku micelija. Geološki, gljive su postojale na Zemlji prije čovjeka, kao što se može vidjeti iz fosila koji potječu iz razdoblja rane Krede. Prema tome, antropološki govoreći, postoji velika mogućnost da je čovjek koristio gljive kao hranu dok je još uvijek bio sakupljač hrane i lovac u kronologiji kulturne evolucije.

Gljive imaju jako široku primjenu te se, osim svojih ekoloških uloga, mogu koristiti kao hrana i lijek, no još uvijek su jedan su od najneiskorištenijih izvora hrane budućnosti. Pokazale su se učinkovite protiv raka, pri smanjenju kolesterola, stresa, nesаницe, astme, alergija i dijabetesa (Bahl, 1983). Bogate su proteinima i trebale bi biti sastavni dio vegetarijanske prehrane jer osiguravaju taj nužni udjel proteina koji vegetarijanska prehrana ne omogućava. Kao funkcionalna hrana u obliku tableta koriste se kao dodatak hranjivim tvarima kako bi se povećao imunitet. Zbog niske razine škroba i niskog kolesterola, pogodne su za dijabetičare i srčane bolesnike. Trećinu željeza u gljivama ljudsko tijelo može apsorbirati, a njihove se polisaharidne molekule koriste kao lijek protiv raka. Korištene su uspješno čak i u borbi protiv HIV-a (Nanba, 1993; King, 1993). Biološki aktivni spojevi iz gljiva imaju protugljivična, antibakterijska, antioksidacijska i protuvirusna svojstva te se koriste kao insekticidi i nematicidi.

### 2.3. Kemijski sastav gljiva

Sadržaj ugljikohidrata kod gljiva sačinjava većinu plodnog tijela, čineći oko 50 do 65% njegove suhe mase. Slobodni šećeri su sadržani u količini od oko 11%. Florczak i sur. (2004) naveli su da *Coprinus atramentarius* (Bull.: Fr.) Fr. sadrži 24% ugljikohidrata u suhoj masi. Manitol, poznat i kao gljivični šećer, čini oko 80% svih slobodnih šećera te je time dominantni šećer (Tseng i Mau, 1999; Wannet i sur., 2000), no određene su i manje koncentracije rafinoze, saharoze, glukoze, fruktoze i ksiloze (Singh i Singh, 2002.). Polisaharidi gljiva topljivi u vodi djeluju protutumorski (Yoshioka i sur., 1975).

Proteini su važni sastojci suhe tvari gljiva (Aletor, 1995; Alofe i sur., 1995; Florczak i Lasota, 1995; Zrodowski, 1995; Chang i Buswell, 1996). Proteinski udjel u gljivama ovisi o sastavu hranjive podloge, veličini klobuka, vremenu berbe i vrsti gljiva (Bano i Rajarathnam, 1982). Što se tiče količine topljivih proteina, u gljivama ih ima manje nego u mesu, ali značajno više nego u ostaloj hrani, poput mlijeka (Chang, 1980). U suhoj tvari gljive obično sadrže 19 do 35% proteina u odnosu na 7.3% u riži, 12.7% u pšenici, 38.1% u soji i 9.4% u kukuruzu (Crisan i Sands, 1978; Li i Chang, 1982; Bano i Rajarathnam, 1988). Verma i sur. (1987) su utvrdili da su gljive korisne za vegetarijance jer sadrže neke esencijalne aminokiseline koje se mogu naći u životinjskim proteinima. Probavljivost proteina gljiva *Pleurotus* jednaka je kao kod biljnih proteina (90%), dok probavljivost životinjskih proteina iznosi 99% (Bano i Rajarathnam, 1988). Rai i Saxena (1989) primijetili su smanjenje proteinskog sadržaja kod uskladištenih gljiva. Učinkovitost pretvorbe proteina jestivih gljiva po jedinici površine i jedinici vremena daleko je veća u odnosu na životinjske izvore proteina. Gljive u načelu imaju viši proteinski sadržaj od većine povrća (Bano i Rajarathnam, 1988) i većine samoniklih biljaka (Kallman, 1991). Gljive sadrže sve esencijalne aminokiseline potrebne odrasloj osobi (Hayes i Haddad, 1976).

Kod gljiva je sadržaj masti vrlo nizak u odnosu na sadržaj ugljikohidrata i proteina.

Najzastupljenije masti sadržane u plodnim tijelima gljiva su nezasićene masne kiseline.

Ukupni sadržaj masti kod gljive *A. bisporus* iznosi od 1.66 do 2.2/100 g na suhu tvar (Maggioni i sur., 1968). Ogundana i Fagade (1981.) ustanovili su da gljive imaju 4.481% masti u suhoj težini. Kanwar i sur. (1990.) zabilježili su sadržaj masti od 11.52% u suhoj težini plodnih tijela gljive *Amanita caesarea*. U 100 grama svježje tvari gljiva *A. bisporus* (Lange) Sing i *Pleurotus ostreatus* (Jacq: Fr.) Kumm sadržaj masnih spojeva iznosio je 0.3 i 0.4 g (Manzi i sur., 2001), ali u suhoj težini je iznosio 2.0 i 1.8 g (Shah i sur., 1997). Gljive se smatraju dobrim izvorom masti i minerala (Jiskani, 2001). Yilmaz i sur. (2006) i Pedneault

i sur. (2006.) su utvrdili da se mast kod gljiva sastoji uglavnom od nezasićenih masnih kiselina.

Gljive su jedan od najboljih izvora vitamina, posebice vitamina B (Breene, 1990; Mattila i sur., 1994; Zrodolowski, 1995; Chang i Buswell, 1996; Mattila i sur., 2000). Prema Mattili i sur. (1994) samonikle gljive sadržavaju puno veće količine vitamina D2 od u tami uzgojene *A. bisporus*. Gljive također sadrže i vitamin C u malim količinama (Sapers i sur., 1999; Mattila i sur., 2001) koje su siromašne vitaminima A, D i E (Anderson i Fellers, 1942).

Plodna tijela gljiva karakterizira visoka razina dobro asimiliranih mineralnih elemenata. Glavni minerali kod gljiva su K, P, Na, Ca, Mg, a elementi kao što su Cu, Zn, Fe, Mo, Cd oblikuju manje sastavne dijelove (Bano i Rajarathanum, 1982; Chang, 1982). K, P, Na i Mg tvore oko 56 do 70% ukupnog sadržaja pepela gljiva (Li i Chang, 1982), dok sam kalij tvori 45% ukupnog pepela.

Ustanovljeno je da gljive skupljaju teške metale kao što su kadmij, olovo, arsen, bakar, nikal, srebro, krom i živa (Schmitt i Sticher, 1991; Majstrik i Lepsova, 1993; Wondratschek i Roder, 1993; Kalač i Svoboda, 2000; Svoboda i sur., 2001; Issiloglu i sur., 2001; Malinowska, 2004). Udio minerala ovisi o vrsti, starosti i promjeru plodnog tijela te o vrsti hranjive podloge, odnosno supstrata (Demirbas, 2001). Mineralni sadržaj samoniklih jestivih gljiva viši je od onoga kod uzgajanih gljiva (Aletor, 1995; Mattila i sur., 2001; Rudawska i Leski, 2005).

## 2.4. Ljekoviti značaj gljiva

Korištenje gljiva u ljekovite svrhe jednako je staro kao i tradicionalna upotreba gljiva. Gljive se koriste u medicini od neolitika i paleolitika (Samorini, 2001). Grčki liječnik Dioskorid uvrstio je gljive s ariša, tada znane kao *Agaricum*, a kasnije na engleskom kao Quinine conk (*Fomitopsis officinalis* (Villars: Fr.) Bond i Singer, Polyporaceae; syn. *Laricifomes officinalis* (Villars: Fr.), u svoje djelo *De Materia medica*. Korištena je za liječenje bolesti koja je danas poznata kao tuberkuloza.

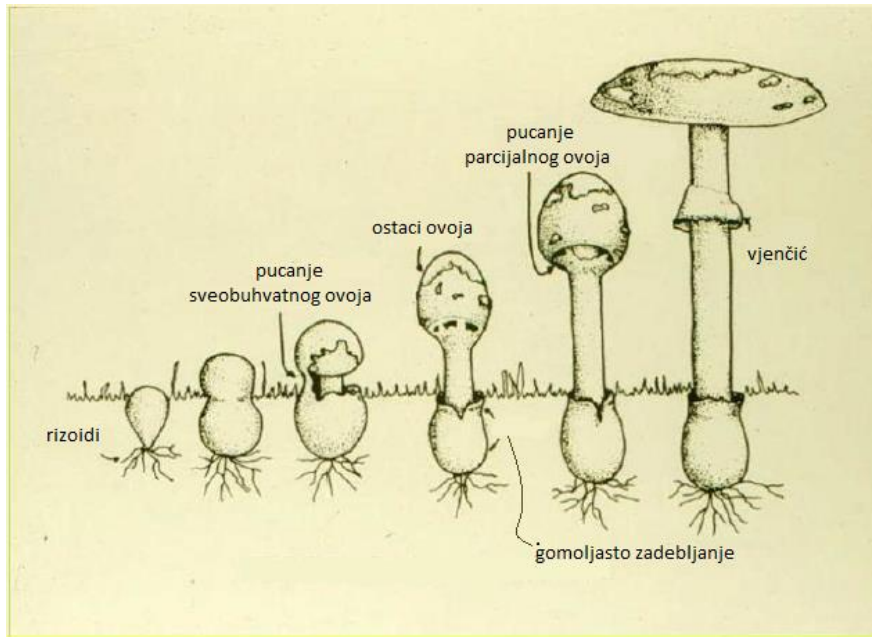
U Kini se gljive koriste kao lijek od 100. godine (Gunde-Cimerman, 1999), ali tek su 1960. godine znanstvenici istražili osnovne aktivne sastojke gljiva koji pozitivno utječu na zdravlje. Gljive se u zdravstvu koriste za liječenje jednostavnih bolesti, kao što su bolesti kože, do složenih, široko rasprostranjenih bolesti, kao što je HIV. Tvrdi se da posjeduju antialergijska i protutumorska svojstva te svojstva koja djeluju na kolesterol (Jiskani, 2001). Vodeni ekstrakti gljive *Pleurotus sajor caju* pomažu kod zatajenja bubrega (Tam i sur., 1986). Prvo

uspješno istraživanje otkrilo je protutumorske učinke ekstrakata iz vruće vode nekoliko vrsta gljiva (Ikekawa i sur., 1969). Glavni sastojci su polisaharidi, posebno  $\beta$ -D glukani. Chihara i sur. (1969) izolirali su iz plodnih tijela gljiva shiitake (*L. edodes*) antitumorski polisaharid koji je nazvan *lentinan*. Bahl (1983) je utvrdio da se gljivama mogu liječiti: epilepsija, rane, kožne bolesti, srčana oboljenja, reumatoidni artritis, kolera, znojenje, proljev, dizenterija, prehlada, bolesti jetre, bolesti žuči te se mogu koristiti kao vermiciidi. Istraživanjima na hipertenzivnim štakorima uočeno je da gljiva manentake (*Ganoderma lucidum*) snižava krvni tlak i koncentraciju seruma (Kabir i sur., 1988). *Lentinus tigrinus* i *G. lucidum* djeluju na sniženje kolesterola (Ren i sur., 1989). *Lentinus edodus* koristi se za povećanje snage, libida i energije te kao agent protiv starenja (Gareth, 1990). Lentinan-sulfat, dobiven iz vrste *Lentinus* usporava progresiju HIV-a. Lijekovi temeljeni na aktivnim supstancijama iz gljiva nemaju nuspojave (Sagakami i sur., 1991). Hranjivi i ljekoviti dijelovi gljive *G. lucidum* pokazuju obećavajuće pozitivne antivirusne učinke te djeluju protiv hepatitisa B (Kino i sur., 1989), HIV-a (Kim i sur., 1993; Liu i Chang, 1995). Dreyfuss i Chapela (1994) utvrdili su da stotine sekundarnih metabolita gljivnog podrijetla posjeduju biološku aktivnost.

Većina je medicinskih gljiva relativno rijetka i mogu se naći samo u šumama gdje ima odumrlog drveća jer prvenstveno razgrađuju lignocelulozu. Za medicinsku se uporabu gotovo uvijek koriste ekstrakti s vrućom vodom te pripravci u praškastom ili koncentriranom obliku. U posljednje se doba sve važne medicinske gljive uzgajaju submerzno na čvrstim supstratima i, kao takav, uzgoj gljiva je jedini biotehnološki proces koji se vodi u velikim mjerilima u kojima su supstrati lignocelulozni materijali (Stamets, 2000).

## 2.5. Gljive iz roda *Amanita*

Između jestive gljive izvrsne kakvoće, blagve (*A. caesarea*) i smrtonosnih gljiva, muhare (*A. muscaria*), panterine muhare (*A. pantherina*) te zelene pupavke (*A. phalloides*), cijelo je mnoštvo gljiva koje se smatraju nejestivima ili bezvrijednima. Pri branju gljiva posebna se pažnja mora posvetiti gljivama iz roda *Amanita*. Već su i njihove spore otrovne i, ako se konzumiraju, izazvat će ozbiljna oštećenja jetre i središnjeg živčanog sustava.



**Slika 1.** Razvojni stadiji gljive iz roda *Amanita* (Božac, 2007).

### **2.5.1. *A. caesarea***

Blagva, *A. caesarea* (Scop.) Pers. je vrsta jestive gljive vrhunske kakvoće iz porodice *Amanitaceae*.

Prema sistematici gljiva blagva spada u:

Razred: Basidiomycota

Podrazred: Agaricomycetes

Red: Agaricales

Porodica: Amanitaceae

Rod: *Amanita*

Vrsta: *A. caesarea*

U početku izgleda kao jaje prekriveno elastičnim ovojem koje puca te se iz njega rađa gljiva. Ovisno o stupnju zrelosti gljive, klobuk je promjera od 5 do 20 cm, žuto-narančaste do crveno-narančaste boje, u mladosti polukuglast, no u najzrelijem stadiju postaje ravniji. Površina klobuka je glatka, ljepljiva i lako se guli. Listići su u mladosti svijetlo žuti, kasnije izraženo žuti, široki i gusti. Stručak je valjkast, u početku pun, kasnije blago šupalj, u donjem

dijelu malo zadebljan i obložen ostacima ovojnice, a može narasti i do 15 cm visine. Meso je u početku bijelo, kasnije žućkasto, slabog mirisa. Spore su jajaste, a otrusina bijelo-žućkasta. U prirodi raste u kasnu jesen i zimi, u obliku busena na panjevima i odumrlom drveću. Najčešće se može naći u hrastovim i kestenovim šumama, no i šumama s bukvama i topolama, ali raste i pod orasima, vrbama, bagremima, jablanima i drugom bjelogoričnom drveću (Božac, 2007) (Slika 2).



**Slika 2.** Fotografija blagve u pet stadija zrelosti (<http://www.plantea.com.hr/blagva/>)

Rijetka je, kod nas je zabilježena samo u sjevernom dijelu Hrvatske, uključujući pojas Istre i Slavonije. Živi u termofilnim bjelogoričnim šumama (listopadnim i zimzelenim), u mikorizi s različitim hrastovima (*Quercus* spp.) i sa šumskim kestenom (*Castanea sativa*). U Crvenoj knjizi gljiva Hrvatske navedena je kao ugrožena i zaštićena je gljiva (Tkalčec i sur., 2008).

## **2.6. Antioksidacijsko djelovanje**

Važnost oksidacije u tijelu i hrani opće je priznata. Oksidativni metabolizam nužan je za preživljavanje stanica. Održavanje ravnoteže između proizvodnje slobodnih radikala i antioksidativne obrane (enzimske i neenzimske) nužan je uvijek za normalno funkcioniranje

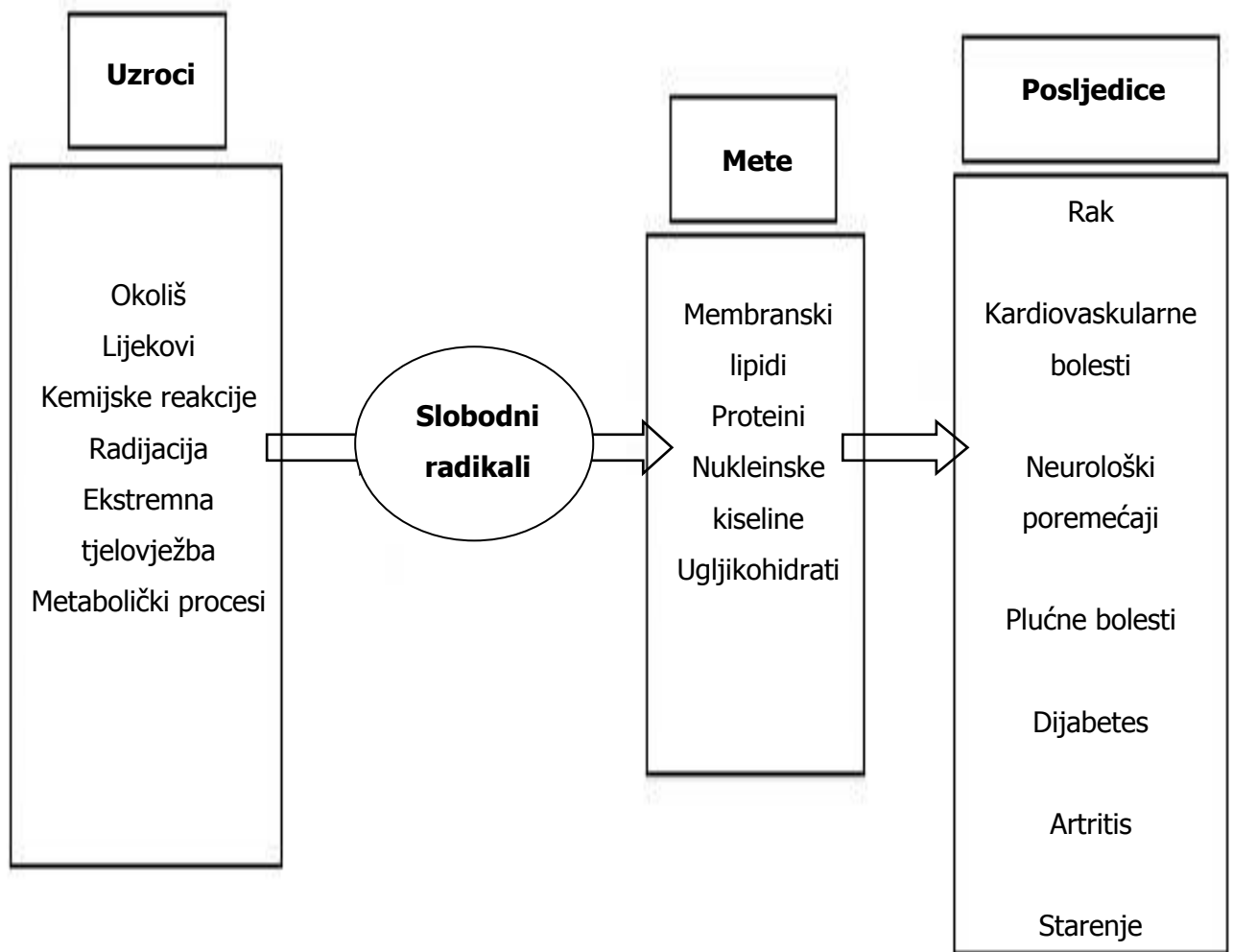


organizma. Kad je ravnoteža poremećena zbog proizvodnje slobodnih radikala, tada kažemo da je organizam u oksidativnom stresu. U takvom slučaju suvišni slobodni radikali mogu oštetiti stanične lipide, proteine i DNA, sprečavajući njihov normalan rad i dovodeći do različitih bolesti. Kod aerobnih organizama slobodni se radikali stalno proizvode tijekom normalnog funkcioniranja stanice, uglavnom u obliku reaktivnih kisikovih vrsta (ROS) i reaktivnih dušikovih vrsta (RNS). Izlaganje organizma slobodnim radikalima dovelo je do razvoja endogenog mehanizma obrane kako bi se oni uklonili. Takva je obrana odgovor evolucije na neizbježnost proizvodnje ROS-a u aerobnim uvjetima. Prirodni proizvodi s antioksidativnom aktivnošću mogu pomoći endogenom obrambenom sustavu. Antioksidanti u prehrani tako predstavljaju veliku važnost kao mogući zaštitnici protiv smanjenja oksidativne štete (Ferreira i Abreu, 2007). Nadalje, oksidacija može utjecati na hranu i jedan je od glavnih uzroka kemijskog kvarenja (Colbert i Decker, 1991) te stvara užeglost i/ili smanjenje nutritivne kakvoće, boje, okusa, teksture i sigurnosti hrane (Shahidi i sur., 1992). Za obrambene mehanizme protiv posljedica pretjerane oksidacije zaslužno je djelovanje različitih antioksidansa (Antolovich i sur., 2002).

### **2.6.1. Oksidacijski stres**

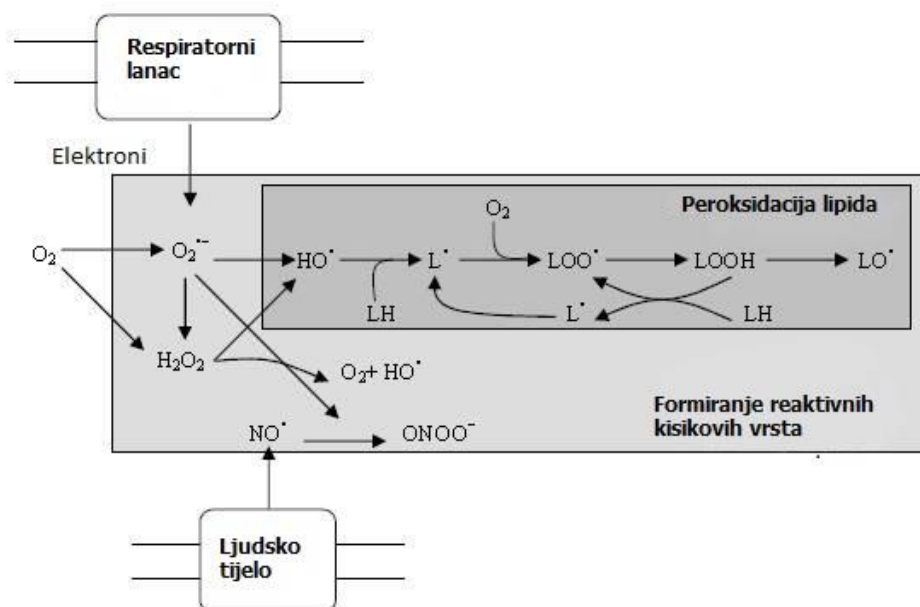
Slobodni radikal definira se kao bilo koji atom ili molekula koja posjeduje nesparene elektrone u vanjskoj ljusci (Halliwell i Gutteridge, 1999). U načelu su nestabilni i vrlo reaktivni. Slobodni radikali kisika i dušika mogu se pretvoriti u druge neradikalne reaktivne vrste kao što su: vodikov peroksid, hipoklorna kiselina (HClO), hipobromasta kiselina (HBrO) i peroksinitrit (ONOO<sup>-</sup>). ROS, RNS i reaktivne vrste klora proizvode se u životinja i ljudi pod fiziološkim (normalni stanični metabolizam aerobnih stanica) i patološkim uvjetima (Aust i Sringen, 1982; Pryor i sur., 1982; Evans i Halliwell, 2001).

Prepoznato je da ROS i RNS imaju dvojnu ulogu: i kao štetne i kao korisne vrste, s obzirom na to da mogu biti štetne i korisne živim sustavima (Valko i sur., 2006). Korisni učinci ROS-a javljaju se pri niskim/umjerenim koncentracijama te uključuju fiziološke uloge u staničnim odgovorima na anoksiju, primjerice u obrani protiv infektivnih agenasa te u funkciji određenog broja staničnih signalnih sustava (Slika 3).



**Slika 3.** Značajni uzroci i posljedice djelovanja slobodnih radikala (Ferreira i Abreu, 2007).

Slobodni radikali mogu uzrokovati širok raspon toksičnih oksidativnih reakcija kao što su: inicijacija peroksidacije membranskih lipida, koja dovodi do nakupljanja lipidnih peroksida, izravna inhibicija enzima mitohondrijskog respiratornog lanca, fragmentacije ili nasumičnog križanja molekula kao što su DNA, enzimi i bjelančevine, što na kraju dovodi do smrti stanice (Halliwell i Gutteridge, 1999) (Slika 4).



**Slika 4.** Peroksidacija lipida i stvaranje slobodnih radikala u ljudskom tijelu (Halliwell i Gutteridge, 1994).

Oštećena tkiva prolaze kroz više reakcija slobodnih radikala od zdravih tkiva (Halliwell i Gutteridge, 1992). Kod većine ljudskih bolesti oksidativni stres je sekundarni fenomen, a ne primarni uzrok bolesti (Gutteridge, 1993). To ne znači da je oksidativni stres nevažan. Primjerice, sekundarno oksidativno oštećenje lipida na stijenkama krvnih žila značajno pridonosi razvoju ateroskleroze, a nizak prehrambeni unos vitamina E predstavlja faktor rizika. Potreba prehranbenog unosa vitamina E vjerojatno se povećava ako se poveća postotak polinezasićenih masnih kiselina u prehrani – ovaj je fenomen poznat kod životinja, ali još nije sasvim istražen kod čovjeka. Oštećenje DNA koje uzrokuju ROS i RNS vjerojatno pridonosi razvoju raka povezanom s dobi (Halliwell, 1996). Oksidativni stres doprinosi oštećenju tkiva kod reumatoidnog artritisa, upalnih bolesti crijeva (Halliwell i Gutteridge, 1989) i Parkinsonove bolesti (Jenner, 1994). Sve je više dokaza za to da se veliki uzročnici smrti, kardiovaskularne bolesti i rak, mogu spriječiti ili do neke mjere odgoditi promjenama u prehrani, kao što su smanjenje unosa masnoća i povećana konzumacija voća, žitarica i povrća (Willett, 1994). S obzirom na to da naša endogena antioksidativna obrana nije 100% učinkovita, razumno je primijetiti kako su antioksidansi, koji se unose prehranom, važni u smanjenju ukupnih učinaka oksidativnog oštećenja tijekom dugog životnog vijeka čovjeka te da su odgovorni za neke od korisnih učinaka voća, žitarica i povrća (Halliwell, 1996).

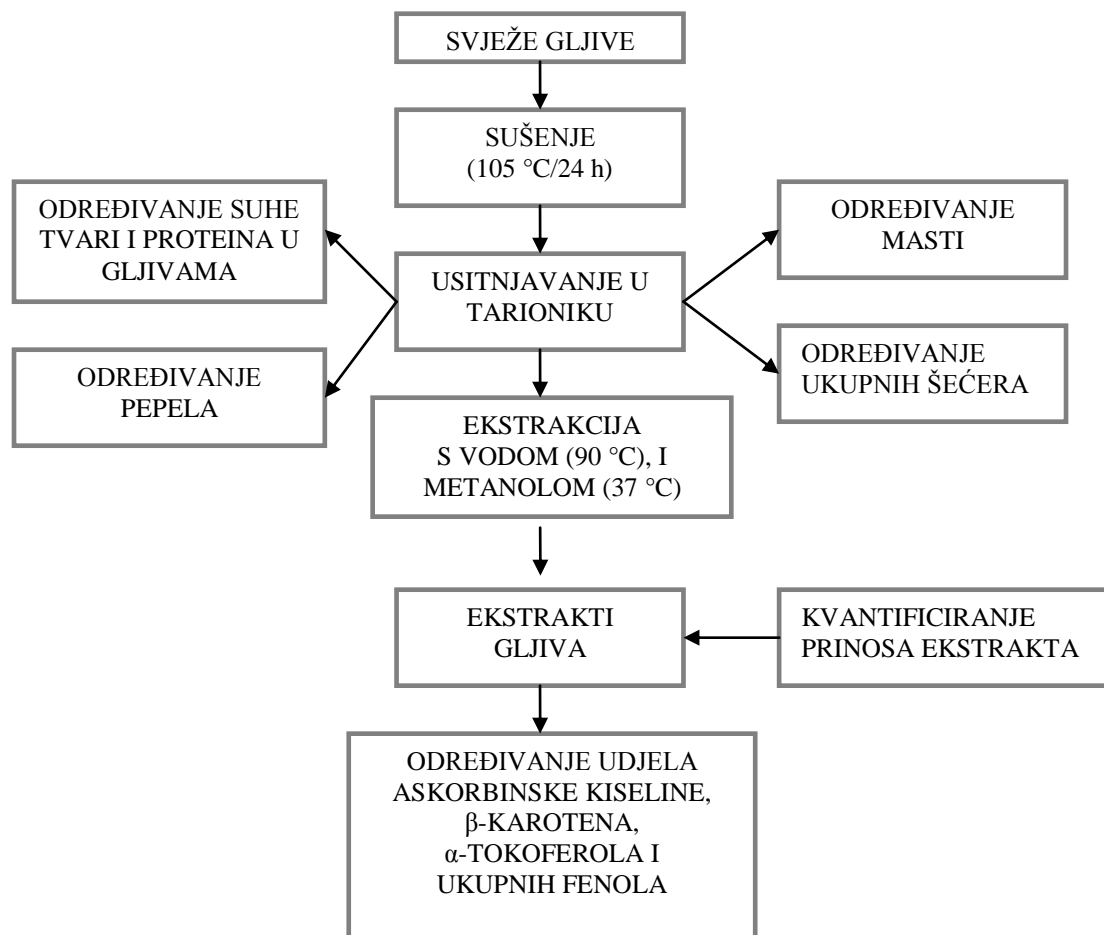
Prema tome, postoje „dva lica“ slobodnih radikala u biologiji, s obzirom na to da služe kao signalne i regulacijske molekule na fiziološkim razinama, no također su vrlo štetni i citotoksični oksidansi na patološkim razinama (Freidovich, 1999; Fang i sur., 2002) (Tablica 1).

**Tablica 1.** Mehanizmi antioksidativne aktivnosti (Hall, 2001).

Razred antioksidanta	Mehanizam antioksidativne aktivnosti	Primjeri antioksidanasa
Pravi antioksidanti	Inaktivacija lipidnih slobodnih radikala	Fenolni spojevi
Stabilizatori vodikovog peroksida	Sprječavanje raspadanja vodikovog peroksida u slobodne radikale	Fenolni spojevi
Sinergisti	Poticanje aktivnosti pravih antioksidanata	Limunska kiselina, askorbinska kiselina
Kelatori metala	Vežanje teških metala u neaktivne spojeve	Fosforna kiselina, Spojevi Maillardove reakcije, limunska kiselina
Uklanjivači singletnog kisika	Pretvaranje singletnog kisika u tripletni kisik	Karoteni
Tvari koje reduciraju vodikov peroksid	Reduciranje vodikovog peroksida na neradikalni način	Proteini, aminokiseline

### **3. EKSPERIMENTALNI DIO**

## Cjelokupni tijek rada



**Slika 5.** Prikaz cjelokupnog tijeka istraživačkog rada

### 3.1. Materijali i metode rada

#### 3.1.1. Uzorci gljiva

Uzorci gljive *A. caesarea* (blagva) u svim fazama zrelosti nabavljeni su na tržnici Dolac u Zagrebu. Svježi uzorci su odmah izvagani, izrezani i stavljeni na sušenje 24 h pri 105 °C (Slika 6).



**Slika 6.** Uzorci *A. caesarea* (blagva) u svim fazama zrelosti korišteni za istraživanje

#### 3.1.2. Standardi i reagensi

Kalijev dihidrogen fosfat, dikalijev hidrogen fosfat, kalijev ferocijanid, željezni klorid, klorovodična kiselina, trikloroocetna kiselina, octena kiselina, pirogalol i Folin-Ciocalteu reagens nabavljeni su od Mercka (Darmstadt, Germany). Galna kiselina, metafosforna kiselina, (+)-katehin, 2,6-diklifenolindofenol, L-askorbinska kiselina,  $\beta$ -karoten, acetonitril,  $\alpha$ -tokoferol, 2,2-difenil-1-pikrilhidranil radikal (DPPH), EDTA su nabavljeni od Sigmee (USA). Metanol, dikormetan, aceton, *n*-heksan, etil acetat, etanol, petroleter su bili proizvodi Kemike (Zagreb, Hrvatska).

### 3.1.3. Reagensi za određivanje ukupnih fenola

1. otapalo: destilirana voda, H<sub>2</sub>O
2. Folin-Ciocalteu reagens
3. zasićena otopina natrijeva karbonata, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>

Priprema: 200 g anhidrida natrijeva karbonata otopljeno je u 800 mL vruće destilirane vode, a potom ohlađeno na sobnu temperaturu. Dodano je nekoliko kristalića natrijeva karbonata te u odmjerne tikvici od 1000 mL nadopunjeno destiliranom vodom i nakon 24 sata filtrirano.

4. galna kiselina (0.03 g galne kiseline je otopljeno u metanolu u odmjerne tikvici od 100 mL).

## 3.2. Aparati

### - pH-metar

Pri radu je korišten ručni pH-metar "Hanna Instruments", model HI98103, SAD.

### - Mehanička mješalica

Za optimiranje postupka autolize korištena je mehanička mješalica s termostatom.

### - Vage

Analitička vaga "Mettler", Švicarska

Digitalna analitička vaga "Shimadzu", Japan

Tehnička vaga "Tehtnica", ET 1211, 0-1200 g, Slovenija

### - Sušionik

Za određivanje suhe tvari biomase i ekstrakata korišten je sušionik "Instrumentaria" ST-05, 50-200 °C, Hrvatska.

### - Vibro mikser

Za homogenizaciju uzoraka korišten je vibrirajući mikser "Tehtnica EV-102", Železniki, Slovenija.

### - Spektrofotometar

Za mjerenje apsorbancije korišten je spektrofotometar Unicam Heios 2, SAD.



### 3.3. Analitičke metode

#### 3.3.1. Kemijski sastav gljiva

Kemijski sastav gljiva određivan je mjerenjem suhe tvari, ukupnih proteina, ukupnih šećera, masti i pepela prema AOAC metodama (1995). Uzorci gljiva su nakon sušenja usitnjeni u tarioniku i kao takvi su uporabljeni u svim određivanjima.

##### 3.3.1.1. Suha tvar gljiva

Suha tvar gljiva određivana je sušenjem gljiva do konstantne mase pri 105 °C/24 h. Nakon hlađenja u eksikatoru uzorci su izvagani te je izračunata suha tvar u svakom uzorku (Alvarez i Enriquez, 1988).

Udjel suhe tvari, izražen u postotcima računat je prema jednadžbi:

$$w \text{ (s. tv. \%)} = [100 - (m_2 - m_3) / (m_2 - m_1)] \times 100 \quad (1)$$

w - maseni udjel suhe tvari u uzorku (%)

m<sub>1</sub>- masa prazne posude (g)

m<sub>2</sub>- masa posude i uzorka prije sušenja (g)

m<sub>3</sub>- masa posude i osušenog uzorka (g)

##### 3.3.1.2. Određivanje ukupnih proteina

Količina ukupnih proteina u uzorcima gljiva određivana je metodom po Kjeldahlu (AOAC, 1995). U Kjeldahlovu tikvicu s regulatorima vrenja (15 g kalij-sulfata i 0,5 g bakar(II)-sulfata penhidrata) dodano je 0.5 g uzorka gljiva i 10 mL koncentrirane HCl. Tikvica je postavljena u kosi položaj u digestoru i zagrijavana tijekom 6 h. Nakon toga je sadržaj tikvice ohlađen na sobnu temperaturu te mu je dodano 50 mL vode. Nakon destilacije uzorci su titrirani s 1M HCl. Za izračunavanje količine ukupnih proteina u uzorcima gljiva određeni udjel dušika je množen faktorom 4.38 (Léon-Guzmán i sur., 1997). Količina sirovih proteina nakon spaljivanja, destilacije i titracije određena je prema jednadžbi:

$$\text{količina proteina (\%)} = \frac{V \cdot 0,00028 \times 1000 \times 4,38 \times d}{b} \quad (2)$$

V – utrošak sumporne kiseline (mL)

d – volumen uzorka uzet za titraciju (mL)

b – masa uzorka uzetog za analizu (g)

4.38 – faktor za preračunavanje udjela dušika u udjel sirovih proteina u gljivama

### **3.3.1.3. Određivanje masti**

Udjel masti u uzorcima gljiva određivan je metodom po Soxhletu (AOAC, 1995). Uzorak gljiva (10 g) prelivljen je s 50 mL koncentrirane HCl da bi se oslobodile lipidne frakcije te profiltriran preko filter papira. Ostatak na filter papiru stavljen je u tikvicu uređaja za ekstrakciju. Nakon ekstrakcije otapalo je otpareno u vodenoj kupelji, a tikvica osušena u sušioniku pri 105 °C, ohlađena u eksikatoru i izvagana. Udjel masti izračunat je prema jednadžbi:

$$\text{udjel masti (\%)} = (m_2 - m_1) \cdot 100 / m_0 \quad (3)$$

$m_0$  – masa uzorka za analizu (g)

$m_1$  – masa tikvice za ekstrakciju (g)

$m_2$  – masa tikvice za ekstrakciju s masti poslije sušenja (g)

### **3.3.1.4. Određivanje pepela**

Udjel pepela u uzorcima je određivan spaljivanjem u muflonskoj peći pri 550 °C tijekom 6 h (AOAC, 1995). U porculanske posudice odvagano je po 1 g uzoraka gljiva te su stavljene na sušenje pri 105 °C. Nakon hlađenja u eksikatoru uzorci su spaljivani u muflonskoj peći tijekom 5 do 6 h s postupnim povećanjem temperature do 550 °C, sve dok pepeo nije postigao sivo-bijelu boju.

Udjel pepela izračunat je prema formuli:

$$\text{udjel pepela (\%)} = (m_2 - m_0) / (m_1 - m_0) \cdot 100 \quad (4)$$

$m_0$  – masa prazne posudice (g)

$m_1$  – masa posudice s uzorkom za analizu (g)

$m_2$  – masa posudice s ostatkom (pepelom) (g)

### **3.3.1.5. Određivanje ukupnih šećera**

Udjel ukupnih šećera izračunat je prema jednadžbi (Barros i sur., 2007a):

$$\text{Ukupni šećeri (g)} = 100 - (\text{voda} + \text{proteini} + \text{masti} + \text{pepeo}) \quad (5)$$

### **3.3.1.6. Određivanje ukupne energijske vrijednosti**

Ukupna energijska vrijednost je izračunata prema jednadžbi (Manzi i sur., 2004):

$$\text{Energijska vrijednost (kJ)} = 17 \cdot (\text{g proteina} + \text{g šećera}) + 37 \cdot (\text{g masti}) \quad (6)$$

## **3.3.2. Ekstrakcija bioaktivnih sastojaka**

Ekstrakcija bioaktivnih sastojaka iz proučavanih gljiva provedena je s dva ekstrakcijska sredstva: vodom pri 90 °C (10 minuta) i metanolom (95 %) pri 37 °C (Tsai i sur. (2007).

### **3.3.2.1. Ekstrakcija vrućom vodom**

1.5 g osušenih gljiva odvagano je s točnošću  $\pm 0.1$  g i homogenizirano s 20 mL zagrijane destilirane vode (50 °C). Homogena smjesa ekstrahirana je 10 minuta pri temperaturi oko 90-95 °C uz povratno hladilo. Dobiveni ekstrakt je filtriran kroz filter papir, a zaostali talog ponovno je ekstrahirano s 20 mL destilirane vode uz povratno hladilo još 10 minuta. Dobiveni ekstrakti su spojeni u odmjerne tikvici od 50 mL i nadopunjeni vodom do oznake.

### **3.3.2.2. Ekstrakcija metanolom**

1.5 g osušenih gljiva odvagano je s točnošću  $\pm 0.1$  g i homogenizirano s 20 mL metanola (95 %; 25 °C). Homogena smjesa ekstrahirana je 180 minuta pri 37 °C na magnetnoj mješalici (250 okr/min). Dobiveni ekstrakt je filtriran kroz filter papir, a zaostali talog ponovno je ekstrahirano s 20 mL metanola još 60 minuta. Dobiveni ekstrakti su spojeni u odmjerne tikvici od 50 mL i nadopunjeni vodom do oznake.

### **3.3.2.3. Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih fenola**

U epruvetu je otpipetirano 1 mL ekstrakta i 1 mL Folin-Ciocalteu reagensa, nakon čega je smjesa homogenizirana na vibromikseru. Nakon 3 minute je reakcijskoj smjesi dodano 1 mL zasićene otopine  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . Uzorak je ostavljen u mraku 90 minuta, nakon čega je mjerena apsorbanacija (optička gustoća otopine) pri valnoj duljini od 725 nm ( $A_{725}$ ) (Barros i sur., 2008a). Na isti način je pripremljena i slijepa proba, ali je umjesto ekstrakta stavljena destilirana voda. Baždarni dijagram je izrađen s galnom kiselinom (0.01-0.4 mM;  $R^2 = 0.9999$ ). Rezultati (mg galne kiseline/g ekstrakta gljiva) su izračunati prema jednadžbi:  $Y = 2.8557 \cdot X - 0.0021$ .

### **3.3.2.4. Spektrofotometrijsko određivanje flavonoida**

260  $\mu\text{L}$  ekstrakta je pomiješano s 1.25 mL destilirane vode i 75  $\mu\text{L}$  5%-tne otopine  $\text{NaNO}_2$ . Nakon 5 minuta u reakcijsku smjesu je dodano 150  $\mu\text{L}$  10%-tne otopine  $\text{AlCl}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$  i promiješano na vibracijskoj mješalici. Nakon 6 minuta je dodano 500  $\mu\text{L}$  1M  $\text{NaOH}$  i 275  $\mu\text{L}$  destilirane vode te je reakcijska smjesa dobro promiješana na vibracijskoj mješalici. Intenzitet ružičaste boje je mjereno pri 510 nm. Baždarni dijagram je izrađen s (+)-katehinom (0.022-0.34 mM;  $R^2 = 0.9999$ ). Rezultati (mg (+)-katehina/g ekstrakta gljiva) su izračunati prema jednadžbi:  $Y = 0.9629 \cdot X - 0.0002$ .

## **3.3.3. Određivanje udjela bioaktivnih sastojaka**

### **3.3.3.1. Askorbinska kiselina**

Udjel askorbinske kiseline određivan je prema metodi Klein i Perryja (1982). Svaki od ekstrakata je pripremljen ekstrakcijom 100 mg suhe tvari gljiva s 10 mL 1%-tne metafosforne kiseline (10 mg/mL) tijekom 45 minuta pri sobnoj temperaturi i nakon čega su profiltrirani kroz filter papir. Filtrati (1 mL) su pomiješani s 9 mL 2,6-diklorindofenola, i nakon 15 sekundi reakcije je uzorcima apsorbanacija na 515 nm. Udjel askorbinske kiseline je izračunat prema baždarnom pravcu izrađenim s L-askorbinskom kiselinom (0.020-0.12 mM;  $R^2 = 0.9999$ ). Rezultati (mg L-askorbinske kiseline /g ekstrakta gljiva) su izračunati prema jednadžbi:  $Y = 3.4127 \cdot X - 0.0072$ .

### **3.3.3.2. $\beta$ -karoten i likopen**

Udjel  $\beta$ -karotena (provitamin A) i likopena su određeni prema metodi Barros i sur. (2008a). Uzorci suhih gljiva (100 mg) su 1 min miješani na vibrirajućoj mješalici s 10 mL smjese otapala aceton:heksan (4:6) i nakon toga profiltrirani kroz filter papir. Filtratima je izmjerena apsorbanacija na 453, 505 i 663 nm. Koncentracije  $\beta$ -karotena i likopena su izračunate prema jednadžbama:

$$\beta\text{-karoten (mg/100 mL)} = 0.216 \cdot A_{663} - 0.304 \cdot A_{505} + 0.452 \cdot A_{453} \quad (7)$$

$$\text{likopen (mg/100 mL)} = -0.0458 \cdot A_{663} + 0.372 \cdot A_{505} - 0.0806 \cdot A_{453} \quad (8)$$

### **3.3.4. Određivanje antioksidacijske aktivnosti**

Antioksidansi su, prema definiciji, sve one tvari koje u maloj količini u kratkom vremenu neutraliziraju djelovanje slobodnih radikala i drugih oksidanata. Slobodni radikal je svaki atom ili molekula koja sadrži jedan ili više nesparenih elektrona što ih čini nestabilnim i veoma reaktivnim, a sposobni su oksidirati biološke molekule.

#### **3.3.4.1. Određivanje antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom**

Antioksidacijska aktivnost uzoraka određena je mjerenjem sposobnosti inhibicije slobodnog 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) radikala. Antioksidacijska sposobnost se mjeri kinetikom otpuštanja vodika s antioksidansa, odnosno sposobnosti vezanja radikala pri čemu se koristi stabilni DPPH\* radikal (Cheung i sur., 2003).

#### **POSTUPAK:**

U kivetu širine 1 cm pipetirano je 2 mL DPPH otopine i izmjerena početna apsorbanacija otopine radikala ( $A_0$ ). U kivetu je potom dodana etanolna otopina (50  $\mu$ L) uzorka, tj. antioksidansa, smjesa je dobro promiješana i praćena je promjena apsorbanacije otopine tijekom 1 sata pri valnoj duljini od 517 nm. Antioksidacijska aktivnost uzorka mjerena je pri različitim razrjeđenjima (1:1; 1:10; 1:50; 1:100) pripremljenim s metilnim alkoholom. Za baždarenje spektrofotometra i određivanje nule u referentnoj kiveti korišten je čisti metanol. Postotak inhibicije DPPH radikala uzoraka računat je prema jednadžbi:

$$\% \text{ inhibicije} = [1 - (A_{\text{uzorka}} - A_{\text{kontrola}})] \times 100 \quad (9)$$

$A_{\text{uzorka}}$  – apsorbancija istraživanog uzorka na 517 nm

$A_{\text{kontrola}}$  – apsorbancija slijepe probe na 517 nm

### **3.3.4.2. Određivanje reducirajuće snage**

Reducirajuća snaga je određivana prema metodi Oyaizu (1986). Svaki od ekstrakata (0.1 – 30 mg/mL) je pomiješan s 2.5 mL 200 mM fosfatnog pufera (pH 6.6) i 2.5 mL kalijevog ferocijanida (10 mg/mL) te inkubiran pri 50 °C tijekom 20 minuta. Nakon toga je u uzorke dodano 2.5 mL trikloroctene kiseline (100 mg/mL) i centrifugirani su pri 200 g/10 minuta. Gornji sloj (5 mL) je pomiješan s 5 mL deionizirane vode i 1 mL željeznog klorida (1 mg/mL) te je izmjerena apsorbancija na 700 nm. Veća vrijednost apsorbancije ukazala je na veću reducirajuću snagu.  $EC_{50}$  vrijednosti (mg ekstrakta/mL) su koncentracije ekstrakta pri kojima je apsorbancija iznosila 1/2 vrijednosti apsorbancije izmjerene za reducirajuću snagu i dobivene su interpolacijom. Kao standardi su uporabljeni askorbinska kiselina i  $\alpha$ -tokoferol.

### **3.3.4.3. Sposobnost keliranja iona željeza**

Sposobnost keliranja iona željeza određivana je prema metodi Senevirathne i sur. (2006) uz male izmjene. Svaki od ekstrakata (0,1 – 30 mg/mL) je razrijeđen s 0.7 mL destilirane vode i pomiješan s 0.175 mL 0.5 mM željeznog klorida. Reakcija je pokrenuta dodatkom 0.175 mL 0.5 mM ferozina i izmjerena je početna vrijednost apsorbancije na 550 nm. Nakon inkubacije na sobnoj temperaturi (10 minuta) ponovno je izmjerena apsorbancija na 550 nm. Niža vrijednost apsorbancije ukazuje na veću sposobnost keliranja. Postotak inhibicije ferozin- $Fe^{2+}$  kompleksa izračunat je prema jednadžbi:

$$\text{sposobnost keliranja (\%)} = [(A_0 - A_1)/A_0] \times 100 \quad (10)$$

$A_0$  – početna vrijednost apsorbancije na 550 nm

$A_1$  – vrijednost apsorbancije na 550 nm nakon 10 minuta inkubacije

## **4. REZULTATI I RASPRAVA**

#### 4.1. Nutritivna vrijednost i kemijski sastav gljive *A. caesarea*

U ovom su radu istraživani nutritivna vrijednost, koja se temelji na kemijskom sastavu, (suha tvar, topljivi proteini i ukupni šećeri, masti i pepeo) te udjel biološki aktivnih, odnosno antioksidacijskih spojeva u pet stadija zrelosti blagve, *A. caesarea* (malo jaje, veliko jaje, vrlo mladoj, mladoj i zreloj).

Jedan od glavnih zahtjeva pri odabiru prehranbene namirnice je njezina nutritivna vrijednost. Kada se radi o gljivama, nutritivni se sastojci izračunavaju u odnosu na suhu tvar jer je poznato da gljive imaju visok udjel vode, posebice kad se radi o kišnim dijelovima godine, koji utječu ne samo na teksturu, nego i na relativno kratko vrijeme održavanja te namirnice (Manzi i sur., 1999; Kalač, 2009). Rezultati ovih istraživanja pokazali su da su se prosječne vrijednosti udjela suhe tvari kretale od 8,87 % do 10,52 % (Tablica 2). Prema nutritivnim su kriterijima u gljivama najvažniji udjeli ugljikohidrata i proteina te njihov sastav. Prema Colaku i sur. (2009) udjel proteina u samoniklim gljivama izravno je povezan s porodicom, odnosno određenom vrstom gljiva i njihovoj fazi zrelosti u vrijeme sakupljanja te koncentraciji dušika u tlu na kojem su rasle. Istraživanja u ovom radu su pokazala da se udjel proteina u *A. caesarea* kretao od 15.56 % (zrela) do 18.11 % (g/100 g s. tv.) (malo jaje).

**Tablica 2.** Prosječni sastav (g/100 g s. tv.) i energijska vrijednost (kJ/100 g s. tv.)

*A. caesarea* prema stadijima zrelosti

Stadij zrelosti gljive	Suha tvar (%)	Proteini (g/100 g)	Šećeri (g/100 g)	Masti (g/100 g)	Pepeo (g/100 g)	Energija (kJ/100 g)
<i>A. caesarea</i> (malo jaje)	10.52	18.11	40.53	10.41	1.49	1382.05
<i>A. caesarea</i> (veliko jaje)	10.15	17.87	40.26	11.09	1.15	1398.54
<i>A. caesarea</i> (vrlo mlada)	9.41	17.38	38.87	9.59	2.49	1311.08
<i>A. caesarea</i> (mlada)	9.01	16.48	41.87	11.59	3.45	1420.78
<i>A. caesarea</i> (zrela)	8.87	15.56	44.74	14.19	6.12	1550.13



Udjel šećera nije se značajnije razlikovao po stadijima zrelosti gljive i kretao se od 38.87 (vrlo mlada) do 44.74 g/100 g s. tv. (zrela). Smanjenje udjela šećera može se objasniti energijskom ulogom u katabolizmu tijekom životnog ciklusa gljive (Barros i sur., 2007b).

Prema kemijskom sastavu istraživane *A. caesarea* izračunata je energijska vrijednost (Tablica 2). Iz rezultata je vidljivo da je najveća vrijednost određena u zreлом stadiju gljive (1550.13 kJ), dok su stadiji malog i velikog jaja imali približno istu vrijednost (1382.05 i 1398.54 kJ), a vrlo mlada gljiva malo nižu energijsku vrijednost (1311.08 kJ). Ove rezultate nije moguće usporediti s dobivenim rezultatima drugih istraživača jer je ovo prvi rad u kojem je istraživan nutritivni i kemijski sastav gljive *A. caesarea* prema stadijima zrelosti gljive.

Gljive svojim delikatnim okusom i teksturom predstavljaju nutricionistički vrijednu hranu i važan izvor biološki aktivnih sastojaka koji imaju medicinsku vrijednost. Za gljive se općenito može reći da su niskoenergetske namirnice vrlo bogate vlaknima (Yim i sur., 2009) te izvanredan izvor antioksidansa budući da nakupljaju različite sekundarne metabolite, uključujući i fenolne sastojke (Cheung i sur., 2003).

## **4.2. Bioaktivni spojevi i antioksidacijska svojstva**

Udjel i sastav bioaktivnih sastojaka, te posebice antioksidacijska aktivnost tih prirodnih sastojaka se u posljednje vrijeme pojačano proučavaju zbog sve većeg interesa farmaceutskih i prehrambenih industrija za prirodnim bioaktivnim sastojcima kojima se poboljšava ljudsko zdravlje (Smith i sur., 2002). Fenolni spojevi su glavni antioksidacijski sastojci kojima gljive obiluju, za razliku od drugih jakih antioksidansa (askorbinska kiselina,  $\beta$ -karoten, likopen i  $\alpha$ -tokoferol) koji su u gljivama zastupljeni u relativno malim količinama (Barros i sur., 2008b; Yang i sur., 2002).

Ekstrakcija bioaktivnih sastojaka provedena je s dva ekstrakcijska sredstva, vrućom vodom (90 °C) i metanolom (37 °C), sa ciljem dobivanja ekstrakata sa spojevima velike (polisaharidi) i male molekulske mase (fenolni spojevi). Obje vrste spojeva imaju važnu ulogu u nutricionističkom i medicinskom statusu gljiva (Ferreira i sur., 2010). Prinos ekstrakata iz uzoraka ispitivanih gljiva prikazan je u Tablici 3.

**Tablica 3.** Prinos ekstrakta iz gljive *A. caesareae* nakon ekstrakcije vrućom vodom i metanolom

Stadij zrelosti gljive	Prinos ekstrakta iz gljiva (g/100 g s. tv.)	
	voda	metanol
	<i>A. caesarea</i> (malo jaje)	12.79
<i>A. caesarea</i> (veliko jaje)	18.88	5.72
<i>A. caesarea</i> (vrlo mlada)	34.11	13.21
<i>A. caesarea</i> (mlada)	40.91	15.41
<i>A. caesarea</i> (zrela)	40.11	15.19

Samonikle gljive su bogat izvori antioksidanasa, kao što su vitamini A, C i E, karotenoidi, polifenolne supstancije i flavonoidi, koji štite od oštećenja slobodnim radikalima te smanjuju rizik od kroničnih bolesti. U ovom radu jedan od ciljeva bio je ispitati antioksidacijska svojstva, odnosno odrediti udjel askorbinske kiseline,  $\beta$ -karotena,  $\alpha$ -tokoferola i ukupnih fenola, a rezultati su prikazani u Tablici 4.

Fenolne supstancije su u istraživanim stadijima zrelosti *A. caesareae* bile antioksidacijski sastojci s najvećim masenim udjelom u vodenim ekstraktima; od 19.66 mg/g s. tv. (zrela) do 50.33 mg/g s.tv. (malo jaje). U metanolnim ekstraktima određene su puno manje koncentracije ukupnih fenola, no i potpuno suprotne vrijednosti nego u vodenim ekstraktima; od 8.34 mg/g (malo jaje) do 39.55 mg/g s.tv. (zrela) U svim je ekstrahiranim uzorcima, bez obzira na ekstrakcijsko sredstvo, askorbinska kiselina određena u visokim koncentracijama; 126.76 mg/g (malo jaje, vodeni ekstrakt) do 176.35 mg/g (zrela, metanolni ekstrakt). Jasno je bilo da  $\alpha$ -tokoferol neće moći biti određen u vodenim ekstraktima zbog svoje topljivosti u mastima, no u metanonim ekstraktima je izmjerena njegova koncentracija u malim koncentracijama; od 0.55 mg/g (malo jaje) do 1.61 mg/g (mlada). Maseni udjel  $\beta$ -karotena u vodenim ekstraktima nije zabilježen, zbog istog razloga kao i  $\alpha$ -tokoferol, a u metanolnim ekstraktima je bio zanemariv (u tragovima); od 0,01 mg/g (veliko jaje) dok je najveća izmjerena vrijednost bila 0.09 mg/g (zrela) (Tablica 4).

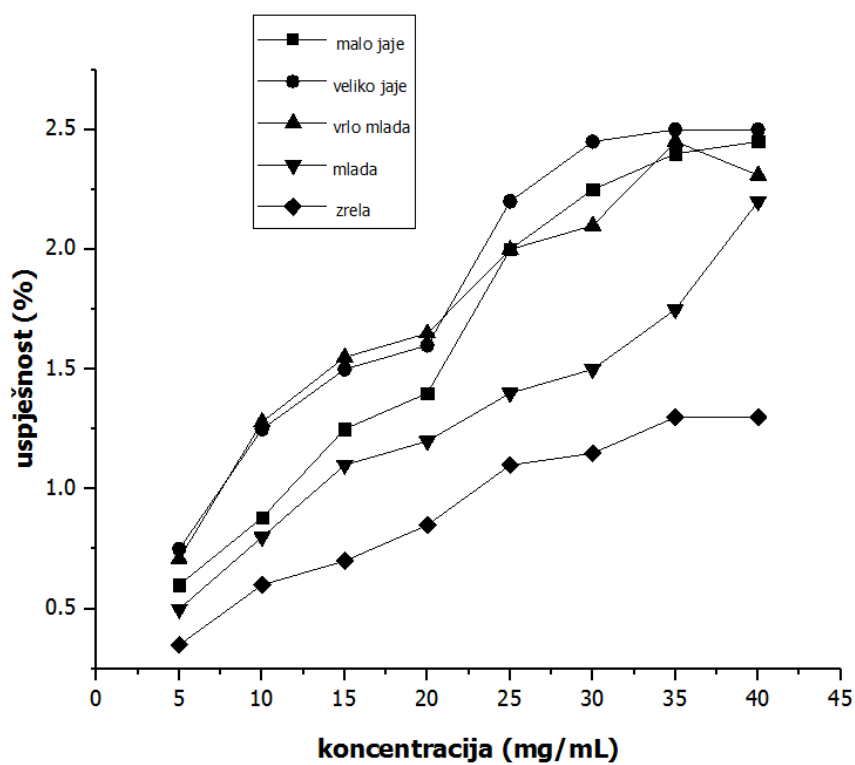
**Tablica 4.** Maseni udjel (mg/g s. tv.) askorbinske kiseline,  $\beta$ -karotena,  $\alpha$ -tokoferola i ukupnih fenola u ekstraktima gljive *A. caesarea* (vruća voda i metanol)

Stadij zrelosti gljive	Maseni udjel (mg/g s.tv.)			
	Voda			
	Askorbinska kiselina	$\beta$ -karoten	$\alpha$ -tokoferol	Ukupni fenoli
<i>A. caesarea</i> (malo jaje)	127	no	no	50.33
<i>A. caesarea</i> (veliko jaje)	121	no	no	28.56
<i>A. caesarea</i> (vrlo mlada)	117	no	no	25.69
<i>A. caesarea</i> (mlada)	111	no	no	21.78
<i>A. caesarea</i> (zrela)	899	no	no	19.66
Metanol				
<i>A. caesarea</i> (malo jaje)	109	no	0.55	8.34
<i>A. caesarea</i> (veliko jaje)	132	0.01	0.87	13.21
<i>A. caesarea</i> (vrlo mlada)	147	0.04	1.12	15.51
<i>A. caesarea</i> (mlada)	155	0.06	1.61	18.89
<i>A. caesarea</i> (zrela)	176	0.09	1.24	39.55

<sup>a</sup>no = nije određeno

Reducirajuća snaga mjerena je sa ciljem određivanja sposobnosti otpuštanja atoma vodika u različitim stadijima zrelosti gljive *A. caesaera*. Veća reducirajuća snaga je indicirana sposobnošću prenošenja vodikovog atoma u određivanom ekstraktu. Na Slici 7 je prikazana reducirajuća snaga svih vodenih ekstrakata, na kojoj je vidljivo da su vodeni ekstrakti gljive *A. caesareae*, a odnosi se na veliko i malo jaje, kao i vrlo mladu gljivu, pokazali vrlo visoku

reducirajuću snagu, veću nego ekstrakti mlade i zrele gljive, a u vodenim i metanolnim ekstraktima određene su vrlo slične vrijednosti reducirajuće snage (Tablica 5).

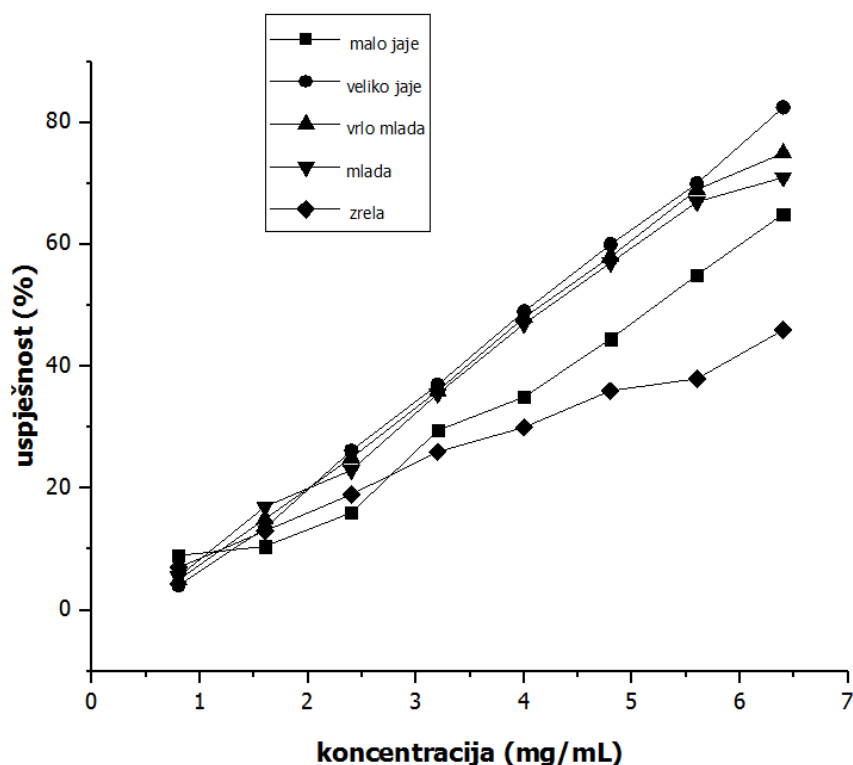


**Slika 7.** Reducirajuća snaga vodenih ekstrakata gljive *A. caesarea*

**Tablica 5.** Usporedni prikaz reducirajuće snage gljive *A. caesarea* prema stadiju zrelosti

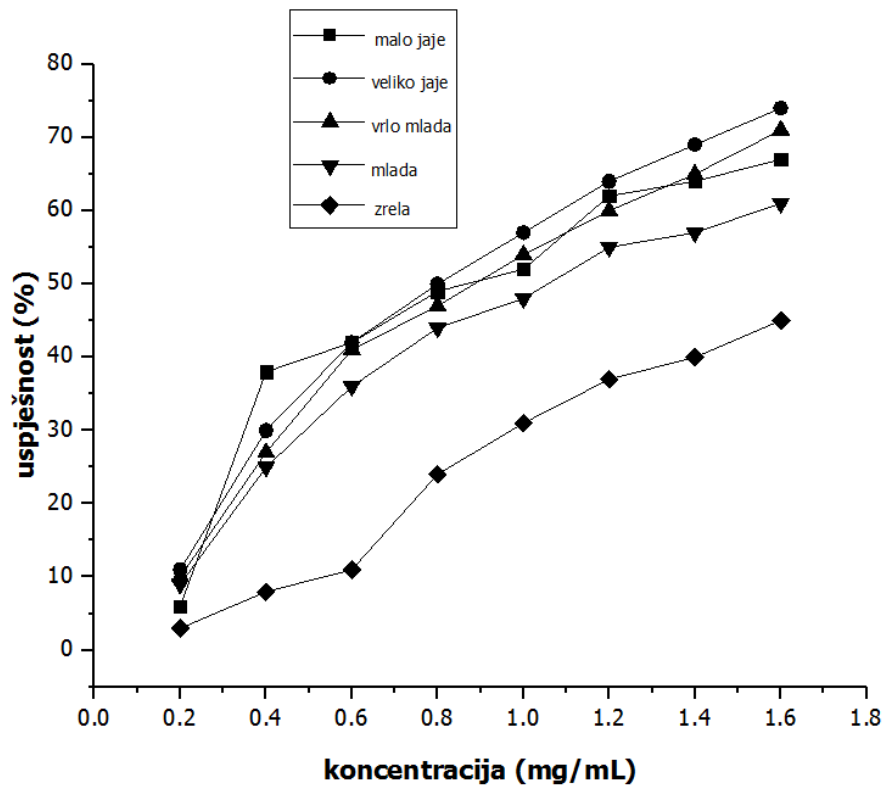
Stadij zrelosti gljive	Ukupna reducirajuća snaga (mg GAE* /g s. tv.)	
	voda	metanol
<i>A. caesarea</i> (malo jaje)	10.31 <sup>a</sup>	10.26 <sup>a</sup>
<i>A. caesarea</i> (veliko jaje)	10.12 <sup>a</sup>	9.88 <sup>b</sup>
<i>A. caesarea</i> (vrlo mlada)	10.01 <sup>a</sup>	9.71 <sup>b</sup>
<i>A. caesarea</i> (mlada)	8.51 <sup>b</sup>	8.21 <sup>b</sup>
<i>A. caesarea</i> (zrelo)	7.95 <sup>b</sup>	7.27 <sup>b</sup>

Prema reducirajućoj snazi stadiji zrelosti gljive su podijeljeni u podgrupe: a - vrlo visoka = 10; b - visoka = 5-10; c - srednja = 2.5-5; d - niska < 2.5 mg GAE\* (ekvivalent galne kiseline)/g s. tv. Uzorka



**Slika 8.** Spособnost vodenih ekstrakata gljive *A. caesarea* za vezanje slobodnih radikala

Prijelazni metali smatraju se katalizatorima za inicijalno nastajanje radikala. Kelirajući agensi mogu stabilizirati prijelazne metale u organizmu i inhibirati nastajanje slobodnih radikala, kao i štetu koju mogu izazvati. Kelirajući učinci ekstrakata gljive *A. caesareae* su prikazani na Slici 9. U svim je ekstraktima uočen linearni rast sposobnosti keliranja koji je prosječno iznosio oko 60 %, dok je u stadiju zrele gljive određena najmanja uspješnost keliranja od samo 40 %.



**Slika 9.** Spособnost vodenih ekstrakata gljive *A. caesarea* za keliranje iona željeza

Prema dobivenim rezultatima sveobuhvatnog istraživanja nutritivnih i antioksidacijskih svojstava pet stadija zrelosti gljive *A. caesarea*, vidljivo je da su analizirani uzorci vrlo bogat izvor fitokemikalija, kao što su fenolne supstancije i askorbinska kiselina te samim time imaju važna antioksidacijska svojstva. Kombinacija njihovih bioaktivnih supstancija i bogatog nutritivnog sastava (visoki udjel proteina i ugljikohidrata te mali udjel masti), čine ih jedinstvenom i neizostavnom visokovrijednom prehrambenom namirnicom.

## **5. ZAKLJUČCI**

### **Iz dobivenih rezultata može se zaključiti sljedeće:**

1. Kemijski sastav gljive *Amanita caesarea* određivan je u pet stadija zrelosti, a izmjerene vrijednosti suhe tvari bile su između 8.19 % i 13.27 %. Udjel proteina bio je prosječno 17.08 %, šećera 41.25 %, masti 11.37 %, a pepela 2.94 %.
2. Biološki aktivne supstancije ekstrahirane su s dva ekstrakcijska sredstva; vodom pri 90 °C i metanolom pri 37 °C. Bolji prinos ekstrakta postignut je ekstrakcijom s vrućom vodom, prosječno 29.36 g/100 g s. tv. gljive, dok je ekstrakcijom s metanolom postignut prinos od 10.92 g/100 g s. tv. gljiva.
3. Svi vodeni ekstrakti gljive su vrlo bogati fenolnim sastojcima, čiji su se maseni udjeli kretali od 19.66 (zrela) do 50.33 mg/g s. tv (malo jaje). dok su udjeli askorbinske kiseline bili zamjetno niži, a  $\beta$ -karoten i  $\alpha$ -tokoferol nisu određeni.
4. Sveobuhvatnim istraživanjima nutritivnih i antioksidacijskih svojstava gljive *A. caesarea* dokazano je da je istraživana gljiva, bez obzira na stadij svoje zrelosti, vrlo bogat izvor fenolnih spojeva te samim time ima značajna antioksidacijska svojstva. Kombinacija prisutnih bioaktivnih supstancija (askorbinske kiseline,  $\beta$ -karotena,  $\alpha$ -tokoferola) i bogatog nutritivnog sastava (visoki udjel proteina i šećera, te nizak udjel masti), čine ju jedinstvenom i visokovrijednom prehrambenom namirnicom.



## **6. LITERATURA**

Alvarez R., Enriquez A. (1988) Nucleic acid reduction in yeast. *Applied Microbiology and Biotechnology* **29**: 208 – 210.

AOAC (1995) Official Methods of Analysis, 16.izd., Association of Official Analytical Chemists. str. 95.

Agrahar-Murugkar D., Subbulakshmi G. (2005) Nutritional value of edible wild mushrooms collected from the Khasi hills of Meghalaya. *Food Chemistry* **89**: 599 – 603.

Aletor V.A. (1995) Compositional studies on edible tropical species of mushrooms. *Food Chemistry* **54**: 265 – 268.

Alexopoulos C.J., Mims C.W., Blackwell M. (1996) Introductory Mycology, 4.izd., John Wiley and Sons. str. 868.

Alofe F.V., Odeyemi O., Oke O.L. (1995) Three edible mushrooms from Nigeria: Their proximate and mineral composition. *Plant Foods for Human Nutrition* **49**: 63 – 73.

Anderson E.E., Fellers C.R. (1942) The food value of mushrooms (*A Campestris*). *Proceedings of the American Society for Horticultural Science* **41**: 301.

Anke T., Kupka J., Schramm G., Steglich W. (1980) Antibiotics from *Basidiomycetes*. X. Scorodonin, a new antibacterial and antifungal metabolite from *Marasmius scorodonius* (Fr.) Fr. *The Journal of Antibiotics* **33**: 463 – 467.

Antolovich M., Prenzler P.D., Patsalides E., McDonald S., Robards K. (2002) Methods for testing antioxidant activity. *Analyst* **127**: 183 – 198.

Arora D. (1986) Mushrooms Demystified: A Comprehensive Guide To The Fleshy Fungi, 2. izd., Ten Speed Press. str. 959.

Aust S.D., Sringen, B.A. (1982) Free radicals in Biology, 5.izd., Academic Press. str. 1 – 28.

Bahl N. (1983) Medicinal Value of Edible Fungi. U: Proceeding of the International Conference on Science and Cultivation Technology of Edible Fungi. Indian Mushroom Science II. str. 203 – 209.

Bano Z., Rajarathanam S. (1982) *Pleurotus* Mushrooms as a Nutritious Food. U: Tropical Mushrooms – Biological Nature and Cultivation Methods, (Chang S.T., Quimio T.H., ur.). The Chinese University Press. str. 363 – 382.

Bano Z., Rajarathanam S. (1988) *Pleurotus* mushroom part II. Chemical composition nutritional value, post-harvest physiology, preservation and role as human food. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **27**: 87 – 158.

Barros L., Baptista P., Correia D. M., Casal S., Oliveira B., Ferreira I. C. F. R. (2007a) Fatty acid and sugar compositions, and nutritional value of five wild edible mushrooms from Northeast Portugal. *Food Chemistry* **105**: 140 – 145.

Barros L., Baptista P., Estevinho L. M., Ferreira I. C. F. R. (2007b) Effect of fruiting body maturity stage on chemical composition and antimicrobial activity of *Lactarius* sp. mushrooms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **55**: 8766 – 8771.

Barros L., Venturini B. A., Baptista P., Estevinho L. E., Ferreira I. C. F. R. (2008a) Chemical composition and biological properties of Portuguese wild mushrooms: a comprehensive study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **56**: 3856 – 3862.

Barros L., Cruz T., Baptista P., Estevinho L. E., Ferreira I. C. F. R. (2008b) Wild and commercial mushrooms as source of nutrients and nutraceuticals. *Food and Chemical Toxicology* **46**: 2742 – 2747.

Block G., Patterson B., Subar A. (1992) Fruits, vegetables and cancer prevention: a review of the epidemiological evidence. *Nutrition and Cancer* **18**: 1 – 29.

Bobek P., Ginter E., Jurcovicova M., Kunia K. (1991) Cholesterol-lowering effect of the Mushroom *Pleurotus ostreatus* in hereditary hypercholesterolemic rats. *Annals of Nutrition and Metabolism* **35**: 191 – 195.

- Bobek P., Galbavy S. (1999) Hypocholesterolemic and antiatherogenic effect of Oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) in rabbit. *Nahrung* **43**: 339 – 342.
- Božac R. (2007) Gljive – morfologija, sistematika, toksikologija, X. izd., Školska knjiga. str. 104 – 105.
- Breene W.M. (1990) Nutritional and medicinal value of speciality mushrooms. *Journal of Food Protection* **53**: 883 – 894.
- Brian P.W. (1951) Antibiotics produced by mushrooms. *The Botanical Review* **17**: 357 – 430.
- Chang S.T. (1980) Mushroom as human food. *BioScience* **30**: 339 – 401.
- Chang S.T. (1982) Prospects for Mushroom Protein in Developing Countries. U: Tropical Mushroom – Biological Nature and Cultivation Methods, (Chang S.T., Quimio T.H., ur.). The Chinese University Press. str. 463 – 473.
- Chang S.T., Miles P.G. (1992) Mushrooms biology – a new discipline. *Mycologist* **6**: 64 – 65.
- Chang S.T., Buswell J.A. (1996) Mushroom Nutraceuticals. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **12**: 473 – 476.
- Cheung L. M., Cheung P. C. K., Ooi V. E. C. (2003) Antioxidant activity and total phenolic of edible mushroom extracts. *Food Chemistry* **81**: 249 – 255.
- Chihara G., Maeda Y., Hamuro J., Sasaki T., Fukuoka F. (1969) Inhibition of mouse sarcoma 180 by polysaccharides from *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. *Nature* **222**: 687 – 688.
- Colak A., Faiz Ö., Sesli E. (2009) Nutritional composition of some wild edible mushrooms. *Turkish Journal of Biochemistry* **34**: 25 – 31.
- Colbert L.B., Decker E.A. (1991) Antioxidant activity of an ultrafiltration permeate from acid whey. *Journal of Food Science* **56**: 1248 – 1250.

- Coletto B.M.A., Mondino P. (1991) Antibiotic activity in *Basidiomycetes*: V. Antibiotic activity of mycelia and cultural filtrates. *Allionia* **30**: 61 – 64.
- Crisan E. V., Sands A. (1978) Nutritional Value. U: The Biology and Cultivation of Edible Mushrooms, (Chang S.T., Quimio T.H., ur.). The Chinese University Press. str. 137 – 165.
- Demirbas A. (2001) Concentrations of 21 metals in 18 species of mushrooms growing in the east Black Sea region. *Food Chemistry* **75**: 453 – 457.
- Diéz V. A., Alvarez A. (2001) Compositional and nutritional studies on two wild edible mushrooms from northwest Spain. *Food Chemistry* **75**: 417 – 422.
- Dikeman C. L., Bauer L. L., Flickinger E. A., Fahey G. C. Jr. (2005) Effects of stage of maturity and cooking on the chemical composition of selected mushroom varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **53**: 1130 – 1138.
- Dreyfuss M.M., Chapela I.H. (1994) Potential of Fungi in the Discovery of Natural Products with Therapeutic Potential, (Gull, V.P., ur.), Butterworth-Heinemann. str. 49 – 80.
- Evans P, Halliwell B. (2001) Micronutrients: oxidant/antioxidant status. *British Journal of Nutrition* **85**: Dodatak 2: S67 – 74.
- Ferreira I.C.F.R., Abreu R.M.V. (2007) Stress oxidativo, antioxidantes e fitoquímicos. *Bioanálise* **2**: 32 – 39.
- Ferreira I.C.F.R., Vaz J.A., Vasconcelos M. H., Martins A. (2010) Compounds from wild mushrooms with antitumor potential. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry* **10**: 424 – 436.
- Fang Y.Z., Yang S., Wu G. (2002) Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition* **18**: 872 – 879.
- Florczak J., Lasota W. (1995) Cadmium uptake and binding by artificially cultivated *Pleurotus ostreatus*. *Bromatologia i Chemia Toksykologiczna* **28**: 17 – 23.

Florczak J, Karminska A, Widzisz A. (2004) Comparison of the chemical contents of the selected wild growing mushrooms. *Bromatologia i Chemia Toksykologiczna* **37**: 365 – 371.

Fridovich I. (1999) Fundamental aspects of reactive oxygen species, or what's the matter with oxygen? *Annals of the New York Academy of Sciences* **893**: 13 – 18.

Gareth J.E.B. (1990) Edible Mushrooms in Singapore and other South East Asian countries. *The Mycologist* **4**: 119 – 124.

Griffin D.H. (1994) *Fungal Physiology*, 2.izd., Wiley-Liss. str 485.

Gunde-Cimerman N. (1999) Medicinal value of the genus *Pleurotus* (fr). P Karst (*Agaricales* s.l. *Basidiomycetes*). *International Journal of Medicinal Mushrooms* **1**: 69 – 80.

Gutteridge J.M.C. (1993) Free radicals and disease processes: a compilation of cause and consequence. *Free Radical Research Communications* **191**: 41 – 58.

Hall C. (2001) Sources of Natural Antioxidants: Oilseeds, Nuts, Cereals, Legumes, Animal Products and Microbial Sources. U: Antioxidants in Food: Practical Applications, 2. izd., (Pokorný J., Yanishlieva N., Gordon M., ur.), Woodhead Publishing Limited. str. 159 – 209.

Halliwell B., Gutteridge J.C. (1992) Biologically relevant metal ion dependent hydroxyl radical generation—an update. *FEBS Letters* **307**: 108 – 12.

Halliwell B. (1996) Antioxidants in human health and disease. *Annual Review of Nutrition* **16**: 33 – 50.

Halliwell B., Gutteridge J.M.C. (1989) *Free Radicals in Biology and Medicine*, 2. izd., Oxford Clarendon. str. 55 – 61.

Halliwell B., Gutteridge J.M.C. (1999) *Free Radicals in Biology and Medicine*, 3. izd., Oxford University Press. str. 79 – 90.

Hayes W.A., Haddad N. (1976) The food value of the cultivated mushrooms and its importance in industry. *Mushroom Journal* **40**: 104 – 110.

Ikekawa T., Uehara N., Maeda Y., Nakanishi M., Fukuoka F. (1969) Antitumor activity of aqueous extracts of edible mushrooms. *Cancer Research* **29**: 734 – 175.

Issiloglu M., Yilmaz F., Merdivan M. (2001) Concentrations of trace elements in wild edible mushrooms. *Food Chemistry* **73**: 163 – 175.

Jenner P. (1994) Oxidative damage in neurodegenerative disease. *Lancet* **344**: 796 – 798.

Jiskani M.M. (2001) Energy potential of mushrooms. *American Journal of Food and Nutrition* **6**: 65 – 68.

Kabir Y., Kimura S., Tamura T. (1988) Dietary effect of *Ganoderma lucidum* mushroom on blood pressure and lipid levels in spontaneously hypertensive rats (SHR). *Journal of Nutritional Science and Vitaminology* **34**: 433 – 438.

Kalač P., Svoboda L. (2000) A review of trace element concentrations in edible mushrooms. *Food Chemistry* **69**: 273 – 281.

Kalač P. (2009) Chemical composition and nutritive value of European species of wild-growing mushrooms. A review. *Food Chemistry* **113**: 9 – 16.

Kallman S. (1991) Nutritive value of Swedish wild plants. *Svensk Botanisk Tidskrift* **85**: 397 – 406.

Kanwar N., Sharma B.M., Sing B.M. (1990) Nutritive value of *Amanita caesarea* (Scop. ex. Fr.) Quel. *Indian Journal of Mycology and Plant Pathology* **20**: 249 – 250.

Karaman Y., Şahin F., Güllüce M., Öğütçü H., Şengül M., Adigüzel A. (2003) Antimicrobial activity of aqueous and methanol extracts of *Juniperus oxycedrus*. *Journal of Ethnopharmacology* **85**: 213 – 235.

Kim B.K., Kim H.W., Choi E.C. (1993) Anti-HIV activity of *Ganoderma lucidum*. *The Journal of Biological Chemistry* **264**: 472 – 478.

King T.A. (1993) Mushrooms, the ultimate health food but little research in U.S. to prove it. *Mushroom News* **41**: 29 – 46.

Kino K.Y., Yamaoka K., Watanabe J., Kotk S.K., Tsunoo H. (1989) Isolation and characterization of a new immunomodulatory protein Zhi-8 (LZ-8) from *Ganoderma lucidum*. *The Journal of Biological Chemistry* **264**: 472 – 478.

Klein B. P., Perry A. K. (1982) Ascorbic acid and vitamin A activity in selected vegetables from different geographical areas of United States. *Journal of Food Science* **47**: 941 – 945.

Léon-Guzmán M. F., Silva I., López M. G. (1997) Proximate chemical composition, free amino acid contents, and free fatty acids contents of some wild edible mushrooms from Queretaro, México. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **89**: 533 – 539.

Li G.S.F., Chang S.T. (1982) Nutritive Value of *Volvariella volvacea*, U: Tropical Mushrooms – Biological Nature and Cultivation Methods, (Chang S. T., Quimio T.H., ur.), The Chinese University **Press**. str. 199 – 219.

Liu F.O., Chang S.T. (1995) Antitumor components of culture filtrates from *Tricholoma sp.* *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **11**: 486 – 490.

Longvah T., Deosthale Y.G. (1998) Compositional and nutritional studies on edible wild mushroom from northeast India. *Food Chemistry* **63**: 331 – 334.

Lorenzen K., Anke T. (1998) *Basidiomycetes* as a source for new bioactive natural products. *Current Organic Chemistry* **2**: 329 – 364.

Maggioni A., Passera C., Renosto F., Benetti E. (1968) Composition of cultivated mushrooms (*Agaricus bisporus*) during the growing cycle as affected by the nitrogen source in compositing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **16**: 517 – 519.

Malinowska, E., Szefer P., Falandysz J. (2004) Metals bioaccumulation by bay bolete, *Xerocomus badius*, from selected sites in Poland. *Food Chemistry* **84**: 405 – 416.



Manzi P., Gambelli L., Marconi S., Vivanti V., Pizzoferrato L. (1999) Nutrients in edible mushrooms: an interspecies comparative study. *Food Chemistry* **65**: 477 – 482.

Manzi P., Aguzzi A., Pizzoferrato L. (2001) Nutritional value of mushrooms widely consumed in Italy. *Food Chemistry* **73**: 321 – 325.

Manzi P., Marconi S., Aguzzi A., Pizzoferrato L. (2004) Commercial mushrooms: Nutritional quality and effect of cooking. *Food Chemistry* **84**: 201 – 206.

Margulis L., Schwartz K.V. (1988) Five Kingdoms: An Illustrated Guide to the Phyla of Life on Earth, 2. izd., W. H. Freeman and Company.

Mattila P.H., Piironen V.I., Uusi- Rauva E.J., Koivistoinen, P.E. (1994) Vitamin D contents in edible mushrooms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **42**: 2449 – 2453.

Mattila P.K., Konko M., Eurola J., Pihlava J., Astola L., Vahteristo V., Hietaniemi J., Kumpulainen N., Valtonen V., Piironen V. (2000) Contents of vitamins, mineral elements and some phenolic compounds in the cultivated mushrooms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **49**: 2343 – 2348.

Mejstrik V., Lepsova A. (1993) Applicability of Fungi to the Monitoring of Environmental Pollution by Heavy Metals. U: Plants as Biomonitors, (Markert B., ur.), VCH Verlagsgesellschaft. str. 365 – 378.

Nanba H. (1993) Maitake mushroom the king mushroom. *Mushroom News* **41**: 22 – 25.

Ogundana S.K., Fagade O. (1981) The Nutritive Value of Some Nigerian Edible Mushrooms. U: Mushroom Science XI, Proceedings of the Eleventh International Scientific Congress on the Cultivation of Edible Fungi, Australia. str. 123 – 131.

Oyaizu M. (1986) Studies on products of browning reactions. Antioxidative activities of products of browning reactions prepared from glucosamine. *The Japanese Journal of Nutrition and Dietetics* **44**: 307 – 315.

Pedneault K.P., Gosselia A., Tweddell R.J. (2006) Fatty acid composition of lipids from mushrooms belonging to the family *Boletaceae*. *Mycological Research* **110**: 1179 – 1183.

Pryor W.A., Lightsey J.W., Prier D.G. (1982) The Production of Free Radicals *In Vivo* from the Action of Xenobiotics: the Initiation of Autooxidation of Polyunsaturated Fatty Acids by Nitrogen Dioxide and Ozone. U: Lipid Peroxides in Biology and Medicine, 1. izd., (Yagi K., ur.), Academic Press. str. 1 – 22.

Rai R.D., Saxena S. (1989) Biochemical changes during the post-harvest storage of button mushroom (*Agaricus bisporus*). *Current Science* **58**: 508 – 510.

Ramesh C., Pattar M. G. (2010) Antimicrobial properties, antioxidant activity and bioactive compounds from six wild edible mushrooms of Western Ghats of Karnataka, India. *Pharmacognosy Research* **2**: 107 – 112.

Ren L., Visitev A.V., Grekhov A.N., Tertov V.V., Tutelyan V.A. (1989) Antiatherosclerotic properties of Macrofungi. *Voprosy Pitaniya* **1**: 16 – 19.

Robbins W.J., Kavanagh F., Hervey A. (1947) Antibiotic substances from *Basidiomycetes* 1. *Pleurotus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **33**: 171 – 176.

Rösecke J., König W.A. (2000) Constituents of various wood-rotting *Basidiomycetes*. *Phytochemistry* **54**: 603 – 610.

Rudawska M., Leski T. (2005) Macro- and microelement contents in fruiting bodies of wild mushrooms from the Notecka forest in west-central Poland. *Food Chemistry* **92**: 499 – 506.

Sagakami H., Aohi T., Simpson A., Tanuma S. (1991) Induction of immunopotential activity by a protein-bound polysaccharide, PSK. *Anticancer Research* **11**: 993 – 1000.

Samorini G. (2001) New data on the ethnomycology of psychoactive mushrooms. *International Journal of Medicinal Mushrooms* **3**: 257 – 278.

Sapers G.M., Miller R.L., Choi S.W., Cooke P.H. (1999) Structure and composition of mushrooms as affected by hydrogen peroxide wash. *Journal of Food Science* **64**: 889 – 892.

Schmitt H.W., Sticher H. (1991) Heavy Metal Compounds in Soil. U: Metals and Their Compounds in the Environment, 3. izd., (Merian E., ur.), VCH Verlagsgesellschaft. str. 311 – 326.

Senevirathne M., Kim S.H., Siriwardhana N., Ha J.H., Lee K.W., Jeon Y.J. (2006) Antioxidant potential of *Ecklonia cava* on reactive oxygen species scavenging, metal chelating, reducing power and lipid peroxidation inhibition. *Food Science and Technology International* **6**: 12 – 27.

Shah H., Iqtidar A., Khalil I.A., Jabeen S. (1997) Nutritional composition and protein quality of *Pleurotus* mushroom. *Sarhad Journal of Agriculture* **13**: 621 – 626.

Shahidi F., Janitha P.K., Wanasundara P.D. (1992) Phenolic antioxidants. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **32**: 67 – 103.

Singh N.B., Singh P. (2002) Biochemical Composition of *Agaricus bisporus*. *The Journal of the Indian Botanical Society* **81**: 235 – 237.

Smith J. E., Rowan N. J., Sullivan R. (2002) Medicinal mushrooms: A rapidly developing area of biotechnology for cancer therapy and other bioactivities. *Biotechnology Letters* **24**: 1839 – 1845.

Stamets P. (2000) Growing Gourmet and Medicinal Mushrooms, 3. izd., Ten Speed Press. str. 58 – 72.

Takeuchi T. (1969) Coriolin, a new *Basidiomycetes* antibiotic. *The Journal of Antibiotics* **22**: 215 – 217.

Tam S. C., Yip K. P., Fung K. P., Chang S. T. (1986) Hypotensive and renal effects of an extract of the edible mushroom *Pleurotus sajor-caju*. *Life Science* **38**: 155 – 161.

Tkalčec Z., Mešić A., Matočec N., Kušan I. (2008) Crvena knjiga gljiva Hrvatske, 2. izd., Državni zavod za zaštitu prirode i Ministarstvo kulture. str. 89.

Tsai S.-Y., Tsai H.-L., Mau J.-L. (2007) Antioxidant properties of *Agaricus blazei*, *Agrocybe cylindracea* and *Boletus edulis*. *LWT – Food Science and Technology* **40**: 1392 – 1402.

Tseng Y.H., Mau J.L. (1999) Contents of sugars free amino acids and free 5- nucleotides in mushroom, *Agaricus bisporus*, during the post-harvest storage. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **79**: 1519 – 1523.

Turkoglu A., Duru M.E., Mercan N., Kivrak I., Gezer K. (2007) Antioxidant and antimicrobial activities of *Laetiporus sulphureus* (Bull.) Murrill. *Food Chemistry* **101**: 267 – 273.

Valko M., Rhodes C. J., Moncol J., Izakovic M., Mazur M. (2006) Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions* **160**: 1 – 40.

Verma R.N., Singh G.B., Bilgrami K.S. (1987) Fleshy fungal flora of N. E. H. India- I. Manipur and Meghalaya. *Indian Mushroom Science* **2**: 414 – 421.

Wannet W.J.B., Hermans J.H.M., Drift C., Camp H.J.M.O. (2000) HPLC detection of soluble carbohydrates involved in mannitol and trehalose metabolism in the edible mushroom *Agaricus bisporus*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **48**: 287 – 291.

Wasser S. P., Weis A. L. (1999) Medicinal properties of substances occurring in higher *Basidiomycetes* mushrooms: current perspective (review). *International Journal of Medicinal Mushrooms* **1**: 31 – 62.

Wasser S.P. (2002) Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulatory polysaccharides. *Applied Microbiology and Biotechnology* **60**: 258 – 274.

Whittaker R.H. (1969) New concepts of kingdoms or organisms. Evolutionary relations are better represented by new classifications than by the traditional two kingdoms. *Science* **163**: 150 – 160.

Willett W.C. (1994) Diet and health: what should we eat? *Science* **254**: 532 – 537.

Wondratschek I., Roder U. (1993) Monitoring of heavy metals in soils by higher fungi. U: Plants as biomonitors,(Market B. ur.) str. 365 – 378.

Yang J.-H., Lin H.-C., Mau J.-L. (2002) Antioxidant properties of several commercial mushrooms. *Food Chemistry* **77**: 229 – 235.

Yilmaz N.M., Solmaz I., Elmastaş M. (2006) Fatty acid composition in some wild edible mushrooms growing in the Middle Black region of Turkey. *Food Chemistry* **99**: 168 – 174.

Yim H. S., Chye F. Y., Ho S. K., Ho C. W. (2009) Phenolic profiles of selected edible mushrooms as affected by extraction solvent, time and temperature. *Asian Journal of Food and Agro-Industry* **2**: 392 – 401.

Yoshioka Y., Ikekawa T., Nida M., Fukuoka F. (1975) Studies on antitumor activity of some fractions from *Basidiomycetes* I. An antitumor acidic polysaccharide fraction of *Pleurotus ostreatus* (Fr.) Quel. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **20**: 1175 – 1180.

Zrodowski Z. (1995) The influence of washing and peeling of mushrooms *Agaricus bisporus* on the level of heavy metal contaminations. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences* **4**: 23 – 33.

Izjava o izvornosti

*Izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.*

Nika Mihalić

---

ime i prezime studenta