

Bioaktivni potencijal samoniklih jestivih gljiva Hrvatske

Bahun, Vedran

Master's thesis / Diplomski rad

2017

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:872087>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-13**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Vedran Bahun
Bioaktivni potencijal samoniklih jestivih gljiva Hrvatske
Diplomski rad

Zagreb, 2017.

ZAHVALA

Od srca zahvaljujem svom mentoru dr. sc. Arminu Mešiću za pronalazak i uzorkovanje plodišta gljiva, njihovu pripremu za analizu, ustupljanje fotografija ispitivanih gljiva te svesrdnu pomoć tijekom izrade ovog diplomskog rada. Nadalje, zahvaljujem dr. sc. Dunji Šamec na stručnom vodstvu u laboratorijskim analizama kao i velikoj pomoći u pisanju samoga rada kroz smjernice i reviziju rada. Također, upućujem i zahvale izv.prof. dr. sc. Sandri Radić Brkanac na podršci i korisnim savjetima pri izradi ovoga rada. Zahvaljujem se i dr. sc. Zdenku Tkalčecu koji je, uz dr. sc. Armina Mešića, sudjelovao u uzorkovanju plodišta gljiva i pripremi uzoraka za liofilizaciju te ustupio fotografije plodišta gljiva, koje su zajedno napravili, za potrebe ovoga rada. Naposljetku, iskrene zahvale upućujem i mojoj obitelji na strpljenju, ljubavi i dugogodišnjoj potpori kroz moje obrazovanje.

Ovaj rad je izrađen u Laboratoriju za kemijsku biologiju na Zavodu za molekularnu biologiju Instituta Ruđer Bošković, pod vodstvom dr.sc. Armina Mešića. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistar struke znanosti o okolišu.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Diplomski rad

BIOAKTIVNI POTENCIJAL SAMONIKLIH JESTIVIH GLJIVA HRVATSKE

Vedran Bahun

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Kako bi se ustanovilo postoji li u plodištima 17 samoniklih jestivih vrsta gljiva iz odjeljka *Basidiomycota* sakupljenih u Hrvatskoj bioaktivni potencijal, u njihovim ekstraktima je analiziran sadržaj ukupnih topivih proteina, ukupnih polifenola, fenolnih kiselina, triterpenoida i alkaloida te antioksidacijski kapacitet (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) test i test redukcije željeza/antioksidacijske snage (FRAP)). Sadržaj ukupnih topivih proteina u plodištima gljiva kretao se u rasponu 2,959–17,267 mg ekvivalenta goveđeg serumskog albumina (BSA)/g suhe težine (s.t.). Također, zabilježene su količine ukupnih polifenola u rasponu 1,492–26,374 mg ekvivalenta galne kiseline (GAE)/g s.t., fenolnih kiselina 0,733–6,336 mg ekvivalenta kavene kiseline (CAE)/g s.t., triterpenoida 16,371–61,184 mg ekvivalenta ursolinske kiseline (UAE)/g s.t. te alkaloida 33,376–116,710 mg ekvivalenta boldina (BE)/g s.t. Antioksidacijska aktivnost bila je najveća u plodištu vrste *Agaricus sylvicola*, na temelju rezultata dobivenih DPPH (199,698 μmol ekvivalenta Troloxa (TE)/g s.t.) i FRAP (365,773 μmol Fe^{2+} /g s.t.). Visok sadržaj ukupnih polifenola i najviša antioksidacijska aktivnost izmjerena u plodištu vrste *Agaricus sylvicola* ukazuju na to da polifenoli izrazito doprinose antioksidacijskoj aktivnosti plodišta gljiva. Analizom rezultata ustanovljeno je da ispitivane vrste gljiva u plodištima sadrže različite skupine specijaliziranih metabolita što ukazuje na njihov značajan bioaktivni potencijal.

(49 stranica, 16 slika, 2 tablice, 115 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: *Fungi*, *Basidiomycota*, plodišta, specijalizirani metaboliti, proteini, antioksidacijska aktivnost

Voditelji: dr. sc. Armin Mešić, zn. sur.; dr. sc. Sandra Radić Brkanac, izv. prof.

Ocjenitelji:

Rad prihvaćen:

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb

Faculty of Science

Department of Biology

Graduation Thesis

BIOACTIVE POTENTIAL OF WILD EDIBLE MUSHROOMS OF CROATIA

Vedran Bahun

Rooseveltovo trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

In order to determine if there is a bioactive potential in the fruitbodies of 17 wild edible mushroom species from phylum *Basidiomycota* collected in Croatia, the contents of total soluble proteins, total polyphenols, phenolic acids, triterpenoids and alkaloids, and antioxidant capacity (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) and ferric reducing/antioxidant power (FRAP) assays) were analyzed. Content of total soluble proteins in all fruitbodies ranged between 2,959 and 17,267 mg bovine serum albumin equivalent (BSA)/g of dry weight (dw). Furthermore, total polyphenols were measured in range 1,492–26,374 mg gallic acid equivalent (GAE)/g dw, phenolic acids 0,733–6,336 mg caffeic acid equivalent (CAE)/g dw, triterpenoids 16,371–61,184 mg ursolic acid equivalent (UAE)/g dw and alkaloids 33,376–116,710 mg boldine equivalent (BE)/g dw. Antioxidant activity was the highest in the fruitbody of *Agaricus sylvicola*, based on the results by DPPH (199,698 μmol Trolox equivalent (TE)/g dw) and FRAP (365,773 μmol Fe^{2+} /g dw) method. High content of total polyphenols and the highest antioxidant activity measured in the fruitbody of *Agaricus sylvicola* indicate that polyphenols significantly contribute to the antioxidant activity of fungal fruitbodies. Based on the analysis of results, it was found that the studied species contain different groups of specialized metabolites which indicate their significant bioactive potential.

(49 pages, 16 figures, 2 tables, 115 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in Central Biological Library

Key words: *Fungi*, *Basidiomycota*, fruitbodies, specialized metabolites, proteins, antioxidative activity

Supervisors: dr. sc. Armin Mešić, Res. Assoc.; dr. sc. Sandra Radić Brkanac, Assoc. Prof.

Reviewers:

Thesis accepted:

Sadržaj

Sažetak

Abstract

1. Uvod.....	1
1.1. Predmet istraživanja.....	1
1.2. Cilj istraživanja.....	15
2. Materijali i metode	15
2.1. Sakupljanje, taksonomska identifikacija i priprema uzoraka plodišta gljiva za analizu	15
2.2. Priprema uzoraka i kemikalije korištene za analizu bioaktivnog potencijala plodišta gljiva	18
2.3. Metode analize bioaktivnog potencijala plodišta gljiva	20
2.4. Statistička obrada podataka	25
3. Rezultati	25
3.1. Proteini.....	25
3.2. Specijalizirani metaboliti	26
3.3. Antioksidacijska aktivnost.....	30
4. Rasprava	33
4.1. Proteini.....	33
4.2. Specijalizirani metaboliti	33
4.2.1. Polifenolni spojevi.....	33
4.2.2. Triterpenoidi	35
4.2.3. Alkaloidi	36
4.3. Antioksidacijska aktivnost.....	37
4.4. Korelacije.....	39
5. Zaključak	40
6. Literatura	41

Popis kratica

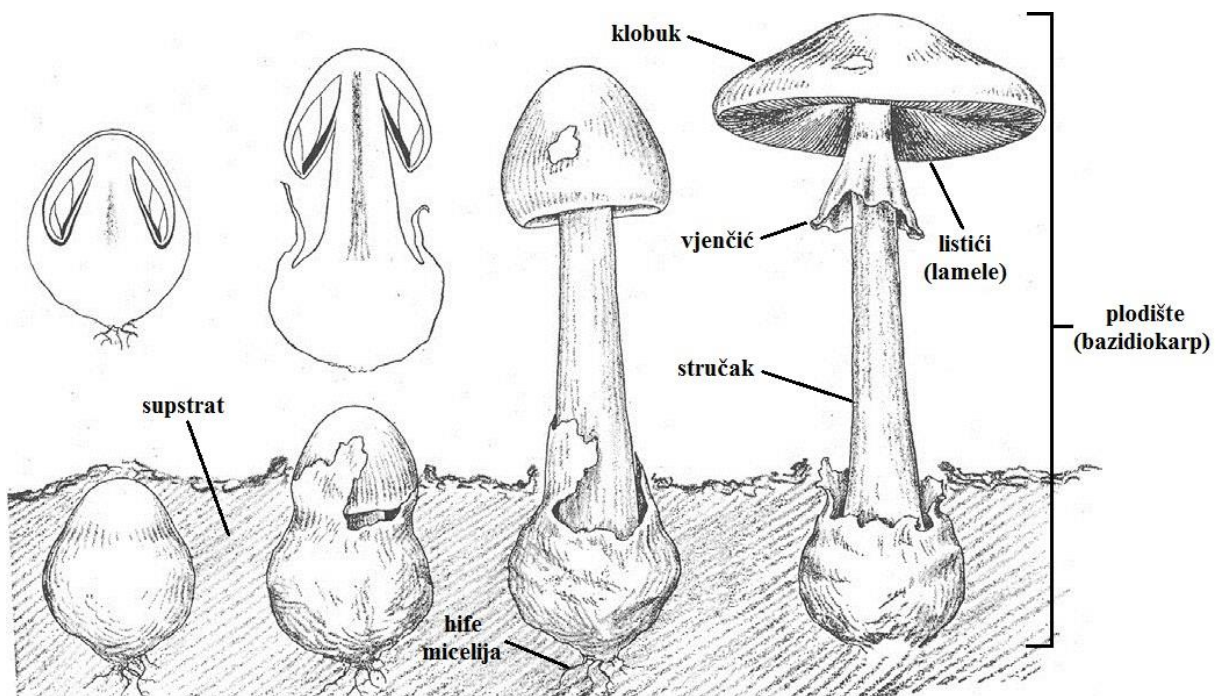
BE	ekvivalent boldina
BSA	ekvivalent goveđeg serumskog albumina
CAE	ekvivalent kavene kiseline
DMSO	dimetil sulfoksid
DPPH	2,2-difenil-1-pikrilhidrazil
DR	Dragendorff reagens
FRAP	test redukcije željeza/antioksidacijske snage
GAE	ekvivalent galne kiseline
OSC	oksidoskvalen ciklaza
\overline{p}_a	prosječna mjesečna količina oborina za mjesec listopad
ROS	reaktivni oblici kisika
SOD	superoksidna dismutaza
s.t.	suha težina
\overline{t}_a	prosječna mjesečna temperatura zraka za mjesec listopad
TE	ekvivalent Troloxa
TPTZ	2,4,6-Tris(2-piridil)-s-triazin
UAE	ekvivalent ursolinske kiseline

Bioaktivni potencijal samoniklih jestivih gljiva Hrvatske

1. Uvod

1.1. Predmet istraživanja

Gljive su vrlo velika skupina organizama te ih je do danas opisano i znanstveno prihvaćeno oko 135 000 vrsta (Hibbett i sur. 2016). No, broj gljivljih vrsta zapravo je znatno veći. Najnovija istraživanja (Hawksworth i Lücking 2017) procjenjuju da se ukupan broj vrsta kreće između 2,2 i 3,8 milijuna. Gljive su najslabije istražena skupina organizama u Hrvatskoj s 4 500 zabilježenih vrsta što čini nešto više od 20% od ukupno 20 000 vrsta za koliko se pretpostavlja da ih živi u Hrvatskoj (Tkalčec i sur. 2008). Dugi niz godina ovi organizmi svrstavani su među jednostavne biljke. No, napretkom znanosti, a posebno istraživanjima na molekularnoj razini u posljednjih pedesetak godina, gljive su svrstane u zasebno carstvo živoga svijeta (*Fungi*). Gljive su eukariotski organizmi (posjeduju stanice s oblikovanom jezgrom ovojnicom), hrane se heterotrofno putem apsorcije organskih spojeva, stanična stijenka građena im je od β -glukana i hitina, a rjeđe od celuloze ili hitozana (Weber i Webster 2007, Tkalčec i sur. 2008). Nadalje, većina gljivljih vrsta živi u obliku micelija koji čini tijelo gljive, a sastoji se od višestaničnog, nitastog i razgranatog spleta izduljenih stanica ili hifa. Velik broj gljivljih vrsta razmnožava se u povoljnim vremenskim uvjetima uz pomoć plodišta (Sl. 1.) koja su uglavnom kratkotrajna (Tkalčec i sur. 2008).



Slika 1. Morfologija plodišta vrste *Amanita phalloides* (Fr.) Link (odjeljak *Basidiomycota*) u različitim razvojnim fazama. Modificirano prema Watkinson i sur. (2016).

Gljive su evolucijski razvile različite prehrambene strategije, pritom preuzevši različite ekološke funkcije u odvijanju života unutar ekosustava. Prema prehrambenoj strategiji mogu se

smjestiti u jednu od triju glavnih grupa – saprotrofe, nekrotrofe ili biotrofe (Ward i Watling 2003).

Saprotrofi imaju vrlo značajnu ulogu u prirodi. Hrane se mrtvom organskom tvari (drvo, listinac, tlo, izmet, odumrli ostaci životinjskog ili gljivljeg podrijetla) koju razgrađuju do anorganskih komponenata kojima se biljke ponovo koriste (Ward i Watling 2003). Saprotrofne gljive posebno su značajne jer jedino one mogu razgraditi lignin, organski polimer koji daje čvrstoću drvu (Tkalčec i sur. 2008).

S druge strane, nekrotrofi se nastanjuju u organizmu domaćina, biljnom, životinjskom ili gljivljem, te uzrokuju smrt određenih stanica i tkiva (Ward i Watling 2003). Najčešće napadaju stare, oslabljene ili oštećene organizme (Tkalčec i sur. 2008). U ovu grupu spadaju hrđe i snijeti, parazitske gljive mikroskopske veličine, kao i neke vrste s makroskopskim plodištima (Ward i Watling 2003). Paraziti često imaju značajnu ulogu u regulaciji dinamike populacija svojih domaćina. Iako za gljive neobično, neke su se vrste specijalizirale za predatorstvo oblića i praživotinja (Tkalčec i sur. 2008).

Biotrofi su sve gljivlje vrste koje sudjeluju u mutualističkim odnosima s fotosintetskim organizmima. U ovu kategoriju spadaju mikorizne gljive i lišaji. Mikoriza je odnos između biljaka i gljiva temeljen na razmjeni tvari između korijenskog sustava biljke i micelija gljive. Mikorizna gljiva mineralne tvari (ponajprije dušik i fosfor) i vodu koje apsorbira iz tla pomoću razgranatog micelija dijeli sa svojim biljnim partnerom. Zauzvrat, biljka gljivu opskrbljuje produktima fotosinteze (ugljikohidratima) i vitaminima (Tkalčec i sur. 2008). S druge strane, neke vrste gljiva žive u simbiotskoj zajednici pod imenom lišaji gdje imaju izravnu korist od fotosinteze stvaranjem bliskog odnosa s algama i/ili cijanobakterijama. Gljive u toj zajednici dobivaju hranjive tvari od algi, dok gljive štite alge od isušivanja i drugih nepovoljnih utjecaja kao što je ultraljubičasto zračenje (Tkalčec i sur. 2008, Watkinson i sur. 2016). Lišaji predstavljaju prve kolonizatore oligotrofnih staništa (siromašnih hranjivim tvarima) i staništa ekstremnih klimatskih uvjeta, gdje imaju ključnu ulogu u stvaranju tla neophodnog za život biljaka (Tkalčec i sur. 2008).

Štoviše, gljive su razvile i druge oblike simbioze. Neke su gljive u simbiotskom odnosu s biljkama kao endofiti. Žive u listovima biljaka zaštićene od vanjskih utjecaja, no ne uzrokuju patološke promjene u biljnim tkivima, već sintezom i oslobađanjem alkaloida odbijaju biljojedne organizme (Watkinson i sur. 2016). S druge strane, neke su gljive simbionti životinja. Biljojedni sisavci stekli su mogućnost probave celuloze i lignina iz biljnih tkiva što im omogućuju hidrolitički enzimi anaerobnih mikroorganizama koji žive u njihovom probavnom sustavu – bakterija, praživotinja i gljiva. Neki kukci, poput termita i mrava, uzgajaju određene vrste gljiva kako bi se njima hranili (Tkalčec i sur. 2008).

Gljive imaju neizmjerljivo važnu ekološku ulogu u kopnenim ekosustavima. One naseljavaju gotovo sve dijelove biosfere, no ipak ponajviše zauzimaju kopnena staništa. Relativno malen broj vrsta živi u slatkim vodama i moru. Šumska staništa najobilnija su gljivljim vrstama, prije svega saprotrofnim i mikoriznim. Uz njih gljivljim vrstama bogati su i grmljaci, travnjaci i cretovi. Tlo s biljnim ostacima na njegovoj površini najvažniji je supstrat za život gljiva koje

Tipičan razvojni ciklus bazidiomiceta uključuje stapanje jezgara i mejozu unutar bazidija te raspodjelu nastale tetrade haploidnih jezgara koji se postupno diferenciraju u bazidiospore. Sljedeće zajedničko obilježje bazidiomiceta su doliporne septe kojima su podijeljene stanice unutar pojedinih hifa. Kopče su treće osnovno obilježje bazidiomiceta. Nastaju tijekom diobe terminalne stanice hife (rasta u duljinu). U tom stadiju vršna stanica hife sadrži dvije jezgre koje se obje mitotski dijele u dvije jezgre kćeri. Nakon diobe u novu vršnu stanicu hife ulazi po jedna kćer jezgra kroz strukturu zvanu kopča. Jedna manja skupina bazidiomiceta ima životni stil kvasaca. Te vrste iznimno ne stvaraju bazidiospore na bazidijima niti ne stvaraju septe i kopče. Međutim, danas se smatra da svaka gljiva koja ima doliporne septe ili stvara kopče pripada odjeljku *Basidiomycota* (Watkinson i sur. 2016).

Plodište bazidiomiceta razvija se iz dvojezgrenog sekundarnog micelija i proizvodi brojne bazidije na površini listića s donje strane klobuka. Sljedeće faze u dozrijevanju bazidija uključuju kariogamiju (diobu jezgre) i mejozu. Naposljetku, svaki bazidij stvara četiri bazidiospore, pri čemu svaka sadrži jednu haploidnu jezgru. Oslobođene bazidiospore kliju i tvore jednojezgrene primarne micelije s jednostavnim poprečnim septama. Na njima se uzdižu uspravni konidiofori na kojima se oblikuju brojne ljepljive haploidne oidije. Vrh jednojezgrene hife u blizini spolno kompatibilne oidije kemotropno će rasti u njezinu smjeru. Plazmogamija (stapanje stanica) hife i oidije označava početak nastanka dvojezgrenog micelija s kopčama. Stapanje jezgara odvija se nešto kasnije. Dvojezgreni micelij može razviti plodišta samo u povoljnim okolišnim uvjetima. Veći broj bazidiomiceta (razred *Agaricomycetes*) ipak ima nešto jednostavniji životni ciklus u kojem nedostaje oidijski stadij, već dolazi do spajanja dva spolno kompatibilna primarna micelija (Weber i Webster 2007).

Vrste analizirane u ovom radu pripadaju pododjeljku *Agaricomycotina* koji uključuje sve bazidiomicete koji stvaraju plodišta. Dijeli se na tri razreda: *Agaricomycetes*, *Dacrymycetes* i *Tremellomycetes*. Analizirane vrste spadaju u razred *Agaricomycetes* koji danas ima 16 000 opisanih i znanstveno prihvaćenih vrsta (Watkinson i sur. 2016). Ova je skupina vrlo raznolika prema morfologiji plodišta. Ona se u najvećem broju slučajeva sastoji od proširenog gornjeg dijela kojeg nazivamo klobuk (Sl. 1.). Klobuk na svojem donjem dijelu nosi strukturu različitog oblika (himenofor) gdje se razvijaju spore. Kod gljiva iz razreda *Agaricomycetes* himenofor je većinom u obliku listića (lamela), iglica ili cjevčica, no može biti i gladak, koraljast, naboran ili zatvoren u unutrašnjosti plodišta gomoljastog oblika. Spore se razvijaju na bazidijima, koji se nalaze gusto zbijeni u jednom sloju (himeniju) na površini himenofora. Donji izduženi dio plodišta koji se nalazi u kontaktu s micelijem naziva se stručak.

Plodišta gljiva od davnine služe kao ljudska hrana. Sastoje se od velikog broja raznovrsnih tvari koje imaju veliku nutricionističku i farmakološku vrijednost (Friedman 2016). Gljive proizvode brojne biološki aktivne spojeve za koje se pretpostavlja da doprinose jačanju imuniteta i ublažavanju tumora (Ramesh i Pattar 2010). Ulogu bioaktivnih spojeva zauzimaju antioksidansi. Antioksidansi su spojevi koji, prisutni u malim koncentracijama u odnosu na oksidirane supstrate, mogu značajno usporiti, spriječiti ili ukloniti oštećenja stanica uzrokovana oksidacijom vrlo reaktivnim slobodnim radikalima ili reaktivnim kisikovim oblicima (ROS) uobičajeno prisutnim u biološkim sustavima (Wanasundara i Shahidi 2005). Slobodni radikali su vrlo reaktivne molekule koje nastaju tijekom staničnog disanja i procesa unutar metaboličkih puteva

funkcionalnih stanica. Usljed nekroze ili apoptoze slobodni radikali mogu znatno oštetiti osnovne stanične komponente kao što su lipidi, bjelančevine i nukleinske kiseline što konačno dovodi do smrti stanica (Gilgun-Sherki i sur. 2002). U normalnim uvjetima ROS su deaktivirani u stanici djelovanjem superoksidne dismutaze (SOD). SOD katalizira pretvorbu jednoatomnog kisika koji je u prisutnosti katalaza razgrađen u vodu i kisik. Dodatno, glutation i enzimi povezani s glutationom imaju ulogu u deaktivaciji ROS-a (Llarena-Hernández 2017). Antioksidansi mogu donirati vodikove ione i na taj način stabilizirati slobodne radikale ometajući njihove lančane reakcije koje se odvijaju tijekom stanične oksidacije u živoj stanici (Hamid i sur. 2010). Stoga je glavno obilježje antioksidanata vezivanje slobodnih radikala i njihova deaktivacija (Dutta 2015). Fenolne kiseline (npr. galna, kavena i protokatehinska kiselina), fenolni diterpeni, različiti polifenoli (antocijanini, proantocijanidini, flavonoli, flavoni, flavanoli, flavanoni, izoflavoni, stilbeni i lignani), flavonoidi (kvercetin, katehin, naringenin i kempferol) i hlapiva ulja (eugenol, karvakrol, timol i mentol) neki su od učinkovitih antioksidanata za koje je dosad znanstveno utvrđeno da mogu imati potencijalne primjene u medicini i farmaceutici (Masella i sur. 2005; Maestri i sur. 2006; Hossain i sur. 2011).

Sekvenciranje cjelovitog genoma gljiva ukazuje da je njihov potencijal za proizvodnju specijaliziranih metabolita izrazito podcijenjen. Genski klasteri povezani sa specijaliziranim metabolitima istražuju se zbog otkrivanja gena s mogućnošću primjene u biotehnologiji za proizvodnju bioaktivnih spojeva (Watkinson i sur. 2016). Većina antioksidanata dostupnih iz vaskularnih biljaka, npr. polifenola, fenolnih kiselina te vitamina C i E također su prisutni i u plodištima gljiva koja nakupljaju brojne bioaktivne spojeve, uključujući fenolne spojeve, mineralne tvari, bjelančevine i vitamine (Kalač 2009). Među antioksidansima u gljivama veliku pažnju dobili su polisaharidi i polifenoli (Llarena-Hernández i sur. 2017). Polifenoli su veliku važnost stekli zbog brojnih dokazanih bioaktivnih svojstava koja uključuju vezivanje slobodnih radikala, kelaciju metala, imunomodulacijsko djelovanje, modulaciju djelovanja enzima i inhibiciju oksidacije lipida (Teissedre i Landrault 2000; Mallavadhani i sur. 2006; Rodrigo i Bosco 2006). Također, gljive u svojim tkivima skladište i brojne druge specijalizirane metabolite kao što su poliketidi, terpenoidi i steroidi (Keleş i sur., 2011). Stoga, gljive predstavljaju vrlo dobar izvor prirodnih antioksidanata i njihov se antioksidacijski potencijal danas intenzivno istražuje.

U okviru ovog rada proučavani su ukupni topivi proteini te različite skupine specijaliziranih metabolita u plodištima gljiva.

Fenoli, odnosno polifenoli, su spojevi prirodno prisutni u gljivama građeni od više aromatskih prstenova, pri čemu ne sadrže funkcionalne grupe s dušikom u svojoj osnovnoj strukturi (Quideau i sur. 2011). Zbog svoje specifične kemijske strukture imaju različita biološka djelovanja u organizmima koji ih sintetiziraju (kao što su biljke i gljive), no također pokazuju i različite pozitivne efekte na ljudski organizam (Rodrigo i sur. 2012) te su već desetljećima u fokusu istraživača. Fenolne kiseline su neflavonoidni polifenoli koji se dijele na široko rasprostranjene derivate hidroksibenzojeve i hidroksicimene kiseline (Tsao 2010). Prema prethodnim istraživanjima, fenolne kiseline čine glavninu fenolnih spojeva prisutnih u plodištima gljiva (Ferreira i sur. 2009, Karaman i sur. 2010). Pokazuju snažnu antioksidativnu aktivnost i

sposobnost zaštite vitalnih staničnih struktura poput staničnih membrana, te strukturnih proteina, enzima, membranskih lipida ili nukleinskih kiselina (Ferreira i sur. 2007, Froufe i sur. 2009).

Triterpenoidi su skupina strukturno različitih ugljikovodika nastalih spajanjem nekoliko C5 izoprenskih jedinica sintetskim putem mevalonske kiseline i prirodni su prekursori sterola, esencijalnih spojeva u građi eukariotskih organizama (Öztürk i sur. 2015, Yaoita i sur. 2015).

Alkaloidi su prirodni bazični spojevi u kojima su prisutni dušikovi atomi na bilo kojoj poziciji u molekuli što ne uključuje dušik u amidnim ili peptidnim vezama (O'Connor 2010). Alkaloidi imaju iznimnu važnost u biomedicini jer imaju jedinstveno svojstvo – sposobnost da budu akceptori ili donori vodika ovisno o funkcionalnom tipu amino grupe u strukturi alkaloida. Ovo je svojstvo neophodno za interakcije ciljnih spojeva (enzima, proteina i receptora) i lijekova (liganada) koji sadrže alkaloide (Wieczorek i sur. 2015).

DPPH metoda je brza i jednostavna metoda određivanja antioksidacijskog potencijala bioloških uzoraka koja se temelji na redukciji slobodnog DPPH radikala, gdje stupanj promjene boje reakcijske otopine pokazuje sposobnost antioksidansa da donira proton (Brand-Williams i sur. 1995, Kedare i Singh 2011). S druge strane, FRAP metoda određivanja antioksidacijske aktivnosti temelji se na redukciji iona željeza. U prisutnosti antioksidanata i pri niskoj pH vrijednosti reakcijske otopine, FRAP reagens koji sadrži TPTZ u prisutnosti Fe^{2+} iona gradi kompleks plavoljubičaste boje te se kolorimetrijski mjeri apsorbancija na 593 nm (Benzie i Strain 1999, Hayes i sur. 2011).

Za potrebe analize proteina te različitih specijaliziranih metabolita u plodištima gljiva sakupljena su plodišta 17 vrsta samoniklih jestivih gljiva. Slijede podaci o pronađenim i uzorkovanim vrstama: latinski i hrvatski naziv vrste, taksonomska pripadnost (odjeljak, red, porodica); morfološki opis plodišta, stanište i trofički status (prema: Kits van Waveren 1985, Breitenbach i Kränzlin 1986, 1991a, 1991b; Bas i sur. 1988, 1990, 1995; Kränzlin 1991, Pegler i sur. 1995, Hansen i Knudsen 1997, Heilmann-Clausen i sur. 1998, Noordeloos i sur. 2001, 2005; Sarasini 2005, Knudsen i Vesterholt 2012, Ryvarden i Melo 2014) te rasprostranjenost u Hrvatskoj.

Agaricus sylvicola (Vittad.) Peck

– anisova pečurka

Taksonomska pripadnost: *Basidiomycota*,
Agaricales, *Agaricaceae*



Morfološki opis plodišta:

Klobuk širok 50-100 mm, u mladosti polukružan do konveksan, kasnije se izravnava, mliječnobijel do krembijel, kasnije žućkast do narančasto smečkast, požuti na ozljedu.

Listići slobodni, gusti, u zrelosti tamnosmeđi do smeđecrni.

Stručak 50-100 × 8-12 mm, valjkast, baza često svijena i gomoljasta, šupalj, krhak, bjelkast do smečkast, posjeduje bijeli kožasti vjenčić, požuti na ozljedu.

Meso bijelo, ne mijenja boju na ozljedu, ili prelazi u blijedo žućkasto smeđu.

Spore cca. 5-8 × 3,5-5 μm, eliptične, glatke, s debelom stijenkom, smeđe boje.

Stanište i trofički status:

živi kao saprotrof u različitim tipovima bjelogoričnih i crnogoričnih šuma, na tlu, lišću ili iglicama.

Rasprostranjenost u Hrvatskoj:

uobičajena vrsta na cijelom području Hrvatske.

Agrocybe cylindracea (DC.) Maire (sensu lato)

– jablanovača

Taksonomska pripadnost: *Basidiomycota*,
Agaricales, *Strophariaceae*



Morfološki opis plodišta:

Klobuk širok 30-100 mm, konveksan, kasnije ravan, glatke površine, krem boje sa smeđim centrom, rjeđe tamnosmeđ i blijedi prema rubu.

Listići ravno prirasli na stručak, u zrelosti svijetlo do tamno žutosmeđi.

Stručak 50-100 × 10-20 mm, valjkast, bjelkasto do blijedo smeđ, s kožastim vjenčićem u gornjem dijelu, površina vlaknasta do čehasta.

Meso bjelkasto do blijedo smeđe.

Spore cca. 7,5-12,5 × 5-7 μm, eliptične do valjkasto-eliptične, glatke, s debelom stijenkom i malim kličnim otvorom, svijetlo žutosmeđe boje ispod mikroskopa.

Stanište i trofički status:

živi kao parazit i saprotrof pri bazi stabala ili na panjevima vrsta iz roda *Populus*, rjeđe na stablima vrsta iz roda *Ulmus*, *Quercus*, *Salix*, *Acer* i *Fraxinus*.

Rasprostranjenost u Hrvatskoj: česta vrsta na cijelom području Hrvatske.

Clitopilus prunulus (Scop.) P. Kumm.

(sensu lato)

– brašnjača

Taksonomska pripadnost: *Basidiomycota*,
Agaricales, *Entolomataceae*



Morfološki opis plodišta:

Klobuk širok 30-80 mm, u mladosti konveksan, zatim ravan do plitko udubljen, na sredini s tupim ispupčenjem, bijel, krembijel, do svijetlosiv, ponekad s žućkastim ili ružičastim tonovima, lagano klizav u vlažnim uvjetima, rub uvrnut prema listićima i nepravilno valovit.

Listići silazni niz stručak, gusti, u mladosti krem, u zrelosti prljavo ružičaste boje.

Stručak 20-40 mm × 5-10 mm, često ekscentričan, valjkast, pri bazi zadebljan, istobojan s klobukom, fino pustenast.

Meso bijelo do žućkasto sivo.

Spore cca. 9-12,5 × 5,5-7 μm, fuziformne do eliptične, s 6-8 uzdužnih rebara, ispod mikroskopa bezbojne, otrusina ružičasta.

Stanište i trofički status:

živi kao saprotrof u šumama, rjeđe na travnjacima uz rubove šuma.

Rasprostranjenost u Hrvatskoj:

česta vrsta u kontinentalnoj Hrvatskoj, nije pronađena u mediteranskom dijelu.

Coprinus comatus (O.F. Müll.) Pers.

– velika gnojištarka

Taksonomska pripadnost: *Basidiomycota*,
Agaricales, *Agaricaceae*



Morfološki opis plodišta:

Klobuk širok 20-50 mm, visok 50-150 mm, valjkast do jajolik, kasnije valjkasto-zvonolik, bijel, kasnije smečkast, središte smečkasto, pokriven vlaknastim ljuskama, osim kod centra koji je ± gladak, u mladosti velum povezuje rub klobuka sa stručkom.

Listići slobodni ili prirasli na spoj klobuka i stručka, na početku bijeli, zrenjem postaju sivi, pa crni i na kraju propadaju (otapaju se) u obliku crne tekućine.

Stručak 100-200 × 10-30 mm, valjkast, s gomoljastom bazom, šupalj u zrelosti, krhak, bijel, s bijelim pomičnim vjenčićem.

Meso u mladosti bijele boje, na ozljedu dobija vinski crvenu nijansu.

Spore cca. 9-13 × 6-9,5 μm, eliptično-jajolike, glatke, s debelom stijenkom i centralnim kličnim otvorom, tamnosmeđe.

Stanište i trofički status:

živi kao saprotrof u šumama te na različitim otvorenim staništima, (travnjaci, polja, itd.).

Rasprostranjenost u Hrvatskoj:

česta vrsta na cijelom području Hrvatske.

***Craterellus cornucopioides* (L.) Pers.**

– mrka trubača

Taksonomska pripadnost: *Basidiomycota*,
Cantharellales, *Cantharellaceae*



Morfološki opis plodišta:

Plodište ljevkasto ili nalik trubi, visoko 30-100 mm, široko 20-50 mm, šuplje sve do baze, rub podvrnut, unutarinja površina crna do crnosmeđa, a kad je plodište prosušeno sivosmeđa, blago uzdužno izbrazdana, vanjska površina s himenijem svjetlija od unutrašnje, siva do sivocrna, injasta, glatka, lagano nepravilno naborana do valovito izbrazdana.

Meso debljine cca. 1-2 mm, ugodnog aromatičnog mirisa.

Spore cca. 10-17 × 6-11 μm, eliptične, glatke, ispod mikroskopa bezbojne, s prilično debelom stijenkom.

Stanište i trofički status:

živi u mikorizi s bjelogoričnim drvećem u šumama (najčešće s bukvom).

Rasprostranjenost u Hrvatskoj:

uobičajena vrsta u kontinentalnom dijelu Hrvatske, no nije zabilježena u dijelu s mediteranskom klimom.

***Infundibulicybe gibba* (Pers.) Harmaja**

– mala martinčica

Taksonomska pripadnost: *Basidiomycota*,
Agaricales, *Tricholomataceae*



Morfološki opis plodišta:

Klobuk širok 30-70 mm, plitko do duboko ljevkast već i u mladosti, često sa središnjim ispupčenjem, gladak do fino pustenast, krem do smečkastooker boje.

Listići silazni niz stručak, gusti, blijedo krem do žućkasto smečkasti.

Stručak 20-50 × 6-10 mm, valjkast, bjelkast, uzdužno vlaknast do gotovo gladak, čvrst, u zrelosti šupalj.

Meso bjelkasto.

Spore cca. 5-8 × 3,5-5 μm, eliptične, glatke, ispod mikroskopa bezbojne.

Stanište i trofički status:

živi kao saprotrof u bjelogoričnim i crnogoričnim šumama, najčešće na listincu ili golom tlu.

Rasprostranjenost u Hrvatskoj:

česta vrsta u kontinentalnom dijelu Hrvatske, no nije zabilježena u području s mediteranskom klimom.

Lactarius deterrimus Gröger

– smrekova rujnica

Taksonomska pripadnost: *Basidiomycota*,
Russulales, *Russulaceae*



Morfološki opis plodišta:

Klobuk širok 30-110 mm, blago konveksan s podvrnutim rubom u mladosti, kasnije se izravnava ili dobiva oblik lijevka, uvijek sa središnjim udubljenjem, klizav i ljepljiv provlažen, svijetlonarančast do prljavo-narančast, pozeleni na ozljedu ili starenjem.

Listići široko prirasli na stručak ili blago silazni, narančasti.

Stručak 30-50 × 12-25 mm, valjkast, u zrelosti šupalj, gladak, narančast, pozeleni starenjem ili na ozljedu.

Meso narančasto, na ozljedu pušta crvenkastonarančasto mlijeko.

Spore cca. 7,5-11,5 × 6-9 μm, eliptične, ispod mikroskopa bezbojne, s ornamentom oblika nepotpune mreže u kombinaciji s brojnim izoliranim bradavicama, visina ornamenta do 0,5 μm.

Stanište i trofički status:

živi u mikorizi sa smrekom (vrste iz roda *Picea*) u crnogoričnim i miješanim šumama te u nasadima.

Rasprostranjenost u Hrvatskoj:

uobičajena vrsta uz svog mikoriznog partnera u kontinentalnom dijelu Hrvatske.

Laetiporus sulphureus (Bull.) Murrill

(sensu lato)

– žuti kruh

Taksonomska pripadnost: *Basidiomycota*,
Polyporales, *Fomitopsidaceae*



Morfološki opis plodišta:

Plodište polukružno do lepezasto, široko 100-400 mm, visoko 10-50 mm, gornja površina nepravilno nabrana, baršunasta, sumpornožuta do narančasta, donja površina valovita, živo sumpornožuta, prekrivena cjevčicama koje završavaju uglatim porama.

Meso sočno i lomljivo kod mlađih plodišta, blijedožute boje.

Spore cca. 5-8 × 3,5-5 μm, jajaste do eliptične, pod mikroskopom bezbojne, glatke.

Stanište i trofički status:

živi kao parazit i saprotrof na živim stablima i krupnim drvnim ostacima (panjevi, trupci) bjelogoričnog drveća (uglavnom na vrstama iz roda *Quercus*), rijetko i na crnogorici.

Rasprostranjenost u Hrvatskoj:

uobičajena vrsta u kontinentalnom dijelu Hrvatske i unutrašnjosti Istre, no nije poznata iz mediteranskog područja.

Lepista flaccida (Sowerby) Pat.

– ljevkaستا koturnica

Taksonomska pripadnost: *Basidiomycota*,
Agaricales, *Tricholomataceae*



Morfološki opis plodišta:

Klobuk širok 20-80 mm, konveksan s ulegnutim središtem u mladosti, ubrzo se proširi i postane ljevkast, gotovo gladak, žućkast, narančast do crvenkastosmeđ.

Listići vrlo gusti, silazni niz stručak, bjelkaste do žućkaste boje.

Stručak 20-50 × 5-15 mm, valjkast do blago batinast, gladak do slabo uzdužno vlaknast, bjelkast do istobojan s klobukom, u zrelosti šupalj, pri dnu s bjelkastim bazalnim micelijem.

Meso istobojno s površinom plodišta.

Spore cca. 4-5,5 × 4-5 μm, gotovo okrugle, sa sitnim bradavičastim ornamentom, bezbojne pod mikroskopom.

Stanište i trofički status:

živi kao saprotrof tla i listinca u bjelogoričnim i crnogoričnim šumama.

Rasprostranjenost u Hrvatskoj:

česta vrsta na cijelom području Hrvatske.

Lepista nuda (Bull.) Cooke

– modrikača

Taksonomska pripadnost: *Basidiomycota*,
Agaricales, *Tricholomataceae*



Morfološki opis plodišta:

Klobuk širok 25-150 mm, konveksan, kasnije ravan do nepravilno valovit, središte blago ispupčeno ili rjeđe udubljeno, gladak, slabo ljepljiv u vlažnim uvjetima, ljubičaste do smeđeljubičaste boje, rub uvrnut u mladosti, a kasnije se izravnavava.

Listići umjereno gusti, s malim jarkom ili ravno prirasli na stručak, ljubičaste do mesnato sive boje.

Stručak 20-100 × 10-30 mm, valjkast, uglavnom s blagim do gomoljastim proširenjem pri bazi, ljubičast do ljubičasto siv, uzdužno vlaknast, pri vrhu blago vunast, pri dnu s ljubičastim bazalnim micelijem.

Meso ljubičaste do ljubičastosive boje.

Spore cca 5,5-9 × 4-5,5 μm, eliptične, sa sitnim bradavičastim ornamentom, bezbojne pod mikroskopom.

Stanište i trofički status:

živi kao saprotrof tla i listinca u šumama, parkovima, vrtovima, na kompostištima, te na travnjacima uz šume.

Rasprostranjenost u Hrvatskoj:

česta vrsta na cijelom području Hrvatske.

Leucoagaricus leucothites (Vittad.) Wasser
– bjelkasta pečurkovića
Taksonomska pripadnost: *Basidiomycota*,
Agaricales, *Agaricaceae*



Morfološki opis plodišta:

Klobuk širok 40-200 mm, u mladosti polukružan, kasnije se izravnava i postaje konveksan s izravnatim do uleknutim središtem, pustenast, kasnije gotovo gladak, u osnovi bijele, sivkaste do krem boje centar često tamniji, smečkast, površina često požuti starenjem ili na ozljedu.

Listići gusti do vrlo gusti, slobodni, bijeli, sivkasti, ružičaskasti do blijedokrem, ponekad na ozljedu postju crvenkasti.

Stručak 50-125 × 6-15 mm, valjkast, zadebljan prema bazi, šupalj, krhak, krembijel do smečkast, s postojanim uzlaznim vjenčićem bijele do krem boje.

Meso bijelo, na presjeku ponekad požuti.

Spore cca. 7,5-11 × 4,5-7 μm, eliptične do bademaste, glatke, bezbojne, s debelom stijenkom i kličnim otvorom.

Stanište i trofički status:

živi kao saprotrof tla u vrtovima, parkovima, te na različitim tipovima travnjaka.

Rasprostranjenost u Hrvatskoj:

uobičajena vrsta u cijeloj Hrvatskoj, nešto je rjeđa u mediteranskom dijelu.

Lycoperdon perlatum Pers.
– tikvasta puhara
Taksonomska pripadnost: *Basidiomycota*,
Agaricales, *Agaricaceae*



Morfološki opis plodišta:

Plodište okruglasto, kruškoliko ili batinasto, 20-90 mm visoko, 20-40 mm široko, sastoji se od lažnog stručka i proširene glave, egzoperidiju čine sitne konične bodlje, u mladosti bijele, a kasnije maslinastosmeđe, lagano otpadaju na dodir i tvore mrežasti uzorak na površini plodišta; endoperidija, u zrelosti sivosmeđa, raspucava se na vrhu i tvori okruglasti otvor iz kojeg izlaze spore.

Meso (gleba) bijelo u mladosti, kasnije maslinasto smeđe, subgleba je dobro razvijena i alveolarne strukture.

Spore cca. 3-4,5 μm promjera, okruglaste, sitno bradavičasto ornamentirane, s debelom stijenkom, maslinastosmeđe boje.

Stanište i trofički status:

živi kao saprotrof na tlu i listincu u bjelogoričnim i crnogoričnim šumama.

Rasprostranjenost u Hrvatskoj:

česta vrsta na cijelom području Hrvatske.

***Macrolepiota procera* (Scop.) Singer**

– velika sunčanica

Taksonomska pripadnost: *Basidiomycota*,
Agaricales, *Agaricaceae*



Morfološki opis plodišta:

Klobuk širok 100-300 mm, kuglast do jajolik u mladosti, kasnije zvonolik do ravan, ponekad s malim središnjim ispupčenjem, površina pustenasta u mladosti, boje lješnjaka do smeđe, kasnije se raspucava i prema rubu radi koncentrično raspoređene smeđe čehice na krembijeloj površini, dok centar ostaje homogeno pustenast i smeđ.

Listići srednje gusti, slobodni, bjelkaste do prljavokrem boje.

Stručak 100-400 × 10-20 mm, valjkast, baza gomoljasta, šupalj, s pomičnim vjenčićem, gornja površina krem, a donja smeđa.

Meso bijele do smečkaste boje.

Spore cca. 12,5-18 × 8-11 μm, eliptične, glatke, bezbojne pod mikroskopom, s debelom stijenkom i kličnim otvorom.

Stanište i trofički status:

živi kao saprotrof tla u šumama, te na različitim tipovima otvorenih staništa.

Rasprostranjenost u Hrvatskoj:

česta vrsta na cijelom području Hrvatske.

***Pleurotus dryinus* (Pers.) P. Kumm.**

– hrastova krivonoška

Taksonomska pripadnost: *Basidiomycota*,
Agaricales, *Pleurotaceae*



Morfološki opis plodišta:

Klobuk širok 40-150 mm, lepezastog do okruglasto lepezastog tlocrta, konveksan kod u mladosti, kasnije ravan, vlaknasto-pustenast, lagano čehast i ispucale površine u zrelosti, bijel, krem do siv, rub podvijen i s visećim ostacima veluma u mladosti.

Listići gusti, ravno prirasli na stručak do silazni, krem do blijedo oker.

Stručak 20-60 × 10-40 mm, ekscentričan, valjkast ili nepravilnog oblika, nekad urasta u supstrat, bjelkast do krem, vlaknasto-pustenast, u zoni vjenčića s krpicama veluma, pun.

Meso bjelkasto do krem.

Spore cca. 8-15 × 3,5-5,5 μm, valjkaste do baciliformne, glatke, bezbojne.

Stanište i trofički status:

živi kao parazit i saprotrof u šumama i parkovima, na živim i nedavno srušenim stablima bjelogorice i crnogorice.

Rasprostranjenost u Hrvatskoj:

nije rijetka vrsta u kontinentalnom dijelu Hrvatske, a u Mediteranu nije pronađena.

Psathyrella multipedata (Peck) A.H. Sm.
– busenasta slabunjavka
Taksonomska pripadnost: *Basidiomycota*,
Agaricales, *Psathyrellaceae*



Morfološki opis plodišta:

Klobuk širok 10-40 mm, polukuglast u mladosti, kasnije blago stožast do zvonolik, glatke, svilenaste površine, s radijalno raspoređenim vlaknima, oker do sivosmeđ u vlažnim uvjetima, a prosušen blijedosmeđ. *Listići* gusti, prirasli s jarkom, svijetlo smeđi u mladosti, kasnije tamno purpurastosmeđi. *Stručak* 30-140 × 1,5-4 mm, valjkast, postupno proširen prema bazi, šupalj, krhak, pri vrhu praškast, bjelkast, stručci srastaju u korjenastu pseudorhizu koja ulazi u tlo. *Meso* tanko, krhko, sivkasto smeđe. *Spore* cca. 7-9 × 3,5-4,5 μm, eliptične, glatke, crvenosmeđe pod mikroskopom, s malim kličnim otvorom.

Stanište i trofički status:

živi kao saprotrof u šumama, parkovima i vrtovima, na tlu ili rjeđe na trulom drvu.

Rasprostranjenost u Hrvatskoj:

vrsta je u okviru ovog rada po prvi puta zabilježena na području Hrvatske, no pretpostavlja se da nije posebno rijetka.

Psathyrella piluliformis (Bull.) P.D. Orton
– vodenasta slabunjavka
Taksonomska pripadnost: *Basidiomycota*,
Agaricales, *Psathyrellaceae*



Morfološki opis plodišta:

Klobuk širok 20-60 mm, isprva polukuglast do stožasto-zvonolik, kasnije zvonolik do konveksan, žućkasto do crvenkasto smeđ provlažen, prosušen žut do okersmeđ, ponekad s bjelkastim velumom, gladak. *Listići* gusti, prirasli na stručak s jarkom ili u spoju klobuka i stručka, bjelkasti u mladosti, kasnije crvenkasto do čokoladno smeđi. *Stručak* 25-100 × 2-9 mm, valjkast, šupalj, krhak, bjelkast do blijedosmeđ, tamniji prema bazi, pri vrhu ponekad s krpastim velumom, sitno praškast do gladak. *Meso* tanko, krhko, u klobuku smeđe do crvenkasto smeđe, u stručku blijedosmeđe. *Spore* cca. 4,5-6,5 × 3-4 μm, eliptične do lagano graholike, glatke, žućkastosmeđe boje, s vrlo sitnim kličnim otvorom.

Stanište i trofički status:

živi kao saprotrof u bjelogoričnim šumama na trupcima i panjevima.

Rasprostranjenost u Hrvatskoj:

uobičajena vrsta u unutrašnjosti Hrvatske.

Xerula radicata (Relhan) Dörfelt

– vitka korjenjača

Taksonomska pripadnost: *Basidiomycota*,
Agaricales, *Physalacriaceae*



Morfološki opis plodišta:

Klobuk širok 30-100 mm, konveksan, zatim većinom ravan, ponekad sa središnjim udubljenjem, u mladosti gladak, u zrelosti radialno naboran, ljepljiv u vlažnim uvjetima, žućkasto do oker smeđe boje.

Listići umjereno razmaknuti, na stručak prirasli s jarkom, ravno prirasli ili lagano silazni, bjelkasti, oštrica ponekad smeđa.

Stručak 100-200 × 5-10 mm, valjkast s batinastom bazom do 20 mm širine, često se ukopava u tlo u obliku lažnog korijena (pseudorhize), uzdužno žljebast, u vrhu bijel, prema bazi žućkasto smeđ, sitno praškast u mladosti, kasnije gladak, krhak.

Meso većinom bijelo, a pri dnu stručka smečkasto.

Spore cca. 12,5-17 × 8,5-12 μm, eliptične do jajaste, glatke, bezbojne pod mikroskopom.

Stanište i trofički status:

živi kao saprotrof u bjelogoričnim i miješanim šumama, prividno na tlu, no najčešće na korijenu ili uz sitnije drvene ostatke bukve (rod *Fagus*).

Rasprostranjenost u Hrvatskoj:

česta vrsta na cijelom području Hrvatske.

1.2. Cilj istraživanja

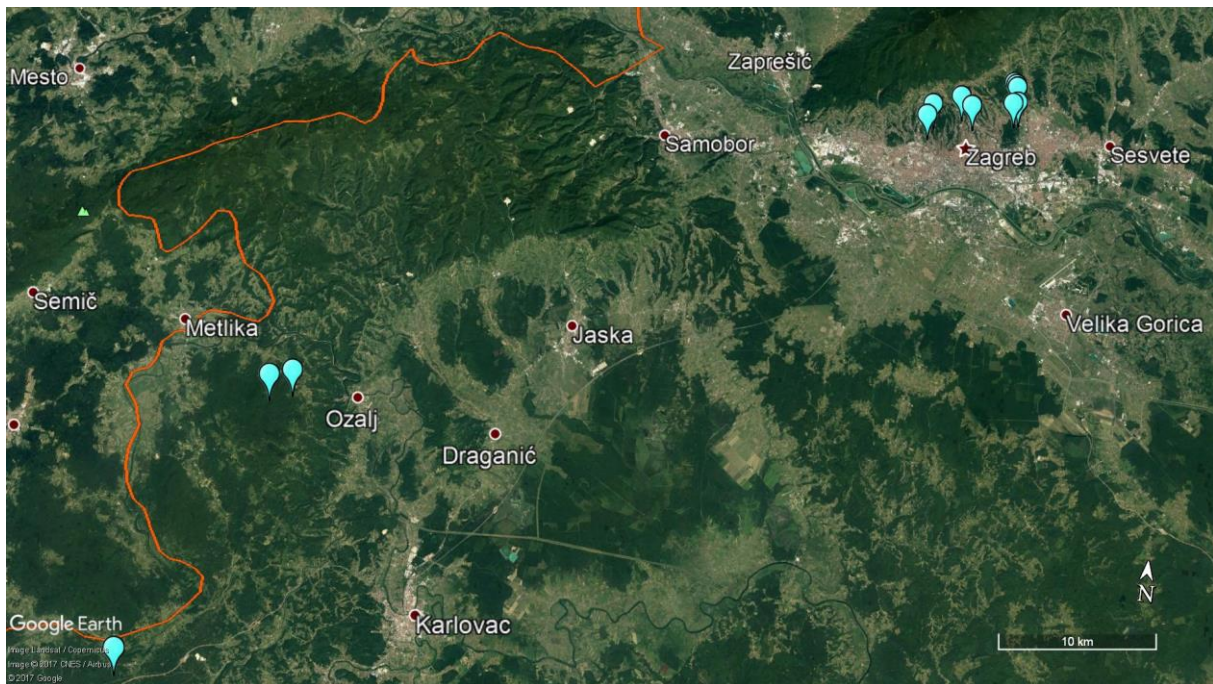
Cilj ovoga diplomskog rada je utvrditi da li ekstrakti svježih plodišta 17 vrsta samoniklih jestivih vrsta gljiva sakupljenih na području Hrvatske posjeduju bioaktivni potencijal koji bi se mogao primijeniti u znanosti i različitim ljudskim djelatnostima (npr. u medicini, farmaciji, nutricionizmu i biotehnologiji). Bioaktivni potencijal istraživanih vrsta procijenjen je na temelju rezultata analize ukupnih topivih proteina, ukupnih fenola, fenolnih kiselina, antioksidacijskog kapaciteta (određenog 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) testom i testom redukcije željeza/antioksidacijske snage (FRAP)), ukupnih triterpenoida i ukupnih alkaloida.

2. Materijali i metode

2.1. Sakupljanje, taksonomska identifikacija i priprema uzoraka plodišta gljiva za analizu

U jesen 2016. godine (16., 19. i 27. listopada) obavljena su tri jednodnevna mikološka terenska istraživanja na 13 različitih lokaliteta (Sl. 3.) u gradu Zagrebu i u okolici Karlovca. Terenska istraživanja proveli su Armin Mešić i Zdenko Tkalčec, mikolozi s Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu. U okviru tih istraživanja sakupljeno je 17 uzoraka plodišta (Tablica 1.) jestivih vrsta gljiva iz odjeljka *Basidiomycota*. Uzorci vrsta iz roda *Psathyrella* sastojali su se od 10 plodišta, *Craterellus cornucopioides* šest plodišta, *Agrocybe cylindracea*, *Clitopilus prunulus*, *Infundibulicybe gibba*, *Lactarius deterrimus*, *Lepista flaccida*, *L. nuda*, *Leucoagaricus leucothites*

i *Lycoperdon perlatum* od po tri plodišta, dok se uzorak ostalih vrsta sastojao od jednog plodišta. Svi lokaliteti nalaze se na području pod izraženim utjecajem umjereno tople kišne (Cfbwx") klime (Zaninović i sur. 2008).



Slika 3. Lokaliteti u sjeverozapadnoj Hrvatskoj na kojima su sakupljena plodišta gljivljih vrsta. Izrađeno u Google Earth servisu preuzetom s internetske stranice <https://earth.google.com/web/>.

Dolaskom u laboratorij svaki uzorak obrađen je na sljedeći način. Dio plodišta osušen je na eksikatoru na struji toplog zraka, temperature 40-50 °C, tijekom 24 sata te je nakon toga pohranjen u Hrvatskom nacionalnom fungariju (CNF), zbirci uzoraka gljiva Hrvatskog mikološkog društva. Identifikacija je obavljena na temelju makro- i mikro-morfoloških obilježja upotrebom suvremene taksonomske literature (Kits van Waveren 1985, Bas i sur. 1988, 1990, 1995; Pegler i sur. 1995, Hansen i Knudsen 1997, Heilmann-Clausen i sur. 1998, Noordeloos i sur. 2001, 2005; Sarasini 2005, Knudsen i Vesterholt 2012, Ryvarden i Melo 2014). Osušeni uzorci plodišta analizirani su naknadno u svrhu identifikacije gljivljih vrsta, u slučaju manjeg broja uzoraka čija identifikacija do razine vrste nije bila moguća samo na osnovi makroskopskih svojstava plodišta. Mikromorfološka obilježja su tada promatrana na svjetlosnom mikroskopu Olympus BX-51 s povećanjima od 30 do 1500 puta. Korištene su tehnike svjetlog vidnog polja i faznog kontrasta. Mikroskopski preparati pripremljeni su uklapanjem dijelova suhih plodišta u 2,5% otopinu kalijeve lužine (KOH). Morfološkom identifikacijom ustanovljeno je 17 vrsta gljiva, od čega su tri vrste (*Agrocybe cylindracea*, *Clitopilus prunulus* i *Laetiporus sulphureus*) određene u širem smislu (sensu lato) jer se u tim slučajevima radi o kompleksima kriptičkih vrsta čija taksonomija do danas nije u potpunosti riješena (Vasaitis i sur. 2008, Vizzini i sur. 2014, Morgado i sur. 2016, Song i Cui 2017).

Geološki, pedološki i klimatološki podaci o lokalitetima sakupljanja plodišta gljiva prikazani su u Tablici 1. Pedološki podaci preneseni su iz Osnovne geološke karte SFRJ 1:100000 (listovi Črnomelj, Ivanić Grad i Zagreb). Nadalje, pedološki podaci su preuzeti iz rada

Bogunović i sur. (1997). Također, korišteni su i podaci s internetskih stranica <http://zagreb.sumins.hr/> i <http://ishranabilja.com.hr/analize.html> uz korištenje Google Earth servisa. Klimatološki podaci o prosječnim mjesečnim temperaturama i količinama oborina za mjesec listopad preuzeti su s internetske stranice Državnog hidrometeorološkog zavoda (<http://klima.hr/klima.php?id=k1¶m=srednjak>). Navedene su prosječne vrijednosti izračunate na temelju podataka izmjenjenih na meteorološkim postajama koje su najbliže pojedinom lokalitetu u odgovarajućem višegodišnjem periodu mjerenja meteoroloških čimbenika: Ogulin (1949-2015), Zagreb-Grič (1861-2015), Zagreb-Maksimir (1949-2015) i Karlovac (1949-2015).

Tablica 1. Geološki, pedološki i klimatološki podaci o lokalitetima sakupljanja plodišta gljiva.

Broj uzorka	Vrsta	Lokalitet	Geološka građa terena	Pedološke karakteristike terena	\bar{t}_a / °C	\bar{p}_a / mm
1/7261	<i>Agaricus sylvicola</i>	park šuma Jelenovac, Zagreb	pijesci, pjeskoviti i glinoviti lapori, gline (plioleistocen)	veća naselja (pseudoglej obronačni 70%, distrično smeđe tlo 30%)	11,9	82,7
1/7294	<i>Agrocybe cylindracea</i>	dvorište IRB, Zagreb	šljunci, pijesci, gline (plioleistocen)	veća naselja (tlo deponija–deposol)	11,9	82,7
1/7270	<i>Clitopilus prunulus</i>	park šuma Dotrščina, Zagreb	šljunci, pijesci, gline (levant – donji pleistocen)	pseudoglej obronačni	10,9	75,3
1/7274	<i>Coprinus comatus</i>	park šuma Dotrščina, Zagreb	šljunci, pijesci, gline (levant – donji pleistocen)	pseudoglej obronačni	10,9	75,3
1/7292	<i>Craterellus cornucopioides</i>	Novaki Ozaljski ~ 2,7 km W-SW (Ozalj)	intrabiosparruditi – biolititi i bioklastični vapnenci (kimeridž, titon)	lesivirano tipično i akrično na vapnencu i dolomitu	11,1	101,5
1/7258	<i>Infundibulicybe gibba</i>	park šuma Jelenovac, Zagreb	pijesci, pjeskoviti i glinoviti lapori, gline (plioleistocen)	veća naselja (pseudoglej obronačni 70%, distrično smeđe tlo 30%)	11,9	82,7
1/7284	<i>Lactarius deterrimus</i>	Dvorišće Ozaljsko ~ 720 m SW (Ozalj)	intrabiosparruditi – biolititi i bioklastični vapnenci (kimeridž, titon)	lesivirano tipično i akrično na vapnencu i dolomitu	11,1	101,5
1/7265	<i>Laetiporus sulphureus</i>	Jandrićeva ulica 12, Zagreb	šljunci, pijesci, gline (plioleistocen)	veća naselja (pseudoglej obronačni 70%, distrično smeđe tlo 30%)	11,9	82,7

\bar{t}_a – prosječna mjesečna temperatura zraka za mjesec listopad, \bar{p}_a – prosječna mjesečna količina oborina za mjesec listopad

Tablica 1. Nastavak.

1/7262	<i>Lepista flaccida</i>	park šuma Jelenovac, Zagreb	pijesci, pjeskoviti i glinoviti lapori, gline (pliopleistocen)	veća naselja (pseudoglej obronačni 70%, distrično smeđe tlo 30%)	11,9	82,7
1/7291	<i>Lepista nuda</i>	Vukova Gorica ~ 1,5 km SW/W-SW	dolomiti (kimeridž, titon)	kiselo smeđe tlo na reliktnoj crvenici	10,6	150,2
1/7293	<i>Leucoagaricus leucothites</i>	dvorište IRB, Zagreb	šljunci, pijesci, gline (pliopleistocen)	veća naselja (tlo deponija–deposol)	11,9	82,7
1/7260	<i>Lycoperdon perlatum</i>	park šuma Jelenovac, Zagreb	pijesci, pjeskoviti i glinoviti lapori, gline (pliopleistocen)	veća naselja (pseudoglej obronačni 70%, distrično smeđe tlo 30%)	11,9	82,7
1/7269	<i>Macrolepiota procera</i>	park šuma Maksimir, Zagreb	aluvij recentnih tokova: šljunci, pijesci, siltovi, gline (kvartar)	močvarno glejno, djelomično hidromeliorirano	10,9	75,3
1/7256	<i>Pleurotus dryinus</i>	Ul. Vrhovec 65, Črnomerec, Zagreb	šljunci, pijesci, gline (pliopleistocen)	veća naselja (tlo deponija–deposol)	11,9	82,7
1/7263	<i>Psathyrella multipedata</i>	park šuma Jelenovac, Zagreb	pijesci, pjeskoviti i glinoviti lapori, gline (pliopleistocen)	veća naselja (pseudoglej obronačni 70%, distrično smeđe tlo 30%)	11,9	82,7
1/7268	<i>Psathyrella piluliformis</i>	park šuma Maksimir, Zagreb	beskarbonatni kopneni prapor: glinoviti siltovi (kvartar)	pseudoglej obronačni	10,9	75,3
1/7275	<i>Xerula radicata</i>	park šuma Dotrščina, Zagreb	šljunci, pijesci, gline (levant – donji pleistocen)	pseudoglej obronačni	10,9	75,3

2.2. Priprema uzoraka i kemikalije korištene za analizu bioaktivnog potencijala plodišta gljiva

Kalijev dihidrogenfosfat (KH_2PO_4), bezvodni kalijev hidrogenfosfat (K_2HPO_4), Folin-Ciocalteu reagens, natrijev nitrit (NaNO_2), natrijev hidroksid (NaOH), dimetil sulfoksid (DMSO), željezov(II) sulfat heptahidrat ($\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$), ledena octena kiselina (CH_3COOH), koncentrirana dušična kiselina (HNO_3), kalijev jodid (KI), bizmutov(III) nitrat ($\text{Bi}(\text{NO}_3)_3$), koncentrirana klorovodična kiselina (HCl), natrijev sulfid hidrat ($\text{Na}_2\text{S} \times n\text{H}_2\text{O}$) dobavljeni su od Kemike. COOMASSIE – SERVA BlueG C.I. 42655 i goveđi serumski albumin (BSA) kupljeni su od tvrtke SERVA Heidelberg/New York. Urea ($\text{CO}(\text{NH}_2)_2$), Trolox i 2,4,6-Tris(2-piridil)-s-triazin (TPTZ) dobavljeni su od tvrtke Fluka BioChemika. Korišteni su natrijev molibdat dihidrat ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$), željezov(III) klorid heksahidrat ($\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$), natrijev acetat trihidrat

($\text{CH}_3\text{COONa} \times 3\text{H}_2\text{O}$) i 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) proizvođača Sigma. Vanilin i perklorna kiselina (HClO_4) kupljeni su od tvrtke Merck. Korištena je ursolinska kiselina proizvođača TCI te tiourea ($\text{SC}(\text{NH}_2)_2$) proizvođača Alfa Aesar.

Za vršenje analiza bioaktivnog potencijala uzoraka plodišta gljiva su korišteni Retsch mixer mill MM400, Vortex tehničara EV-102, termoblok Stuart SBH200D/3, centrifuga Eppendorf 5424 R, spektrofotometar Labsystems Multiskan MS i spektrofotometar Shimadzu BioSpec-1601E.

U svrhu analize bioaktivnog potencijala plodišta, unutar osam sati od dolaska s terena, otprilike 5 g svježih plodišta iz svakog uzorka, pohranjeno je u plastične vrećice s patent zatvaračem i smrznuto na $-82\text{ }^\circ\text{C}$ u ledenici. Uzorci su u ledenici bili pohranjeni otprilike sljedeća četiri mjeseca, nakon čega su liofilizirani u uređaju Lyovac GT2 te usitnjeni u tarioniku s tekućim dušikom.

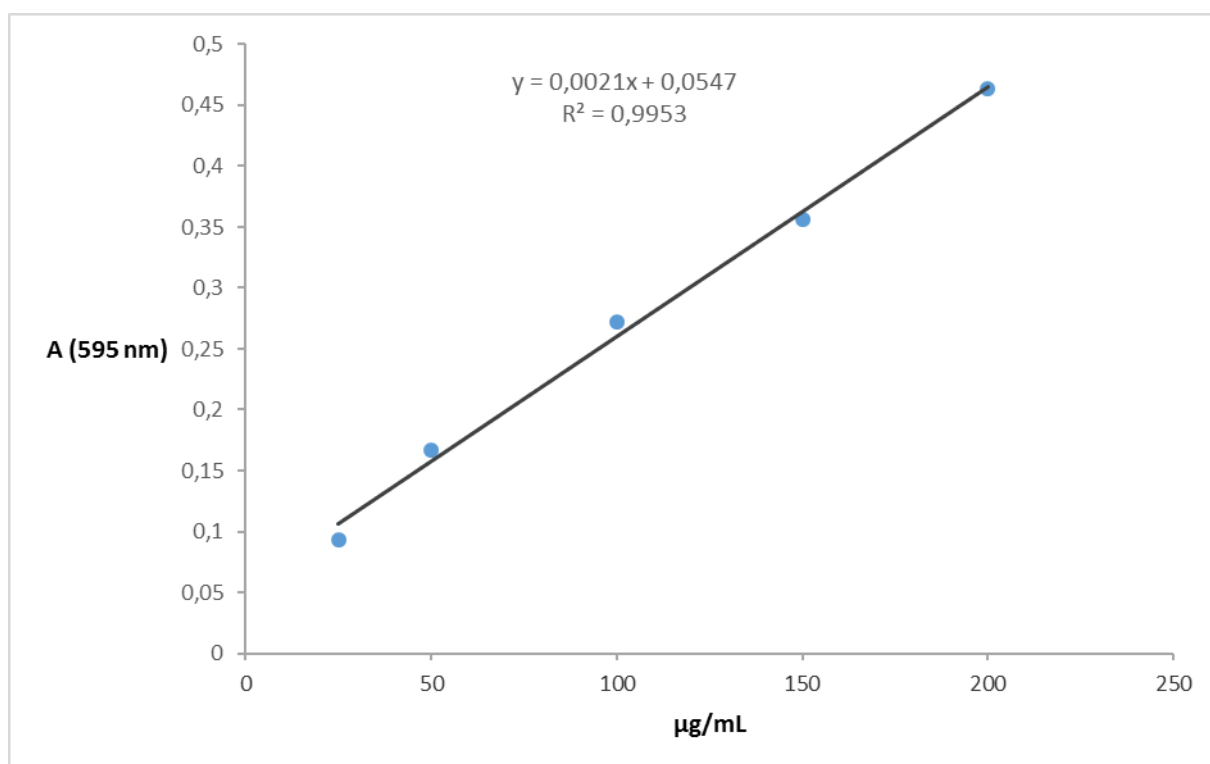
Za određivanje ukupnih topivih proteina korišten je kalij-fosfatni pufer, 0,1 M, pH 7,6. Pufer je pripremljen miješanjem 13,4 mL otopine KH_2PO_4 i 86,6 mL otopine K_2HPO_4 , te dodatnim otapanjem 12,011 g uree. Otopina KH_2PO_4 dobivena je otapanjem 34,023 g KH_2PO_4 u 250 mL destilirane vode, dok je otopina K_2HPO_4 pripravljena otapanjem 43,545 g K_2HPO_4 u 250 mL destilirane vode. Bradfordov reagens pripremljen je otapanjem 50 mg boje COOMASSIE BlueG u 25 mL 95%-tnog etanola i 50 mL 85%-tne fosforne kiseline (H_3PO_4) te 425 mL destilirane vode, zatim filtracijom dobivene otopine. U Eppendorf epruvetama od 2 mL odvagano je po 10 mg usitnjenog uzorka. Zatim je dodan 1 mL kalij-fosfatnog pufera nakon čega je sadržaj epruveta kratko homogeniziran na Vortexu. Uzorci su zatim centrifugirani (15 871 g / 10 min) pri temperaturi $+4\text{ }^\circ\text{C}$ te je dobiveni supernatant iskorišten za određivanje koncentracije proteina.

Za određivanje ukupnih polifenola, fenolnih kiselina i ukupnih alkaloida kao i antioksidacijske aktivnosti pripremljeni su metanolni ekstrakti uzoraka. U Eppendorf epruvetama od 2 mL u triplikatu je odvagano po 30 mg svakog usitnjenog uzorka. U svaku epruvetu dodano je 1,5 mL 80%-tnog metanola. Sadržaj epruveta je kratko homogeniziran na Vortexu. Potom su epruvete stavljene u mlin i ekstrakcija se vršila na frekvenciji 30 Hz tijekom 5 min. Zatim su epruvete uronjene u ultrazvučnu kupelj na 15 min. Nakon sonikacije sadržaj epruveta miješan je na rotacijskoj miješalici jedan sat. Epruvete su zatim centrifugirane 10 min na $25\text{ }^\circ\text{C}$ pri 15 871 g. Supernatant je preliven u nove Eppendorf epruvete od 2 mL nakon čega su tako pripremljeni metanolni ekstrakti spremljeni u hladnjak na $-20\text{ }^\circ\text{C}$.

Za analizu ukupnih triterpenoida pripremljeni su etanolni ekstrakti uzoraka. U Eppendorf epruvetama od 2 mL u triplikatu je odvagano po 30 mg svakog uzorka. U svaku epruvetu je otpipetiran 1 mL 96%-tnog etanola. Sadržaj epruveta je kratko homogeniziran na Vortexu. Potom su epruvete stavljene u mlin i uzorci ekstrahirani na frekvenciji 30 Hz tijekom 5 min. Zatim su epruvete uronjene u ultrazvučnu kupelj na 15 min. Ekstrakcija je dalje pospješena miješanjem sadržaja epruveta na rotacijskoj miješalici jedan sat. Epruvete su zatim centrifugirane 10 min na $25\text{ }^\circ\text{C}$ pri 15 871 g. Supernatant je preliven u nove Eppendorf epruvete od 2 mL nakon čega su dobiveni etanolni ekstrakti spremljeni u hladnjak na $-20\text{ }^\circ\text{C}$.

2.3. Metode analize bioaktivnog potencijala plodišta gljiva

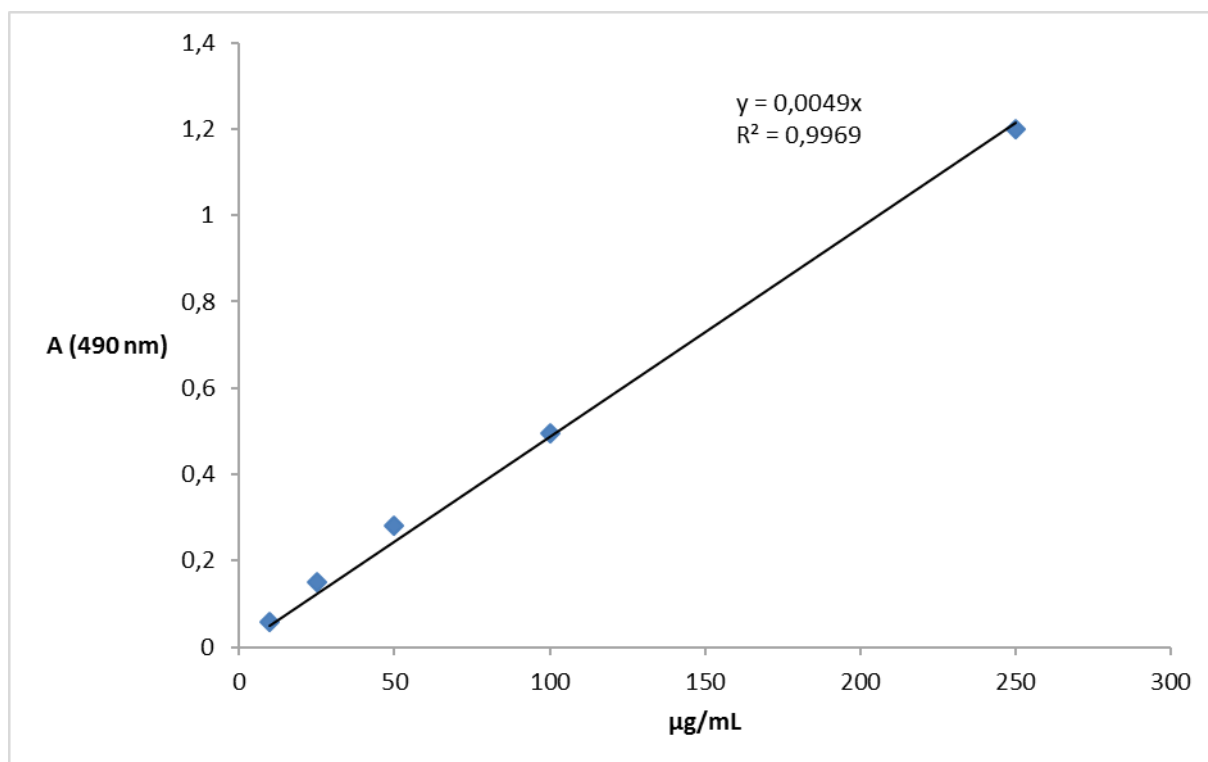
Ukupni proteini. Ukupni topivi proteini određeni su modificiranom Bradfordovom metodom (Brady i Macnaughtan 2015). U svaku jažicu spektrofotometra dodano je po 10 μL uzorka (svaki uzorak otpipetiran je u triplikatu) i 190 μL Bradfordovog reagensa nakon čega je sadržaj jažice promiješan da se pospješi kemijska reakcija. Konačno, mjerena je apsorbancija pri 595 nm. Baždarni pravac dobiven je uz razrjeđenja govedeg serumskog albumina (BSA) u kalij-fosfatnom puferu u rasponu koncentracija 25-200 $\mu\text{g/mL}$ (Sl. 4.). Za slijepu probu korišten je kalij-fosfatni pufer. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost devet replika \pm standardna devijacija.



Ukupni polifenoli. Ukupni polifenoli određeni su kolorimetrijskom metodom (Zudaire i sur. 2017). U svaku kivetu otpipetirano je 20 μL metanolnog ekstrakta uzorka (Azmir i sur. 2013). Zatim je dodan 1,58 mL destilirane vode i 100 μL Folin-Ciocalteu reagensa. Kao slijepa proba korišten je 80%-tni metanol. Sadržaj svake kivete je dobro promućkan. Potom je u svaku kivetu otpipetirano 300 μL zasićene otopine natrijeva karbonata (Na_2CO_3) nakon čega je svaka kiveta ponovno dobro promućkana. Kivete su ostavljene u mraku. Dva sata nakon dodatka Na_2CO_3 mjerena je apsorbancija pri 795 nm. Rezultati su izraženi kao aritmetička sredina biološkog triplikata \pm standardna devijacija.

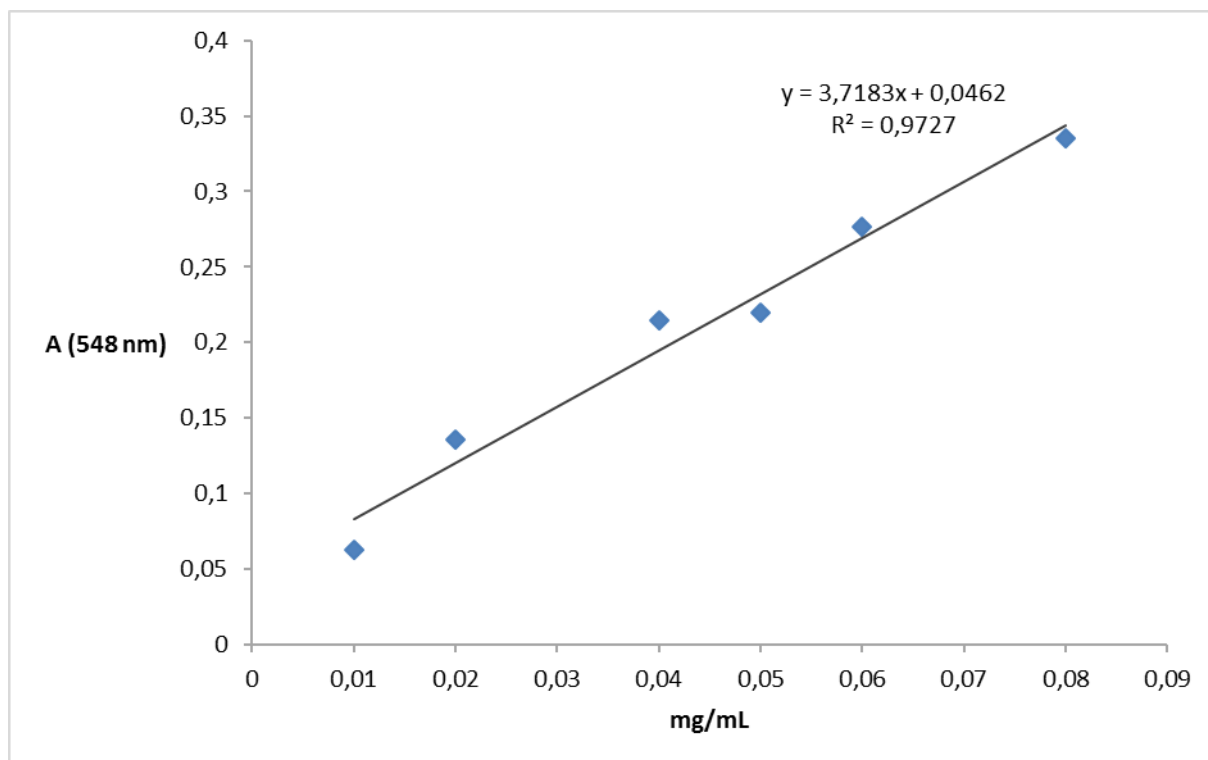
Fenolne kiseline. Određivanje fenolnih kiselina vršeno je kolorimetrijskom metodom (European Pharmacopoeia 2004). Pripremljen je Arnovov reagens otapanjem 1 g NaNO_2 i 1,17 g $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ u 10 mL destilirane vode. U svaku kivetu otpipetirano je 300 μL destilirane vode, 300 μL metanolnog ekstrakta uzorka, 100 μL 0,5 M HCl i 100 μL Arnovova reagensa. Za slijepu probu korišten je 80%-tni metanol. Svaka kiveta je dobro protresena te je potom u nju dodano 100 μL 1 M natrijeve lužine (NaOH) i 100 μL destilirane vode. Baždarni pravac dobiven je iz razrjeđenja kavene kiseline ($\text{C}_9\text{H}_8\text{O}_4$) u 80%-tnom metanolu koncentracije 10-250 $\mu\text{g/mL}$ (Sl. 5.).

Naposljetku, mjerena je apsorbancija pri 490 nm. Rezultati su izraženi kao aritmetička sredina biološkog triplikata \pm standardna devijacija.



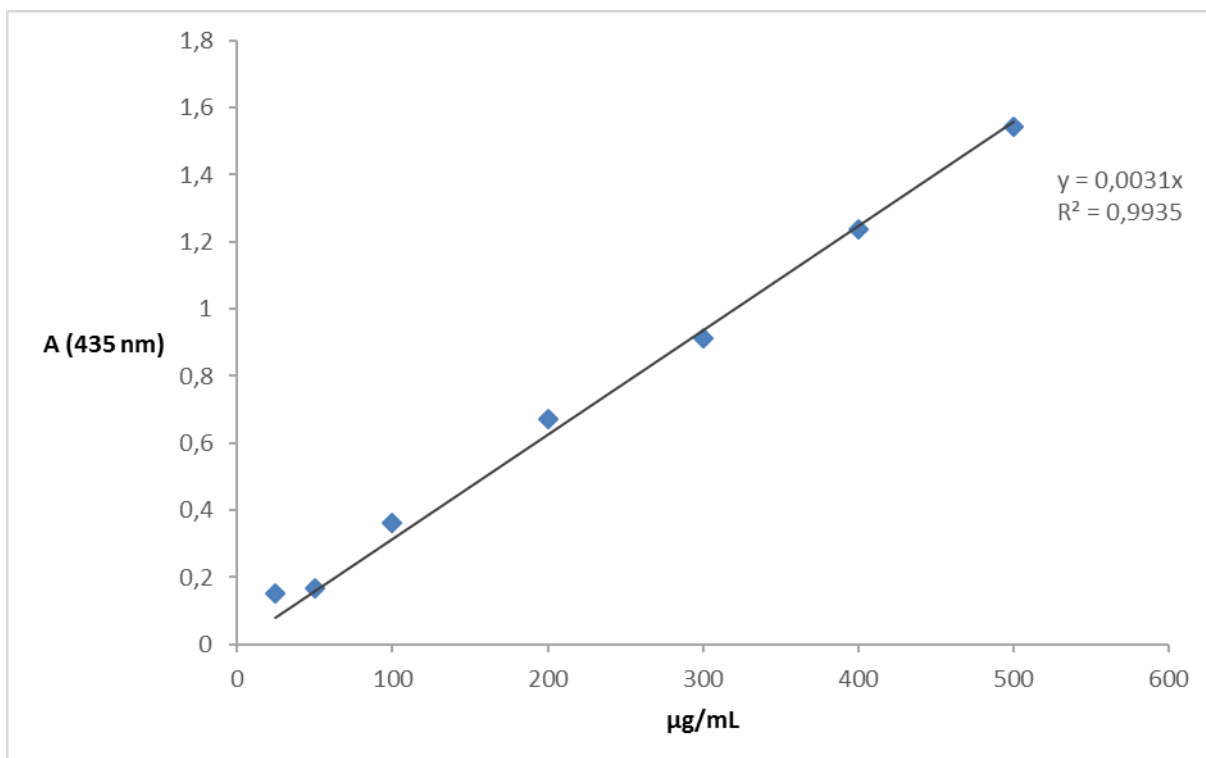
Triterpenoidi. Ukupni triterpenoidi kvantificirani su modificiranom kolorimetrijskom metodom (Chang i sur. 2012). Pripremljena je otopina vanilina (5% w/v) otapanjem 0,5 g vanilina ($C_8H_8O_3$) u 10 mL CH_3COOH . Odvagano je 30 mg svakog uzorka te su pripremljeni ekstrakti u 1 mL 96%-tnog etanola (Azmir i sur. 2013). Otpipetirano je 20 μ L etanolnog ekstrakta uzorka u Eppendorf epruvete od 2 mL i upareno u termobloku pri 60 °C do krutog ekstrakta. U epruvete s krutim ekstraktom dodano je 75 μ L otopine vanilina i 250 μ L $HClO_4$. Epruvete su stavljene na termoblok 45 min na 60 °C, a potom ohlađene u ledu do sobne temperature. Dodano je 675 μ L CH_3COOH i mjerena apsorbancija pri 548 nm.

Baždarni pravac dobiven je provedbom eksperimenta s razrjeđenjima ursolinske kiseline ($C_{30}H_{48}O_3$) u 96%-tnom etanolu koncentracija 0,01-0,08 mg/mL (Sl. 6.). U Eppendorf epruvete od 2 mL otpipetirano je 300 μ L svakog razrjeđenja ursolinske kiseline i upareno do krutog ekstrakta na termobloku. Rezultati su izraženi kao aritmetička sredina biološkog triplikata \pm standardna devijacija.



Alkaloidi. Ukupni alkaloidi određeni su modificiranim kolorimetrijskim metodom (Ribeiro i sur. 2008). Dragendorffov reagens (DR) pripremljen je miješanjem otopine $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3$ i 40%-tne otopine KI. Otopina $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3$ dobivena je otapanjem 0,8 g $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3$ u 40 mL destilirane vode i 10 mL ledene octene kiseline, dok je otopina KI pripremljena otapanjem 8 g KI u 20 mL destilirane vode. Otopina tiouree (3%) pripravljena je otapanjem 6 g tiouree u 200 mL destilirane vode, a 1%-tna otopina Na_2S otapanjem 0,85 g $\text{Na}_2\text{S} \cdot n\text{H}_2\text{O}$ u 30 mL destilirane vode. U Eppendorf epruvete od 2 mL odvagano je 5 mg svakog uzorka u triplikatu. U svaku epruvetu otpipetirano je 500 μL tople destilirane vode. Kiselost (pH) otopine namještena je na 2,0 - 2,5 dodavanjem 0,1 N HCl. Dodano je 200 μL DR-a. Epruvete su centrifugirane 5 min pri 9 391 g. Iz epruveta je odliven supernatant, a zatim dodano 200 μL otopine Na_2S . Epruvete su centrifugirane 5 min pri 9 391 g. Pažljivo je odliven supernatant, a zatim je dodano 200 μL HNO_3 . Epruvete su stavljene u sonikacijsku kupelj na 3 min. Potom je dodano 800 μL destilirane vode. Epruvete su centrifugirane 2 min pri 9 391 g. U pripremljene kivete otpipetirano je 200 μL supernatanta iz epruveta i 1000 μL otopine tiouree. Mjerena je apsorbancija pri 435 nm.

Baždarni pravac izrađen je na temelju provedenog eksperimenta s razrjeđenjima boldina ($\text{C}_{19}\text{H}_{21}\text{NO}_4$) u destiliranoj vodi u rasponu koncentracija 50-1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Sl. 7.). Temeljna standardna otopina boldina pripremljena je otapanjem 10 mg boldina u 0,5 mL DMSO te nadopunjavanjem do 10 mL s toplom destiliranom vodom. Za slijepu probu korištena je destilirana voda. Rezultati su izraženi kao aritmetička sredina biološkog triplikata \pm standardna devijacija.

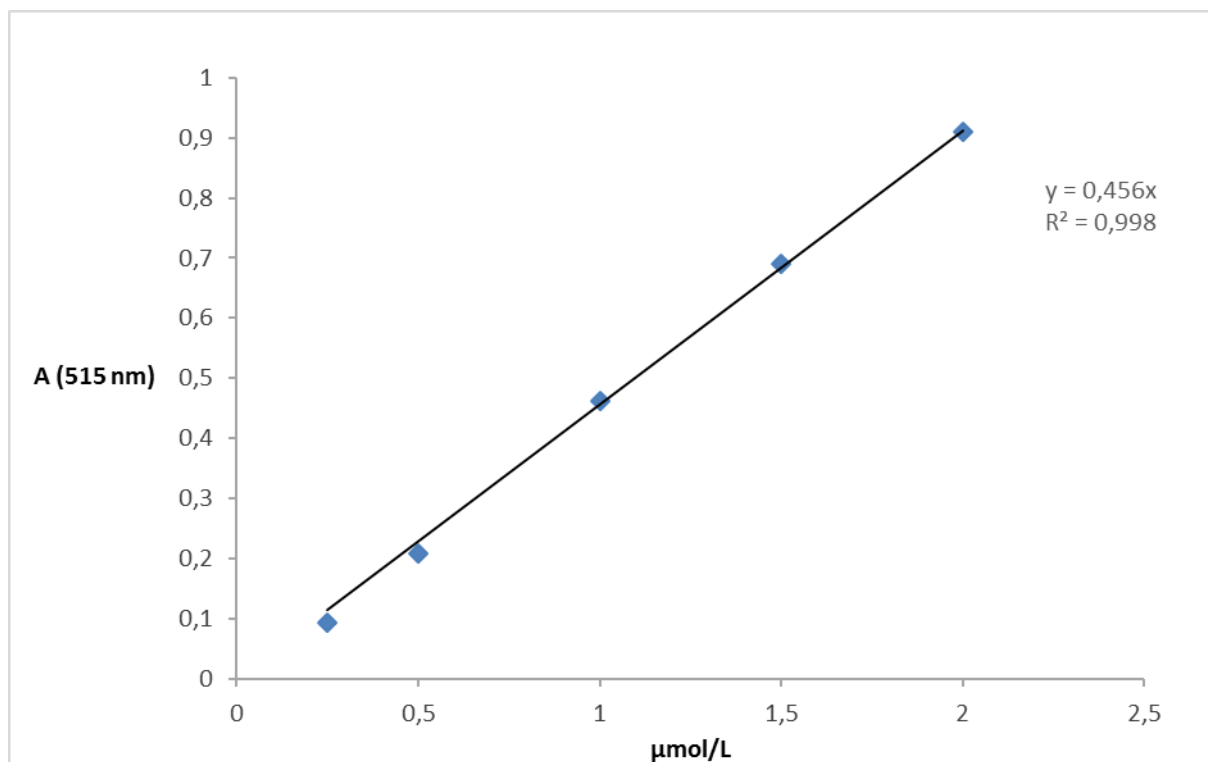


DPPH metoda određivanja aktivnosti vezivanja radikala. Antioksidacijski kapacitet određen je Brand-Williams metodom za određivanje antioksidacijske aktivnosti (Brand-Williams i sur. 1995). Otopina DPPH pripravljena je otapanjem 1,85 mg DPPH u 50 mL čistog metanola. U Eppendorf epruvete od 2 mL otpipetirano je 980 µL otopine DPPH i 20 µL metanolnog ekstrakta uzorka. Kao slijepa proba korišten je 80%-tni metanol. Sadržaj epruveta homogeniziran je na Vortexu te su epruvete ostavljene u mraku 30 min.

Baždarni pravac dobiven je na temelju razrjeđenja Troloxa ($C_{14}H_{18}O_4$) u 80%-tnom metanolu u rasponu koncentracija 0,25-2,0 mmol/L (Sl. 8.). Otopine su pripravljene iz temeljne standardne otopine Troloxa u čistom metanolu koncentracije 5,0 mmol/L. Mjerena je apsorbancija na 515 nm. Spektrofotometar je kalibriran čistim metanolom. Inhibicija slobodnog radikala DPPH izračunata je prema formuli:

$$I = A_{\text{kontrola}} - A_{\text{uzorak}}$$

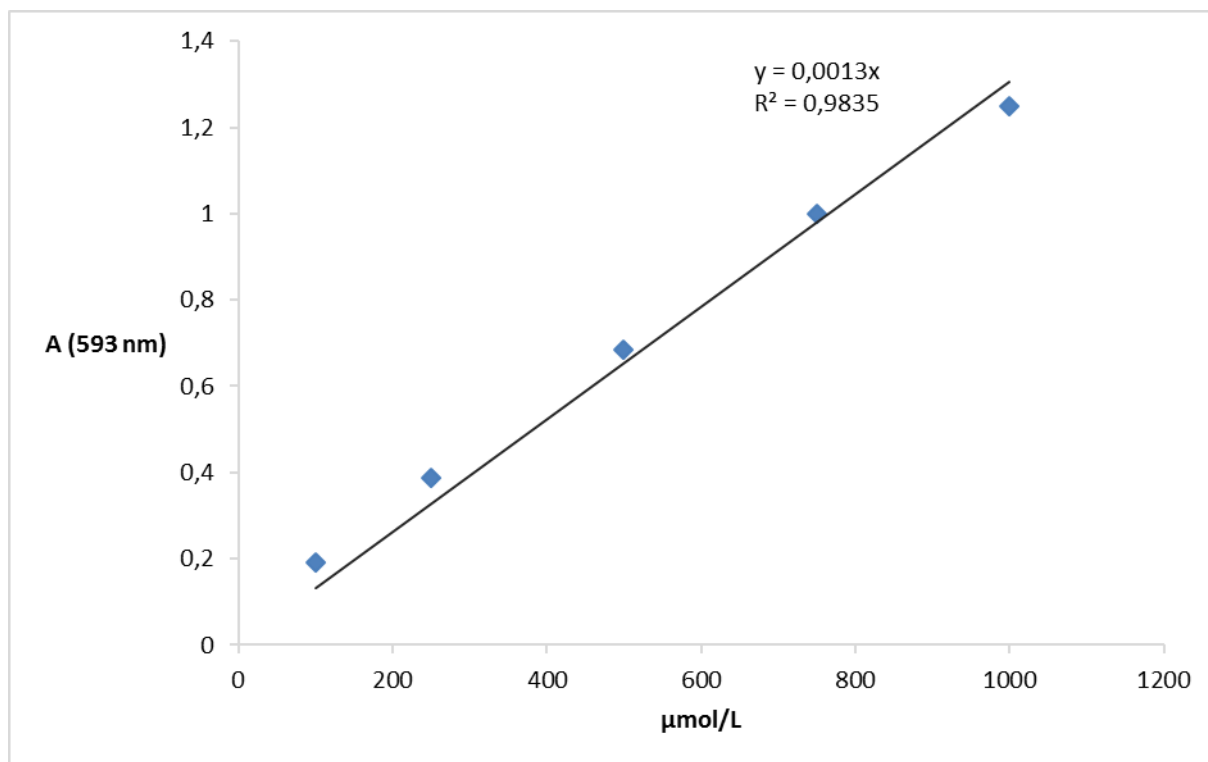
gdje je A_{kontrola} apsorbancija kontrolne reakcije (prisutni svi reagensi osim testiranog uzorka) i A_{uzorak} apsorbancija metanolnog ekstrakta uzorka. Rezultati su izraženi kao aritmetička sredina biološkog triplikata \pm standardna devijacija.



Slika 8. Baždarni pravac Troloxa za određivanje antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom.

FRAP metoda. Antioksidacijska aktivnost dodatno je kvantificirana i FRAP metodom (Benzie i Strain 1999). Pripremljena je otopina TPTZ koncentracije 10 mmol/L otapanjem 0,07808 g u malom volumenu destilirane vode, dodavanjem 32 µL 36%-tne otopine HCl i nadopunjavanjem do 25 mL destiliranom vodom. Acetatni pufer, 300 mmol/L (pH 3,6), pripremljen je otapanjem 3,1 g CH₃COONa x 3H₂O u 16 mL CH₃COOH te nadopunjavanjem do 1 L s destiliranom vodom. Zatim, pripravljena je 20 mM otopina FeCl₃ x 6H₂O otapanjem 0,13515 g u 25 mL destilirane vode. FRAP reagens dobiven je miješanjem 100 mL acetatnog pufera, 10 mL otopine TPTZ i 10 mL otopine FeCl₃ x 6H₂O. U svaku kivetu otpipetirano je 50 µL metanolnog ekstrakta uzorka i 950 µL FRAP reagensa. Za slijepu probu korišten je 80%-tni metanol. Nakon 4 min po dodavanju reagensa mjerena je apsorbancija pri 593 nm.

Baždarni pravac dobiven je provedbom eksperimenta s razrjeđenjima vodene otopine FeSO₄ koncentracija 100, 250, 500 i 750 µmol/L pripremljenih iz temeljne standardne otopine koncentracije 1000 µmol/L (Sl. 9.). Rezultati su izraženi kao aritmetička sredina biološkog triplikata ± standardna devijacija.



Slika 9. Baždarni pravac željezova(II) sulfata za određivanje antioksidacijske aktivnosti FRAP metodom.

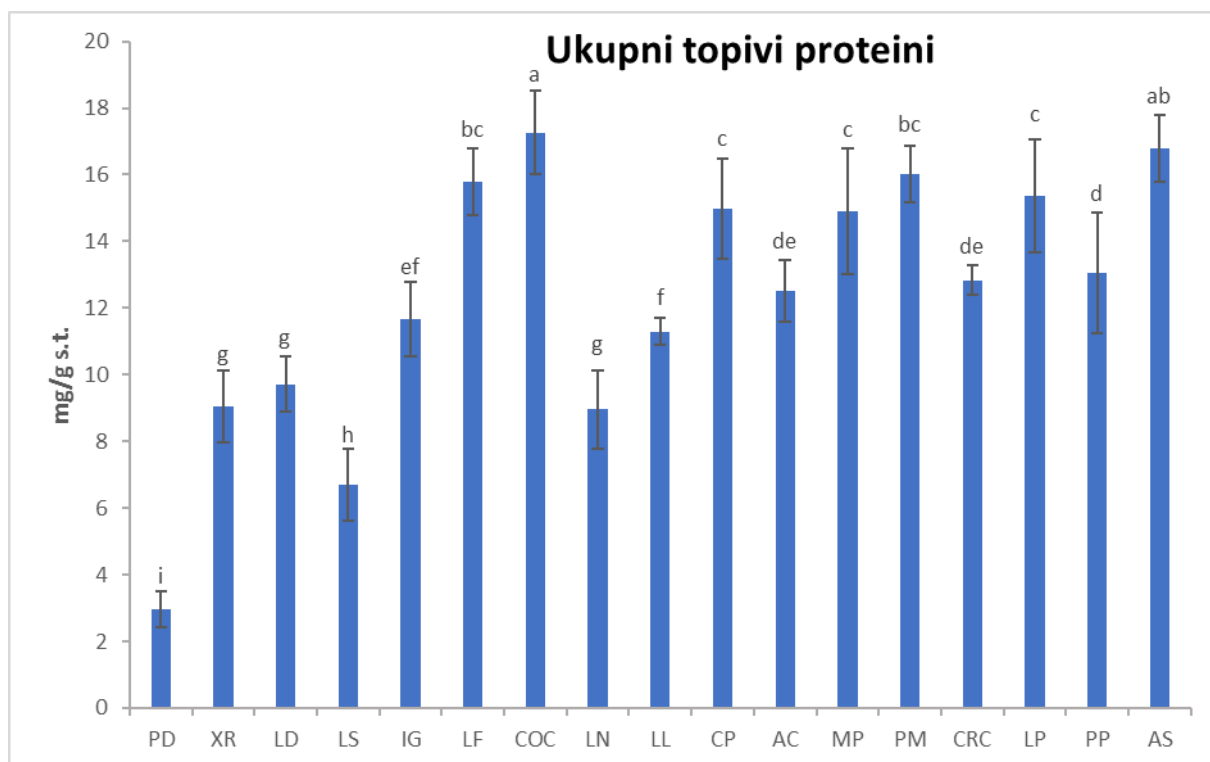
2.4. Statistička obrada podataka

Svi dobiveni rezultati prikazani su kao aritmetička sredina određenog broja replika. Statistička analiza provedena je pomoću računalnog programa STATISTICA 13.3 (TIBCO Soft Inc., SAD). Usporedba tretmana (pojedinačno i međusobno) provedena je pomoću jednosmjerne analize varijance (ANOVA) te primjenom "Duncan's New Multiple Range Test" (DNMRT), tj. post-hoc testa višestrukih usporedbi. Statistički značajnim smatrane su vrijednosti koje se razlikuju na razini $p < 0,05$. Također, izračunat je Pearsonov koeficijent korelacije za parametre specijaliziranih metabolita i antioksidacijske aktivnosti.

3. Rezultati

3.1. Proteini

Sadržaj ukupnih topivih proteina prikazan je na Slici 10. Najveći sadržaj topivih proteina u iznosu 17,267 mg/g s.t. pokazala je vrsta *Coprinus comatus*, dok je najmanju količinu imala vrsta *Pleurotus dryinus* s iznosom od 2,959 mg/g s.t.

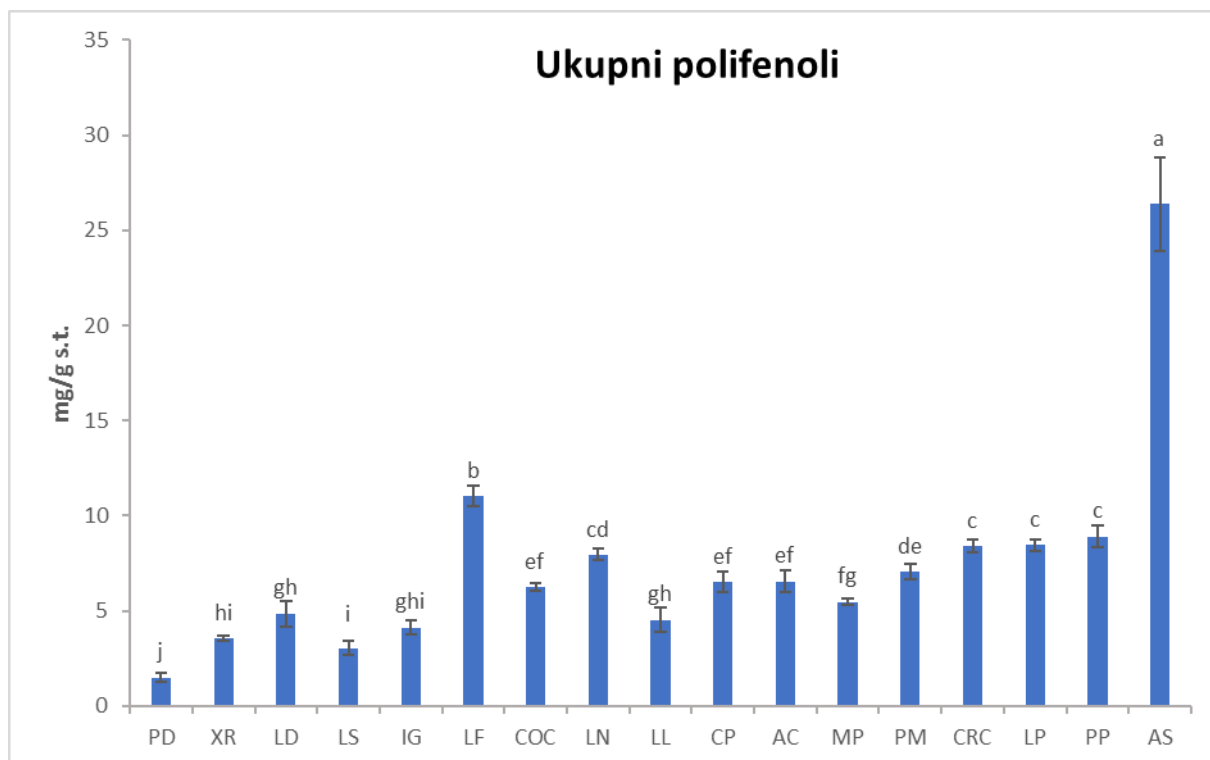


Slika 10. Sadržaj ukupnih topivih proteina u plodištima gljiva. PD–*Pleurotus dryinus*, XR–*Xerula radicata*, LD–*Lactarius deterrimus*, IG–*Infundibulicybe gibba*, LF–*Lepista flaccida*, COC–*Coprinus comatus*, LN–*Lepista nuda*, LL–*Leucoagaricus leucothites*, CP–*Clitopilus prunulus*, AC–*Agrocybe cylindracea*, MP–*Macrolepiota procera*, PM–*Psathyrella multipedata*, CRC–*Craterellus cornucopioides*, LP–*Laetiporus sulphureus*, PP–*Psathyrella piluliformis*, AS–*Agaricus sylvicola*, s.t.–suha težina. Stupci prikazuju srednje vrijednosti devet replika i na njima označenu odgovarajuću standardnu devijaciju. Stupci označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju ($p < 0,05$).

3.2. Specijalizirani metaboliti (ukupni polifenoli, fenolne kiseline, triterpenoidi, alkaloidi)

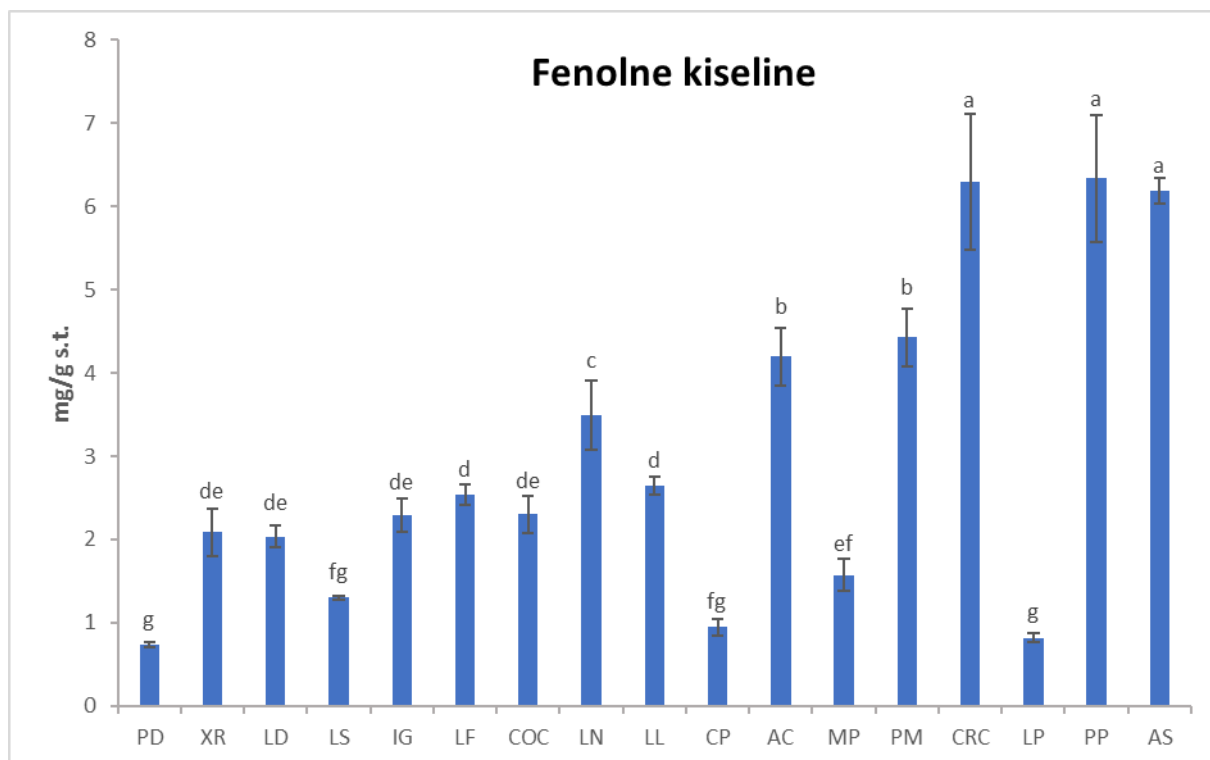
U okviru ovog rada iz skupine specijaliziranih metabolita istraživani su ukupni polifenoli, fenolne kiseline, triterpenoidi i alkaloidi.

U analiziranim gljivama sadržaj ukupnih polifenola bio je u rasponu 1,492–26,374 mg ekvivalenta galne kiseline (GAE)/g s.t. (Sl. 11.). Najviši sadržaj ukupnih fenola imala je vrsta *Agaricus sylvicola*, a najmanju količinu vrsta *Pleurotus dryinus*.



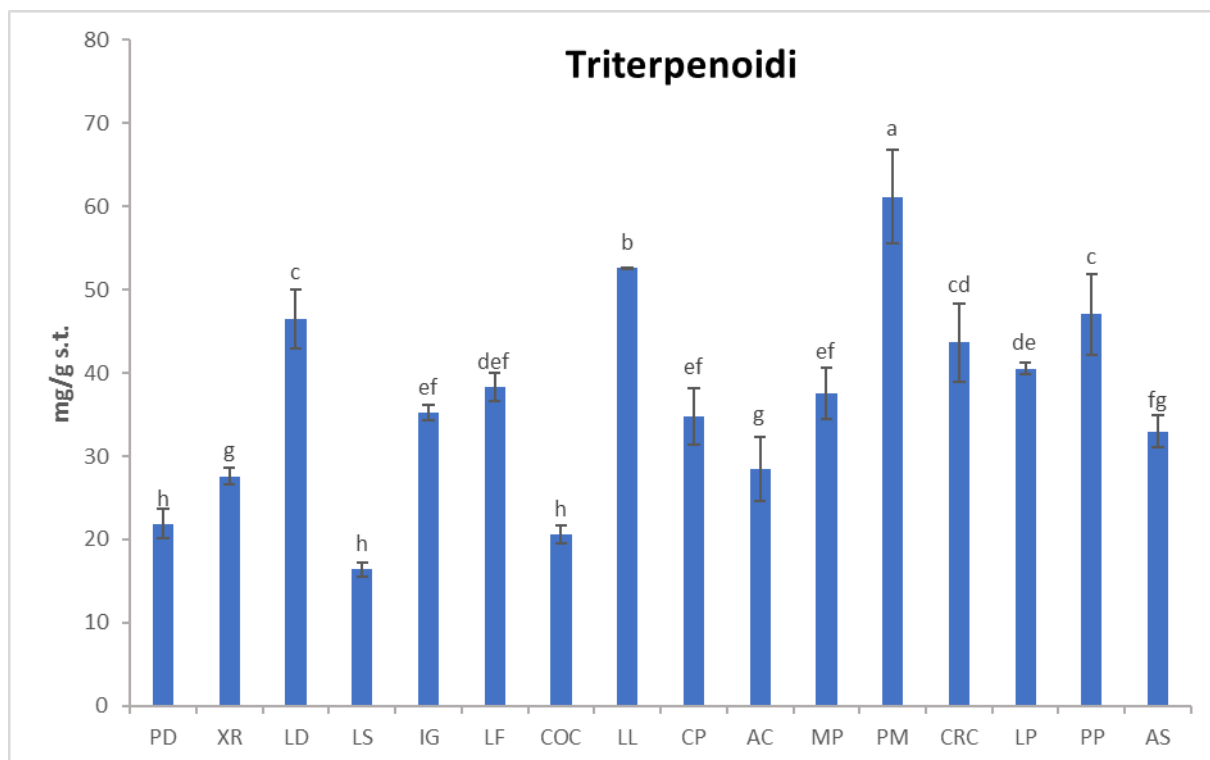
Slika 11. Sadržaj ukupnih polifenola u plodištima gljiva. PD–*Pleurotus dryinus*, XR–*Xerula radicata*, LD–*Lactarius deterrimus*, IG–*Infundibulicybe gibba*, LF–*Lepista flaccida*, COC–*Coprinus comatus*, LN–*Lepista nuda*, LL–*Leucoagaricus leucothites*, CP–*Clitopilus prunulus*, AC–*Agrocybe cylindracea*, MP–*Macrolepiota procera*, PM–*Psathyrella multipedata*, CRC–*Craterellus cornucopioides*, LP–*Laetiporus sulphureus*, PP–*Psathyrella piluliformis*, AS–*Agaricus sylvicola*, s.t.–suha težina. Stupci prikazuju srednje vrijednosti biološkog triplikata i na njima označenu odgovarajuću standardnu devijaciju. Stupci označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju ($p < 0,05$).

Sadržaj fenolnih kiselina u ispitivanim uzorcima prikazan je na Slici 12. i kretao se u rasponu 0,733–6,336 mg ekvivalenta kavene kiseline (CAE)/g s.t. Najviši sadržaj pokazale su vrste *Psathyrella piluliformis* i *Craterellus cornucopioides*, dok su gotovo devet puta niže vrijednosti pokazale vrste *Lycoperdon perlatum* i *Pleurotus dryinus*.



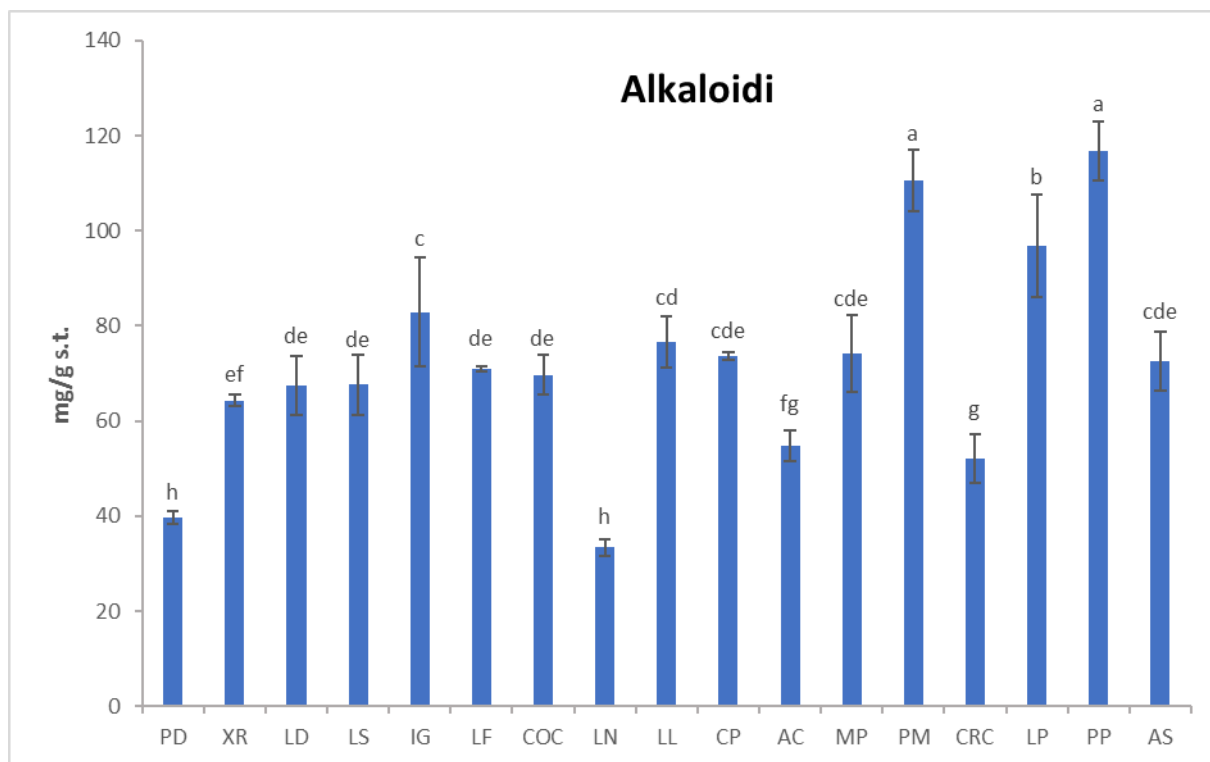
Slika 12. Sadržaj fenolnih kiselina u plodištima gljiva. PD–*Pleurotus dryinus*, XR–*Xerula radicata*, LD–*Lactarius deterrimus*, IG–*Infundibulicybe gibba*, LF–*Lepista flaccida*, COC–*Coprinus comatus*, LN–*Lepista nuda*, LL–*Leucoagaricus leucothites*, CP–*Clitopilus prunulus*, AC–*Agrocybe cylindracea*, MP–*Macrolepiota procera*, PM–*Psathyrella multipedata*, CRC–*Craterellus cornucopioides*, LP–*Laetiporus sulphureus*, PP–*Psathyrella piluliformis*, AS–*Agaricus sylvicola*, s.t.–suha težina. Stupci prikazuju srednje vrijednosti biološkog triplikata i na njima označenu odgovarajuću standardnu devijaciju. Stupci označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju ($p < 0,05$).

Količina triterpenoida u ispitivanim uzorcima plodišta gljiva prikazana je na Slici 13. i kretala se u rasponu 16,371–61,184 mg ekvivalenta ursolinske kiseline (UAE)/g s.t. Najveći sadržaj triterpenoida pokazala je vrsta *Psathyrella multipedata*, dok je najmanju količinu imala vrsta *Laetiporus sulphureus*.



Slika 13. Sadržaj triterpenoida u plodištima gljiva. PD–*Pleurotus dryinus*, XR–*Xerula radicata*, LD–*Lactarius deterrimus*, IG–*Infundibulicybe gibba*, LF–*Lepista flaccida*, COC–*Coprinus comatus*, LL–*Leucoagaricus leucothites*, CP–*Clitopilus prunulus*, AC–*Agrocybe cylindracea*, MP–*Macrolepiota procera*, PM–*Psathyrella multipedata*, CRC–*Craterellus cornucopioides*, LP–*Laetiporus sulphureus*, PP–*Psathyrella piluliformis*, AS–*Agaricus sylvicola*, s.t.–suha težina. Stupci prikazuju srednje vrijednosti biološkog triplikata i na njima označenu odgovarajuću standardnu devijaciju. Stupci označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju ($p < 0,05$).

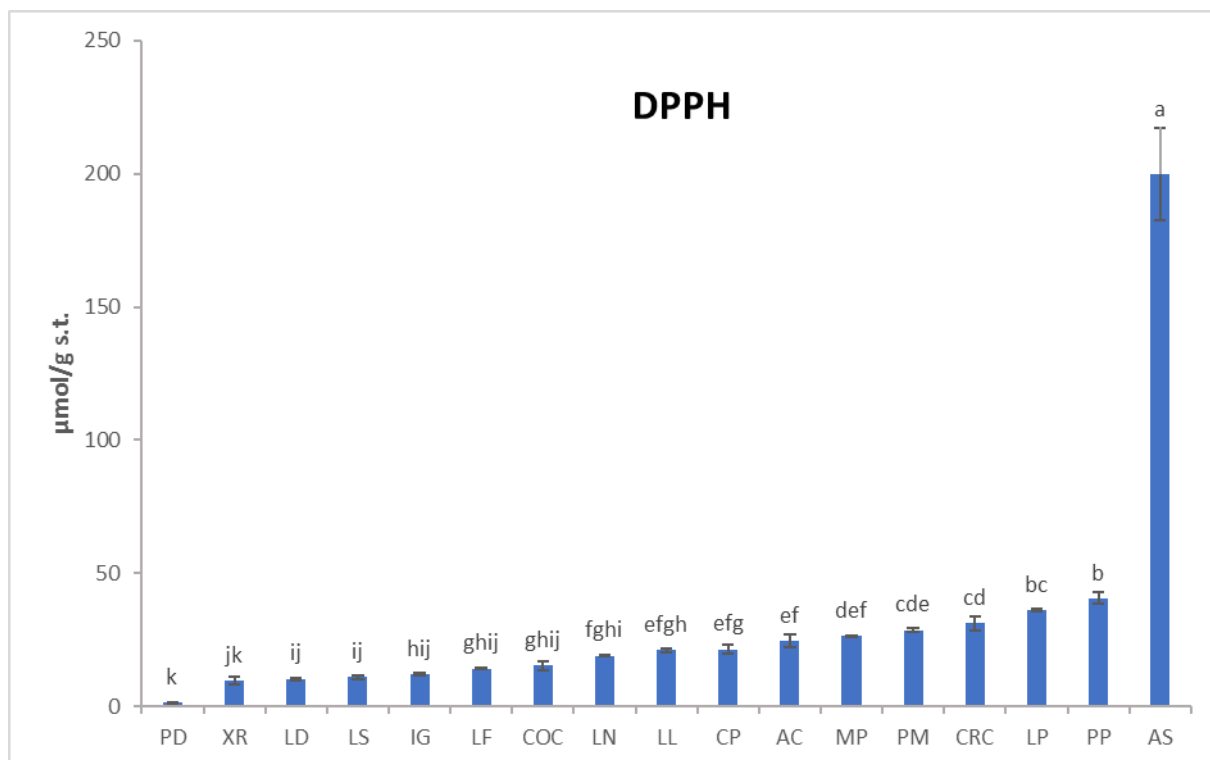
Sadržaj alkaloida u ispitivanim uzorcima plodišta gljiva prikazan je na Slici 14. te se kretao u rasponu 33,376–116,710 mg ekvivalenta boldina (BE)/g s.t. Najviše alkaloida sadržavala je vrsta *Psathyrella piluliformis*, dok je najmanju količinu imala vrsta *Lepista nuda*.



Slika 14. Sadržaj alkaloida u plodištima gljiva. PD–*Pleurotus dryinus*, XR–*Xerula radicata*, LD–*Lactarius deterrimus*, IG–*Infundibulicybe gibba*, LF–*Lepista flaccida*, COC–*Coprinus comatus*, LN–*Lepista nuda*, LL–*Leucoagaricus leucothites*, CP–*Clitopilus prunulus*, AC–*Agrocybe cylindracea*, MP–*Macrolepiota procera*, PM–*Psathyrella multipedata*, CRC–*Craterellus cornucopioides*, LP–*Laetiporus sulphureus*, PP–*Psathyrella piluliformis*, AS–*Agaricus sylvicola*, s.t.–suha težina. Stupci prikazuju srednje vrijednosti biološkog triplikata i na njima označenu odgovarajuću standardnu devijaciju. Stupci označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju ($p < 0,05$).

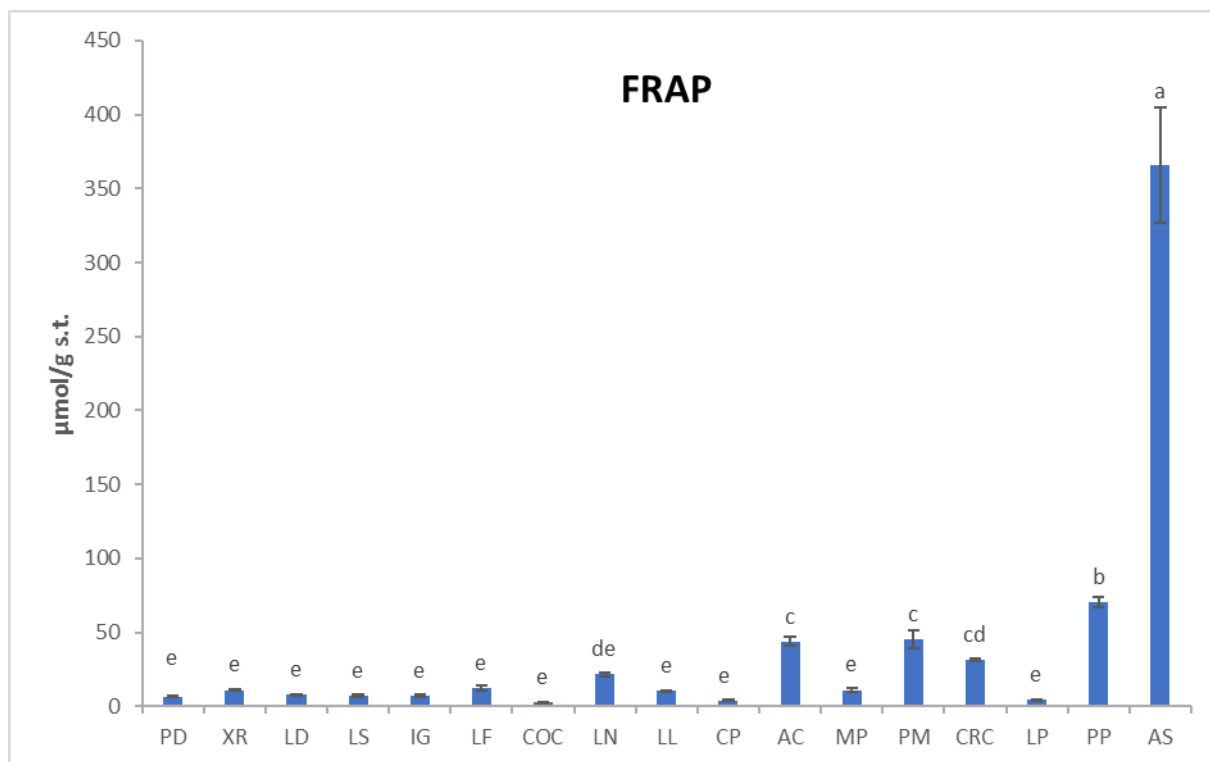
3.3. Antioksidacijska aktivnost

Antioksidacijska aktivnost utvrđena DPPH metodom prikazana je na Slici 15. Prosječna antioksidacijska aktivnost za sve ispitivane gljivlje vrste bila je 30,799 μmol ekvivalenta Troloxa (TE)/g s.t. Mnogo višu antioksidacijsku aktivnost u usporedbi s ostalim uzorcima imala je vrsta *Agaricus sylvicola* te je iznosila 199,698 μmol TE/g s.t., dok je aktivnost kod ostalih vrsta bila do 125 puta niža te se kretala od 1,587 μmol TE/g s.t. do 40,578 μmol TE/g s.t.



Slika 15. Antioksidacijska aktivnost plodišta gljiva određena DPPH metodom. PD–*Pleurotus dryinus*, XR–*Xerula radicata*, LD–*Lactarius deterrimus*, IG–*Infundibulicybe gibba*, LF–*Lepista flaccida*, COC–*Coprinus comatus*, LN–*Lepista nuda*, LL–*Leucoagaricus leucothites*, CP–*Clitopilus prunulus*, AC–*Agrocybe cylindracea*, MP–*Macrolepiota procera*, PM–*Psathyrella multipedata*, CRC–*Craterellus cornucopioides*, LP–*Laetiporus sulphureus*, PP–*Psathyrella piluliformis*, AS–*Agaricus sylvicola*, s.t.–suha težina. Stupci prikazuju srednje vrijednosti biološkog triplikata i na njima označenu odgovarajuću standardnu devijaciju. Stupci označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju ($p < 0,05$).

Antioksidacijska aktivnost utvrđena FRAP metodom prikazana je na Slici 16. i pokazuje sličan trend kao i antioksidacijska aktivnost utvrđena DPPH metodom. Prosječna antioksidacijska aktivnost za sve ispitivane gljivlje vrste bila je 38,887 $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g s.t.}$. Mnogo višu antioksidacijsku aktivnost u usporedbi s ostalim uzorcima imala je vrsta *Agaricus sylvicola* te je iznosila 365,773 $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g s.t.}$, dok je aktivnost kod ostalih vrsta bila do 145 puta niža te je bila u rasponu od 2,514 $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g s.t.}$ do 70,407 $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g s.t.}$



Slika 16. Antioksidacijska aktivnost plodišta gljiva određena FRAP metodom. PD–*Pleurotus dryinus*, XR–*Xerula radicata*, LD–*Lactarius deterrimus*, IG–*Infundibulicybe gibba*, LF–*Lepista flaccida*, COC–*Coprinus comatus*, LN–*Lepista nuda*, LL–*Leucoagaricus leucothites*, CP–*Clitopilus prunulus*, AC–*Agrocybe cylindracea*, MP–*Macrolepiota procera*, PM–*Psathyrella multipedata*, CRC–*Craterellus cornucopioides*, LP–*Laetiporus sulphureus*, PP–*Psathyrella piluliformis*, AS–*Agaricus sylvicola*, s.t.–suha težina. Stupci prikazuju srednje vrijednosti biološkog triplikata i na njima označenu odgovarajuću standardnu devijaciju. Stupci označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju ($p < 0,05$).

U svrhu određivanja korelacija između antioksidacijske aktivnosti mjerene različitim metodama te sadržaja specijaliziranih metabolita u ekstraktima izračunat je Pearsonov koeficijent korelacije i pripadajuće p vrijednosti (Tablica 2).

Tablica 2. Matriks Pearsonovog koeficijenta za antioksidacijske metode te izmjerene specijalizirane metabolite u ekstraktima plodišta gljiva. Crveno označene vrijednosti pokazuju značajnu korelaciju na razini značajnosti $p \leq 0,05$.

	DPPH	FRAP	Ukupni polifenoli	Fenolne kiseline	Triterpenoidi	Alkaloidi
DPPH						
FRAP	0,973193					
Ukupni polifenoli	0,941482	0,932731				
Fenolne kiseline	0,568379	0,599483	0,600906			
Triterpenoidi	0,005372	-0,012338	0,091897	0,356072		
Alkaloidi	0,077190	0,041507	0,099734	0,161939	0,526787	

Prema razini značajnosti ukupni polifenoli i fenolne kiseline pokazali su značajnu korelaciju s vrijednostima antioksidacijskih aktivnosti u plodištima gljiva. Antioksidacijska aktivnost mjerena DPPH metodom pokazuje vrlo jaku korelaciju s FRAP metodom. Vrlo visoki Pearsonov koeficijent izračunat je za ukupne polifenole i antioksidacijsku aktivnost mjerenu DPPH metodom (0,941482) te FRAP metodom (0,932731). Nešto niži, ali značajni koeficijent utvrđen je između fenolnih kiselina te antioksidacijske aktivnosti izmjerene DPPH (0,568379) i FRAP (0,599483) metodom. Također, utvrđena je statistički značajna korelacija između polifenola i fenolnih kiselina (0,600906). S druge strane, nije uočena korelacija vrijednosti alkaloida i triterpenoida s antioksidacijskom aktivnošću (neovisno o upotrijebljenoj metodi).

4. Rasprava

4.1. Proteini

Ovim istraživanjem nije uočena velika varijacija u sadržaju proteina u različitim vrstama. Vrste *Agaricus sylvicola*, *Coprinus comatus* i *Psathyrella multipedata* pokazale su nešto više vrijednosti, dok je najniža izmjerena kod vrste *Pleurotus dryinus*. Rezultati dobiveni ovim radom podržavaju činjenicu da su gljive dobar izvor nutritivno vrijednih proteina što je činjenica poznata u znanstvenoj literaturi (Kalač 2009, Ouzouni i sur. 2009, Beluhan i Ranogajec 2011, Heleno i sur. 2015). Velik broj istraživanja bio je usredotočen na nutritivan sastav plodišta gljiva te se njihovi rezultati u većini slučajeva odnose na sirove proteine u plodištima određene prema udjelu dušika Kjeldahlovom metodom (Barros i sur. 2007, Barros i sur. 2008, Colak i sur. 2009, Kalač 2009, Beluhan i Ranogajec 2011, Akata i sur. 2012). Zbog razlike u analitičkim metodama za određivanje proteina koje su korištene u istraživanjima u dostupnoj literaturi teško je izravno usporediti rezultate. Vrijednosti za sadržaj ukupnih proteina u prethodnim istraživanjima više su od rezultata dobivenih u ovom radu jer se određivanje sirovih proteina temelji na pretpostavci da dušik u hrani dolazi isključivo u obliku proteina, zanemarujući druge anorganske i organske spojeve koji sadrže dušik te ostale faktore o kojima ovisi sadržaj proteina (Moore i sur. 2010). Plodišta vrsta iz roda *Agaricus* češće su istraživana u literaturi i primijećene su velike varijacije u količinama ukupnih topivih proteina koje su iznosile 9 ± 1 mg/g s.t. i 73 ± 4 mg/g s.t. (Kozarski i sur. 2011) što odgovara rezultatima ovog rada. Nadalje, prema literaturnim podacima dostupni su i podaci o količini ukupnih topivih proteina u plodištu vrste *Laetiporus sulphureus* te iznose 51 ± 9 mg/g s.t. (Klaus i sur. 2012) što je više nego što su pokazali rezultati ovog istraživanja.

4.2. Specijalizirani metaboliti

4.2.1. Polifenolni spojevi

Polifenoli uključuju različite spojeve – flavonoide, fenolne kiseline, stilbene, lignane, tanine i oksidirane polifenole, sa značajnim strukturnim razlikama. Njihova ukupna količina često se određuje Folin-Ciocalteu metodom, no svakako je bolje koristiti nekoliko metoda paralelno i u čestoj je upotrebi tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC-a) s odgovarajućim detektorima za točnije određivanje sadržaja polifenola (Ferreira i sur. 2009).

Svi fenoli nastaju posredno iz fenilalanina ili bližeg prekursora šikiminske kiseline. U prirodi se rijetko javljaju kao slobodni spojevi te su češće u vezanom obliku s jednim ili više

šećera. Također, mogu biti vezani i s drugim spojevima poput karboksilnih i organskih kiselina, amina te lipida. Fenoli se mogu klasificirati u različite skupine prema broju aromatskih prstenova i strukturnim elementima koji vežu prstenove. Glavne skupine polifenola su fenolne kiseline, flavonoidi, stilbeni i lignani (Pandey i Rizvi 2009). Fenoli su pokazali brojna zaštitna djelovanja u biološkim sustavima i prema bioaktivnim ulogama mogu se podijeliti na inhibitore slobodnih radikala, razlagače peroksida, inaktivatore metala ili hvatače kisika (Palacios i sur. 2011). Imaju sposobnost sprječavanja negativnih učinaka ROS-a i reaktivnih oblika dušika što ih čini jakim antioksidansima (Öztürk i sur. 2015).

Ovo istraživanje pokazalo je kako vrsta *Agaricus sylvicola* ima mnogo veći sadržaj ukupnih fenola nego druge vrste, dok kod ostalih vrsta nisu postojale visoke varijacije. Prema literaturnim izvorima (Sulkowska-Ziaja i sur. 2012, Acharya i sur. 2015) vrijednosti ukupnih fenola u plodištu vrste *Laetiporus sulphureus* slažu se s rezultatima ovog rada. Također, rezultati istraživanja Klaus i sur. (2012) u kojemu su analizirani uzorci plodišta iste vrste pripremljeni ekstrakcijom u vrućoj vodi u skladu su s rezultatima ovog istraživanja. S druge strane, Petrović i sur. (2014) su, na temelju analize uzoraka plodišta iste vrste pripremljenih ekstrakcijom u vodenoj otopini metanola (80:20, v/v) uz upotrebu ultrazvučnih valova, zabilježili količinu ukupnih fenola u iznosu $200,4 \pm 23,2$ mg GAE/g s.t. što je mnogo više nego što je pokazalo ovo istraživanje ($3,037 \pm 0,358$ mg GAE/g s.t.).

Nadalje, rezultati sličnih istraživanja o sadržaju ukupnih fenola u plodištu vrste *Macrolepiota procera* u skladu su s rezultatima ovog rada (Witkowska i sur. 2011, Arora i sur. 2013). Čilerdžić i sur. (2015) izmjerili su količinu ukupnih fenola u plodištu gljive *Agrocybe cylindracea* što je viša vrijednost nego u ovom istraživanju. Moguće objašnjenje za razliku u rezultatima je drugi pristup pri ekstrakciji uzoraka. Uzorci plodišta su ekstrahirani u 96%-tnom etanolu tijekom 72 h na magnetskoj miješalici, centrifugirani te su nakon toga supernatanti filtrirani i upareni do krutog ekstrakta. Konačno su kruti ekstrakti ponovno otopljeni u 96%-tnom etanolu.

U plodištu vrste *Coprinus comatus* zabilježen je sadržaj ukupnih fenola 151,017 mg GAE/g s.t. (Stilinović i sur. 2014) što je mnogostruko više u usporedbi s rezultatima ovog rada. Razlika u rezultatima može se povezati s ekstrakcijskim postupkom. Uzorci plodišta su ekstrahirani u metanolu pomoću ekstraktora tijekom 5 h, upareni do krutog ekstrakta te čuvani u mraku pri 4 °C do daljnjih analiza. Količina ukupnih fenola zabilježena u plodištu gljive *Agaricus bisporus* (Smolskaite i sur. 2015) mnogo je manja nego u ovom istraživanju. Slična istraživanja (Witkowska i sur. 2011, Nowacka i sur. 2015, Kouassi i sur. 2016) izmjerila su vrijednosti sadržaja ukupnih fenola u plodištima gljivljih vrsta iz roda *Lactarius* koje se uglavnom slažu s rezultatima ovog istraživanja.

Prema literaturnim podacima (Smolskaite i sur. 2015), sadržaj ukupnih fenola u plodištu gljivlje vrste *Pleurotus ostreatus* bio je $5,32 \pm 0,98$ mg GAE/g s.t. što je više u usporedbi s rezultatima u okviru ovog rada. U drugim istraživanjima, na temelju ekstrakcije uzoraka plodišta iste vrste u etanolu, vrijednosti količine ukupnih fenola bitno su veće (Jayakumar i sur. 2009, Čilerdžić i sur. 2015) ili manje (Arora i sur. 2013) od onih dobivenih ovim istraživanjem. Uočene razlike u rezultatima mogu se objasniti različitim ekstrakcijskim postupkom. Primjerice,

Jayakumar i sur. (2009) uzorke osušenih plodišta gljiva uzgojenih u laboratoriju ekstrahirali su u 95%-tnom etanolu koristeći Soxhlet aparat, uparili ih pod sniženim tlakom i pri 50 °C, osušili ih u vakuumu te tako dobivene krute ekstrakte koristili u analizama. S druge strane, Arora i sur. (2013) su ekstrahirali uzorke vodenom otopinom etanola, dobivenom miješanjem vode i 70%-tnog etanola u omjeru 9:1, koristeći Soxhlet aparat tijekom 2-3 dana. Dobiveni ekstrakti su liofilizirani i čuvani na -20 °C do analiza.

Folin-Ciocalteu metoda je izrazito osjetljiva na monohidrične fenole, flavonoide i tanine, no kako reagens uz fenolne spojeve reagira i s drugim lako oksidirajućim spojevima poput šećera, askorbinske kiseline i aminokiselina dobivene vrijednosti sadržaja ukupnih fenola često mogu biti više (Barros i sur. 2009; Palacios i sur. 2011). Štoviše, fenoli koji imaju više vezanih hidroksilnih grupa očekivano će udvostručiti molarni doseg obojenja. Međutim, sterički učinci ili zamjene unutar aromatskog prstena mogu promijeniti očekivani odgovor pošto hidroksilne grupe nisu dostupne reagensu (Palacios i sur. 2011). Razlike u rezultatima dodatno se mogu povezati s podrijetlom gljiva i edafoklimatskim uvjetima te stresnim uvjetima poput UV zračenja, infekcija patogena i parazita, ozljeda, onečišćenja zraka i izloženosti ekstremnim temperaturama (Toledo 2016).

Fenolne kiseline se dijele na dvije osnovne grupe: hidroksibenzojeve i hidroksicimetne kiseline, nastale iz benzojeve odnosno cimetine kiseline, spojeva koji nisu fenolne strukture (Ferreira i sur. 2009). Derivati hidroksibenzojeve kiseline obično se pojavljuju u vezanom obliku kao tipične sastavnice složenih struktura poput lignina i hidrolizabilnih tanina. Također, u hrani biljnog podrijetla mogu biti prisutni kao derivati šećera ili organskih kiselina. S druge strane, derivati hidroksicimetne kiseline najčešće se javljaju u vezanom obliku, spojeni na strukturne sastavnice stanične stijenke kao što su celuloza, lignin i proteini, ili povezani s organskim kiselinama esterskim vezama (Liu i sur. 2004). Dosad je dokazana prisutnost brojnih fenolnih kiselina u plodištima gljiva među kojima su p-hidroksibenzojeva, protokatehinska, galna, vanilinska, siringinska, cimeta i kavena kiselina (Ferreira i sur. 2009).

Fenolne kiseline pripadaju grupi polifenolnih spojeva za koje su istraživanja pokazala da značajno utječu na biološku aktivnost gljiva (Ferreira i sur. 2009, Palacios i sur. 2011). U okviru ovog rada utvrđeno je kako su postojale varijacije u sadržaju fenolnih kiselina među vrstama te su vrste *Psathyrella piluliformis*, *Craterellus cornucopioides* i *Agaricus sylvicola* imale veće vrijednosti, dok je najmanji sadržaj zabilježen kod vrste *Pleurotus dryinus*. Zbog nedostupnosti podataka otežana je izravna usporedba dobivenih rezultata s rezultatima drugih autora. U velikom broju istraživanja antioksidacijskih svojstava plodišta gljiva upotrebom tekućinske kromatografije s odgovarajućim detektorom kvantitativno su određivane pojedine fenolne kiseline koje se javljaju u gljivama, no limitirana su istraživanja kojima je utvrđen sadržaj ukupnih fenolnih kiselina u plodištima gljiva.

4.2.2. Triterpenoidi

Triterpenoidi su članovi skupine izoprenoida derivirani iz C30 prekursora, skvalena. Sam skvalen nastaje iz dviju molekula farnezil difosfata, prekursora seskviterpena (Kushiro i Ebizuka 2010). Prvi razlikovni korak u biosintezi triterpenoida je ciklizacija 2,3-oksidoskvalena

katalizirana oksidosvalen ciklazom (OSC). Općenito, životinje i gljive imaju samo jednu OSC, lanosterol sintazu, za biosintezu sterola za razliku od biljaka koje ih imaju nekoliko (Ohyama i sur. 2009). Većinu terpenoida izoliranih iz gljiva čine triterpenoidi lanostanskog tipa (Öztürk i sur. 2015). Prijašnjim istraživanjima je dokazano kako prirodni triterpenoidi inhibiraju rast tumorskih stanica, potiču apoptozu te inhibiraju angiogenezu i metastazu (Salvador i sur. 2014). Nadalje, pokazalo se da ganodermadiol, lucidadiol i aplanoksidna kiselina G imaju izraženo antiviralno (Mothana i sur. 2003), ganoderična, lucidenična, ganodermična, ganoderenična, ganolucidična i aplanoksidne kiseline, kao i lucidoni, ganoderali i ganoderoli antikancerogeno (Li i sur. 2005), a astraodorične kiseline (A-D) antibakterijsko djelovanje (Arpha i sur. 2012).

Ovim istraživanjem nije dobivena visoka varijacija u sadržaju triterpenoida u različitim vrstama te su vrste *Psathyrella multipedata*, *Psathyrella piluliformis* i *Leucoagaricus leucothites* pokazale više vrijednosti, dok je najmanja količina izmjerena kod vrste *Laetiporus sulphureus*.

Sadržaj ukupnih triterpenoida u plodištima gljivljih vrsta analiziranih u ovom radu do sada nije istraživana. Prema rezultatima ovog rada, triterpenoidi su bili prisutni u svim ispitivanim vrstama dok su npr. Arora i sur. (2013) na temelju analize vodenih i etanolnih ekstrakata plodišta vrsta *Macrolepiota procera* i *Pleurotus ostreatus* zaključili kako terpenoidi nisu bili prisutni u tim vrstama gljiva.

Rezultat o sadržaju triterpenoida u uzorku plodišta vrste *Lepista nuda* (1/7291) nije naveden jer je došlo do pojave velikih odstupanja vrijednosti, pri čemu je mogući razlog interferencija vode, zaostale u uzorku prilikom njegove pripreme, tijekom reakcije i mjerenja apsorbancije.

4.2.3. Alkaloidi

Osim polifenolnih spojeva i triterpenoida, specijalizirani metaboliti s potencijalnom biološkom aktivnošću su i alkaloidi. U praksi pojam alkaloidi označava bazične spojeve koji sadrže više dušikovih atoma (obično u heterocikličnom prstenu). Prisutni su u biljkama (npr. atropin, morfin i kofein) i određuju se standardnim kvalitativnim testovima (Evans i Evans 2009). Za gljive je kao i za biljke uobičajeno da proizvode velik broj različitih alkaloida. Vjeruje se da alkaloidi imaju vrlo važnu ekološku ulogu jer osiguravaju obranu i interakciju s okolišem organizmu proizvođaču (O'Connor 2010). Gljive u svojim tkivima sintetiziraju strukturno različite tipove alkaloida: indolne alkaloidne, piridinske alkaloidne, hidrazinske alkaloidne, alkaloidne nukleozidnog tipa, muskarinske egzocikličke amine, alkaloidne betalainskog tipa i peptidne alkaloidne (Antkowiak i Antkowiak 1991). Alkaloidi reguliraju Na⁺ ione i kanale te mikrobnu aktivnost, imaju stimulativno djelovanje te potiču imunogenetsku staničnu smrt. Također, poznato je da inhibiraju angiogenezu te su zato korisni u sprječavanju rasta tumorskih stanica (Aniszewski 2015). S farmaceutskog i industrijskog stajališta, alkaloidi su vjerojatno najvažniji metaboliti gljiva (Wieczorek i sur. 2015).

Prema dobivenim rezultatima, vrste *Psathyrella piluliformis*, *Psathyrella multipedata* i *Lycoperdon perlatum* pokazale su najviše vrijednosti, dok je najmanji sadržaj zabilježen u plodištu vrste *Lepista nuda*.

Istraživanja o sadržaju ukupnih alkaloida u plodištima samoniklih gljiva prilično su limitirana pa nije bila moguća izravna usporedba rezultata u okviru ovog rada s literaturnim podacima. Ipak, Arora i sur. (2013) su, na temelju analize vodenih i etanolnih ekstrakata, utvrdili da su alkaloidi prisutni u plodištima vrsta *Macrolepiota procera* i *Pleurotus ostreatus*. Također, utvrđeno je da i plodište vrste *Agaricus bisporus* sadrži alkaloidne (Dhamodharan i Mirunalini 2013). Nadalje, u plodištima vrsta iz roda *Macrolepiota* određen je sadržaj alkaloida koji se kretao u rasponu 0,048–0,103 mg/g s.t. (Kumari i Atri 2014) što je niže od vrijednosti dobivenih u okviru ovog rada. Plodišta vrste *Podaxis pistillaris* iz porodice *Agaricaceae* sakupljena na području Indije (Mridu i Atri 2017) imala su sadržaj ukupnih alkaloida u iznosu $0,85 \pm 0,12$ g/100g s.t. što je u prosjeku dvadesetak puta manje od vrijednosti ($134,936 \pm 8,040$ do $205,665 \pm 16,218$ mg BE/g s.t.) izmjerenih u okviru ovog rada za vrste *Agaricus sylvicola*, *Coprinus comatus*, *Leucoagaricus leucothites*, *Lycoperdon perlatum* i *Macrolepiota procera* koje pripadaju istoj porodici. Ovako velike razlike mogu se pripisati prilično velikoj genetskoj razlici između promatranih vrsta, ali i bitno različitom geografskom i klimatskom području (Indija) iz kojeg potječu uzorci gljiva. Također, razlike u izmjerenim vrijednostima mogu biti i zbog različitog pristupa u pripremi, ekstrakciji uzoraka plodišta te analitičkoj metodi za određivanje ukupnih alkaloida.

Prema rezultatima drugog istraživanja (Unekwu i sur. 2014), sadržaj ukupnih alkaloida u plodištima vrsta *Lactarius deliciosus*, *Pleurotus ostreatus* i *P. pulmonarius* iznosio je $52,99 \pm 0,07$, $81,51 \pm 0,73$ i $46,90 \pm 0,73$ $\mu\text{g/g}$ što su bitno manje vrijednosti od onih za vrste *L. deterrimus* i *P. dryinus* dobivenih u okviru ovog rada. Ovdje se radi o različitim vrstama iz istih rodova pa se i rezultati stoga razlikuju, ali korišten je i drugačiji pristup pri ekstrakciji. Plodišta su prvo osušena na zraku i usitnjena te ekstrahirana u metanolu refluksom tijekom dva sata. Potom su ekstrakti filtrirani i upareni u rotacijskom uparivaču. Konačno, polusuhi ekstrakti uskladišteni su u hladnjaku do daljnjih analiza.

Metoda korištena u ovom radu dosad nije bila primjenjivana za određivanje ukupnih alkaloida u gljivama.

4.3. Antioksidacijska aktivnost

DPPH radikal ($\text{C}_{18}\text{H}_{12}\text{N}_5\text{O}_6$, $M=394,33$) je stabilni slobodni radikal pri sobnoj temperaturi koji prima vodikove radikale i postaje stabilna diamagnetična molekula (Kedare i Singh 2011, Arora i sur. 2013). DPPH je hidrofoban radikal pa se njegove reakcije nužno moraju odvijati u organskim otapalima (Schaich i sur. 2015). Prisutnost slobodnog elektrona koji se delokalizira po molekuli DPPH sprječava dimerizaciju radikala te mu daje tamnoljubičastu boju (Kedare i Singh 2011). Reakcijom s drugim radikalima, elektronima ili vodikovim atomima dolazi do obezbojenja reakcijske otopine uz apsorpcijski maksimum pri 515 nm (Schaich i sur. 2015).

Ovo istraživanje pokazalo je kako vrsta *Agaricus sylvicola* ima mnogo veću antioksidacijsku aktivnost nego druge analizirane vrste, dok se kod ostalih vrsta vrijednosti antioksidacijske aktivnosti uglavnom nisu međusobno bitno razlikovale.

Smolskaite i sur. (2015) zabilježili su antioksidacijsku aktivnost $0,13 \pm 0,03$ $\mu\text{mol TE/g s.t.}$ u plodištu vrste *Agaricus bisporus* što je mnogo niža vrijednost u usporedbi s rezultatima ovog

istraživanja za vrstu *Agaricus sylvicola*. Osim činjenice da se ovdje radi o različitim, ali srodnim vrstama roda *Agaricus*, razlog ovim razlikama može biti to što su uzorci plodišta ekstrahirani u cikloheksanu, diklorometanu i metanolu i upareni u rotacijskom vakuum uparivaču do krutog ekstrakta, dok su ostaci ekstrahirani u kipućoj vodi te su dobiveni vodeni ekstrakti liofilizirani. Nadalje, Smolskaite i sur. (2015) navode kako je plodište vrste *Pleurotus ostreatus* imalo antioksidacijsku aktivnost u iznosu $0,74 \pm 0,21 \mu\text{mol TE/g s.t.}$, što je otprilike dvostruko manje od aktivnosti ($1,587 \pm 0,03 \mu\text{mol TE/g s.t.}$) izmjerene za vrstu *P. dryinus* u okviru ovog rada.

Kako bismo dobili što točnije rezultate o antioksidacijskoj aktivnosti, uz DPPH metodu koristili smo i FRAP metodu. U literaturi najčešća je praksa da se koristi nekoliko metoda istovremeno (Piljac-Žegarac i sur. 2011, Witkowska i sur. 2011, Petrović i sur. 2014, Sharma i Gautam 2015, Yahia i sur. 2017). FRAP metoda se temelji na nespecifičnoj reakciji, pri čemu će svaka polureakcija s manje pozitivnim redoks potencijalom od $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ -TPTZ polureakcije u reakcijskim uvjetima potaknuti redukciju Fe^{3+} -TPTZ-a. Tijekom reakcije troše se suvišni Fe^{3+} ioni, a limitirajući faktor za Fe^{2+} -TPTZ, a time i pojavu plavog obojenja, je redukcijska sposobnost biološkog uzorka (Benzie i Strain 1999).

Rezultati mjerenja antioksidacijske aktivnosti FRAP metodom ovog istraživanja pokazali su sličan trend kao i kod DPPH metode i činjenicu da vrsta *Agaricus sylvicola* ima mnogo veću antioksidacijsku aktivnost od drugih ispitivanih vrsta, dok kod ostalih vrsta nije postojala jako visoka varijacija u vrijednostima antioksidacijske aktivnosti.

U prethodnim istraživanjima na plodištima gljivljih vrsta *Agaricus sylvicola* i *Lepista nuda* zabilježena je antioksidacijska aktivnost u odgovarajućem iznosu $1,41 \pm 0,00$ i $1,36 \pm 0,0$ $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g s.t.}$ (Sharma i Gautam 2015) što su manje vrijednosti u usporedbi s rezultatima ovog rada. S druge strane, plodišta vrsta *Lactarius deliciosus* (iz iste sekcije kao i analizirana *L. deterrimus*) i *Macrolepiota procera* pokazala su antioksidacijsku aktivnost $21,9 \pm 1,9$ i $41,4 \pm 3,6$ $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g s.t.}$ (Witkowska i sur. 2011) što su više vrijednosti u usporedbi s rezultatima ovog istraživanja. Razlog tome može biti što su plodišta ekstrahirana u metanolu, a potom su ostaci dodatno ekstrahirani mješavinom vode i acetona (CH_3COCH_3), te su naposljetku metanolni i acetonski ekstrakti pomiješani i takvi ekstrakti korišteni su u analizi. Drugi razlog je da su navedene vrste rasle u drugačijim klimatskim uvjetima, a okolišni čimbenici snažno utječu na sintezu specijaliziranih metabolita i posljedično na antioksidacijsku aktivnost.

Rezultati provedenog istraživanja slijede trend da je kod vrste *Agaricus sylvicola*, koja je pokazala visok sadržaj ukupnih polifenola, izmjerena i najviša antioksidacijska aktivnost te možemo zaključiti da polifenoli snažno doprinose antioksidacijskoj aktivnosti plodišta gljiva. Ta je činjenica poznata u literaturi za plodišta različitih vrsta gljiva (Mau i sur. 2002, Lee i Jang 2004, Elmastas i sur. 2007, Barros i sur. 2009, Piljac-Žegarac i sur. 2011). Jedino istraživanje antioksidacijske aktivnosti plodišta gljiva na uzorcima iz Hrvatske proveli su Piljac-Žegarac i sur. (2011). Oni su zaključili kako su vodeni ekstrakti plodišta samoniklih vrsta *Auricularia auricula-judae*, *Sarcoscypha austriaca* i *Strobilurus esculentus* te uzgojenih vrsta *Agaricus bisporus* (smeđi i bijeli oblik), *Pleurotus ostreatus* i *Lentinus edodes* imali u prosjeku 5,8 puta veći sadržaj ukupnih polifenola nego metanolni ekstrakti. Također, vodeni ekstrakti posljedično su imali i

veću antioksidacijsku aktivnost. Taj je zaključak donesen na temelju viših vrijednosti dobivenih FRAP metodom i nižih vrijednosti EC₅₀ dobivenih DPPH metodom.

U ovom diplomskom radu nije dodatno provedena analiza pojedinih fenolnih spojeva i drugih spojeva u gljivama, pa nije bilo moguće precizno odrediti pojedine polifenolne spojeve koji doprinose antioksidacijskoj aktivnosti. Iako se u starijoj literaturi spominju i flavonoidi kao specijalizirani metaboliti u gljivama koji pridonose antioksidacijskoj aktivnosti, novija literatura je skeptična prema toj činjenici jer je u radu objavljenom od Gil-Ramírez i sur. (2016) dovedeno u pitanje mogućnost sinteze flavonoida u gljivama zbog nepostojanja potrebnih gena.

Iako se plodišta raznih vrsta gljiva koriste u kulinarstvu i tradicionalnoj medicini, sastav njihovih bioaktivnih komponenata još uvijek nije dovoljno istražen te se zbog važnosti navedene problematike očekuje da će u narednim godinama biti ostvaren značajan napredak u tom području istraživanja.

4.4. Korelacije

Korelacija govori o sukladnosti dviju varijabli. Korelacija se brojčano iskazuje koeficijentom korelacije čije se vrijednosti kreću u rasponu od -1 do $+1$. Predznak koeficijenta korelacije (+ ili $-$) ukazuje na smjer povezanosti. Koeficijent korelacije pokazuje u kojoj su mjeri promjene vrijednosti jedne varijable povezane s promjenama vrijednosti druge varijable. U ovom radu korišten je Pearsonov koeficijent korelacije (Udovičić i sur. 2007). Prema Evansu (1996) ako je koeficijent korelacije r između $0,00-0,19$ radi se o jako slaboj korelaciji, od $0,20-0,39$ slaboj korelaciji, od $0,40-0,59$ umjerenoj korelaciji, od $0,60-0,79$ jakoj korelaciji i od $0,80-1,00$ o vrlo jakoj korelaciji.

Služeći se Evansovim (1996) tumačenjem korelacija, antioksidacijska aktivnost (neovisno o metodi) pokazuje vrlo jaku korelaciju sa sadržajem polifenola te jaku korelaciju sa sadržajem fenolnih kiselina. Nadalje, vrijednost Pearsonovog koeficijenta korelacije ukupnih polifenola i fenolnih kiselina ($0,600906$) ukazuje na to da fenolne kiseline čine značajan udio u sastavu ukupnih polifenola. S druge strane, jako slaba korelacija vrijednosti alkaloida i triterpenoida s antioksidacijskom aktivnošću ukazuje da ti metaboliti ne doprinose bioaktivnom potencijalu istraživanih gljiva.

Nowacka i sur. 2014 uočili su umjerenu negativnu korelaciju ($-0,536$) između ukupnih polifenola i antioksidacijske aktivnosti prema DPPH metodi u plodištima 19 vrsta samoniklih jestivih gljiva, uključujući vrste *Infundibulicybe gibba*, *Craterellus cornucopioides*, *Laetiporus sulphureus*, *Lycoperdon perlatum* i *Macrolepiota procera*. Takvi rezultati upućuju na zaključak da su drugi spojevi odgovorni za bioaktivni potencijal istraživanih plodišta gljiva.

S druge strane, Puttaraju i sur. (2006) zabilježili su vrlo jaku ($0,922$) korelaciju vrijednosti ukupnih polifenola i antioksidacijske snage određene DPPH metodom, testom inhibicije peroksidacije lipida i testom redukcijske snage u plodištima 23 vrsta gljiva, uključujući vrstu *Macrolepiota procera*, dvije vrste roda *Lactarius* te dvije vrste roda *Pleurotus*. Navedeni rezultati ukazuju na to da su polifenoli spojevi koji ponajviše doprinose bioaktivnom potencijalu plodišta gljiva što je u skladu s rezultatima ovoga istraživanja.

5. Zaključak

U ovom radu provedeno je istraživanje bioaktivnog potencijala u ekstraktima svježih plodišta 17 vrsta samoniklih jestivih gljiva sakupljenih na području Hrvatske. Analizirane su količine ukupnih membranskih proteina, fenolnih kiselina, ukupnih polifenola, triterpenoida i alkaloida te antioksidacijski kapacitet (metodama DPPH i FRAP). Posebno se ističe vrsta *Agaricus sylvicola* čija plodišta sadrže veće količine fenolnih spojeva i imaju najmanje peterostruko veću antioksidacijsku aktivnost u usporedbi s ostalim istraživanim vrstama. Stoga je prilikom budućih istraživanja potrebno posebnu pažnju posvetiti ovoj vrsti, kao i vrstama iz istog roda gljiva (*Agaricus*) koje su genetički slične što bi moglo ukazivati na to da se i u tim vrstama nalaze potencijalno vrijedne bioaktivne tvari. Nadalje, prema velikoj količini ukupnih topivih proteina ističu se plodišta *Agaricus sylvicola* i *Coprinus comatus*. Također, uočeno je kako plodišta vrsta *Psathyrella multipedata* i *Psathyrella piluliformis* imaju visok sadržaj triterpenoida i alkaloida za koje je utvrđeno da ne sudjeluju u bioaktivnom potencijalu plodišta gljiva. Ustanovljeno je da polifenolni spojevi, uključujući fenolne kiseline, najviše doprinose bioaktivnom potencijalu plodišta gljiva. Na temelju rezultata analize moguće je zaključiti kako ispitivane gljivlje vrste u svojim plodištima sadrže različite specijalizirane metabolite te stoga posjeduju značajnu razinu bioaktivnog potencijala koju bi u budućnosti trebalo dodatno istražiti. Bioaktivne tvari u plodištima gljiva s makroskopskim plodištima prilično su slabo istražene, kako u svjetskim, tako i u hrvatskim razmjerima što je i razumljivo s obzirom na veliku bioraznolikost vrsta. Stoga je potrebno povećati napore u istraživanju bioaktivnih tvari u gljivama jer u takvom tipu istraživanja postoji veliki potencijal koji bi mogao rezultirati vrijednim spoznajama s primjenom u različitim poljima ljudskog djelovanja (medicina, nutricionizam, biotehnologija).

6. Literatura

Acharya, K., Ghosh, S., Khatua, S., Mitra, P. (2015): Pharmacognostic standardization and antioxidant capacity of an edible mushroom *Laetiporus sulphureus*. *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit* **11(1)**: 33–42.

Akata, I., Ergönül, B., Kalyoncu, F. (2012): Chemical compositions and antioxidant activities of 16 wild edible mushroom species grown in Anatolia. *Int. J. Pharm.* **8(2)**: 134–138.

Aniszewski, T. (2015): *Alkaloids: Chemistry, Biology, Ecology and Applications*, Elsevier, 2nd edition.

Antkowiak, R., Antkowiak, W. Z. (1991): *Alkaloids from mushrooms*, Volume 40. str. 189–340. U: Brossi, A. (ur.) *The Alkaloids*. Academic Press, New York.

Arora, S., Goyal, S., Balani, J., Tandon, S. (2013): Enhanced antiproliferative effects of aqueous extracts of some medicinal mushrooms on colon cancer cells. *International Journal of Medicinal Mushrooms* **15(3)**: 301–314.

Arpha, K., Phosri, C., Suwannasai, N., Mongkolthananuk, W., Sodngam, S. (2012): Astraodoric Acids A–D: New Lanostane Triterpenes from Edible Mushroom *Astraeus odoratus* and Their Anti-*Mycobacterium tuberculosis* H₃₇Ra and Cytotoxic Activity. *J. Agric. Food Chem.* **60(39)**: 9834–9841.

Azmir, J., Zaidul, I. S. M., Rahman, M. M., Sharif, K. M., Mohamed, A., Sahena, F., Ghafoor, K., Norulaini, N. A. N., Omar, A. K. M., Jahurul, M. H. A. (2013): *Journal of Food Engineering* **117**: 426–436.

Barros, L., Baptista, P., Correia, D. M., Sá Morais, J., Ferreira, I. C. F. R. (2007): Effects of conservation treatment and cooking on the chemical composition and antioxidant activity of Portuguese wild edible mushrooms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **55(12)**: 4781–4788.

Barros, L., Venturini, B. A., Baptista, P., Estevinho, L. M., Ferreira, I. C. F. R. (2008): Chemical composition and biological properties of Portuguese wild mushrooms: A comprehensive study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **56(10)**: 3856–3862.

Barros, L., Dueñas, M., Ferreira, I.C.F.R., Baptista, P., Santos-Buelga, C. (2009) Phenolic acids determination by HPLC-DAD-ESI/MS in sixteen different Portuguese wild mushrooms species. *Food Chem. Toxicol.*, **47**: 1076–1079.

Bas, C., Kuyper, T. W., Noordeloos, M. E., Vellinga, E. C., ured. (1988): *Flora agaricina neerlandica*. 1. – A. A. Balkema, Rotterdam, Brookfield.

Bas, C., Kuyper, T. W., Noordeloos, M. E., Vellinga, E. C., ured. (1990): *Flora agaricina neerlandica*. 2. A. A. Balkema, Rotterdam, Brookfield.

- Bas, C., Kuyper, T. W., Noordeloos, M. E., Vellinga, E. C., ured. (1995): Flora agaricina neerlandica. 3. – A. A. Balkema, Rotterdam, Brookfield.
- Beluhan, S., Ranogajec, A. (2011): Chemical composition and non-volatile components of Croatian wild edible mushrooms. *Food Chemistry* **124**(3): 1076–1082.
- Benzie, I. F. F., Strain, J. J. (1999): Ferric reducing/antioxidant power assay: Direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. *Method Enzymol.* **299**: 15–27.
- Bogunović, M., Vidaček, Ž., Racz, Z., Husnjak, S., Sraka, M. (1997): Namjenska pedološka karta Republike Hrvatske i njena uporaba. *Agronomski glasnik*, 5-6/1997.
- Brady, P. N., Macnaughtan, M. A. (2015): Evaluation of colorimetric assays for analyzing reductively methylated proteins: Biases and mechanistic insights. *Anal Biochem.* **491**: 43–51.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., Berset, C. (1995): Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.* **28**: 25–30.
- Breitenbach, J., Kränzlin, F. (1986): Fungi of Switzerland, Volume 2 Non-gilled fungi. Verlag Mykologia, Luzern.
- Breitenbach, J., Kränzlin, F. (1991a): Fungi of Switzerland, Volume 3 Boletes and agarics 1st part. Mykologia Lucerne, Luzern.
- Breitenbach, J., Kränzlin, F. (1991b): Fungi of Switzerland, Volume 4 Agarics 2nd part. Mykologia Lucerne, Luzern.
- Chang, C. L., Lin, C. S., Lai, G. H. (2012): Phytochemical Characteristics, Free Radical Scavenging Activities, and Neuroprotection of Five Medicinal Plant Extracts. *Evid Based Complement Alternat Med.* **2012**: 1–8.
- Ćilerdžić, J., Stajić, M., Vukojević, J., Milovanović, I., Muzgonja, N. (2015): Antioxidant and antifungal potential of *Pleurotus ostreatus* and *Agrocybe cylindracea* basidiocarps and mycelia. *Current Pharmaceutical Biotechnology* **16**(2): 179–186.
- Colak, A., Faiz, Ö., Sesli, E. (2009): Nutritional composition of some wild edible mushrooms. *Turkish Journal of Biochemistry* **34**(1): 25–31.
- Dhamodharan, G., Mirunalini, S. (2013): A detail study of phytochemical screening, antioxidant potential and acute toxicity of *Agaricus bisporus* extract and its chitosan loaded nanoparticles. *Journal of Pharmacy Research* **6**(8): 818–822.
- Dutta, S. (2015): Role of mushrooms as a reservoir of potentially active natural antioxidants: An overview. str. 282–293. U: Dubey, N. K. (ur.) *Plants as a source of natural antioxidants*. CABI, Wallingford.
- Elmastas, M., Isaldak, O., Turkecul, I., Temur, N. (2007): Determination of antioxidant activity and antioxidant compounds in wild edible mushrooms. *J Food Compos Anal* **20**: 337–344.

- European Pharmacopoeia (2004). 4th ed. Council of Europe, Strasbourg. str. 2377–2378.
- Evans, J. D. (1996): Straightforward statistics for the behavioural sciences. Brooks/Cole Publishing, Pacific Grove.
- Evans, W. C., Evans, D. (2009): Alkaloids. U: Trease and Evans' Pharmacognosy (Sixteenth Edition), W.B. Saunders, str. 353–415.
- Ferreira, I. C. F. R., Baptista, P., Vilas-Boas, M., Barros, L. (2007): Free-radical scavenging capacity and reducing power of wild edible mushrooms from northeast Portugal: Individual cap and stipe activity. *Food Chem.* **100**: 511–1516.
- Ferreira, I. C., Barros, L., Abreu, R. M. (2009): Antioxidants in Wild Mushrooms. *Curr Med Chem.* **16(12)**: 1543–1560.
- Friedman, M. (2016): Mushroom Polysaccharides: Chemistry and Antiobesity, Antidiabetes, Anticancer, and Antibiotic Properties in Cells, Rodents, and Humans. *Foods* **5(4)**: 80.
- Froufe, H. J., Abreu, R. M., Ferreira, I. C. F. R. (2009): A QCAR model for predicting antioxidant activity of wild mushrooms. *SAR QSAR Environ Res.* **20 (5–6)**: 579–590.
- Gilgun-Sherki, Y., Rosenbaum, Z., Melamed, E., Offen, D. (2002): Antioxidant therapy in acute central nervous system injury: current state. *Pharmacological Reviews* **54**: 271–284.
- Gil-Ramírez, A., Pavo-Caballero, C., Baeza, E., Baenas, N., Garcia-Viguera, C., Marín, F. R., Soler-Rivas, C. (2016): Mushrooms do not contain flavonoids. *Journal of Functional Foods* **25**: 1–13.
- Hamid, A. A., Aiyelaagbe, O. O., Usman, L. A., Ameen, O. M., Lawal, A. (2010): Antioxidants: its medicinal and pharmacological applications. *African Journal of Pure and Applied Chemistry* **4**: 142–151.
- Hansen, L., Knudsen, H., ured. (1997): Nordic Macromycetes. 3. Heterobasidioid, Aphylophoroid and Gasteromycetoid Basidiomycetes. Nordsvamp, Copenhagen.
- Hawksworth, D. L., Lücking, R. (2017): Fungal diversity revisited: 2.2 to 3.8 million species. *Microbiol Spectrum* **5(4)**: FUNK-0052-2016.
- Hayes, W. A., Mills, D. S., Neville, R. F., Kiddie, J., Collins, L. M. (2011): Determination of the molar extinction coefficient for the ferric reducing/antioxidant power assay. *Analytical Biochemistry* **416**: 202–205.
- Heilmann-Clausen, J., Verbeken, A., Vesterholt, J. (1998): The genus *Lactarius*. Fungi of Northern Europe 2. Jacob Heilmann-Clausen, Annemieke Verbeken, Jan Vesterholt & The Danish Mycological Society, Oddense.
- Heleno, S. A., Ferreira, R. C., Antonio, A. L., Queiroz, M.-J. R. P., Barros, L., Ferreira, I. C. F. R. (2015): Nutritional value, bioactive compounds and antioxidant properties of three edible mushrooms from Poland. *Food Bioscience* **11**: 48–55.

- Hibbett, D., Abarenkov, K., Kõljalg, U., Öpik, M., Chai, B., Cole, J., Wang, Q., Crous, P., Robert, V., Helgason, T., Herr, J. R., Kirk, P., Lueschow, S., O'Donnell, K., Nilsson, R. H., Oono, R., Schoch, C., Smyth, C., Walker, D. M., Porras-Alfaro, A., Taylor, J. W., Geiser, D. M. (2016): Sequence-based classification and identification of Fungi. *Mycologia*, **108**:6, 1049–1068
- Hossain, M. A., Shah, M. D., Gnanaraj, C., Iqbal, M. (2011): In vitro total phenolics, flavonoids contents and antioxidant activity of essential oil, various organic extracts from the leaves of tropical medicinal plant *Tetrastigma* from Sabah. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* **4**: 717–721.
- Jayakumar, T., Thomas, P. A., Geraldine, P. (2009): In-vitro antioxidant activities of an ethanolic extract of the oyster mushroom, *Pleurotus ostreatus*. *Innovat. Food Sci. Emerg. Technol.*, **10**: 228–234.
- Kalač, P. (2009): Chemical composition and nutritional value of European species of wild growing mushrooms: A review. *Food Chemistry* **113**: 9–16.
- Karaman, M., Jovin, E., Malbaša, R., Matavuly, M., Popović, M. (2010): Medicinal and edible lignicolous fungi as natural sources of antioxidative and antibacterial agents. *Phytother. Res.* **24**(10): 1473–1481.
- Kedare, S. B., Singh, R. P. (2011): Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *J Food Sci Technol.* **48**(4): 412–422.
- Keleş, A. Koca, I., Gençlepe, H. (2011): Antioxidant properties of wild edible mushrooms. *Journal of Food Processing Technology* **2**:6. Dostupno na: <http://omicsonline.org/2157-7110/2157-7110-2-130.digital/fscommand/2157-7110-2-130.pdf> (pristupljeno 21 srpnja 2017).
- Kits van Waveren, E. (1985): The Dutch, French and British species of *Psathyrella*. *Persoonia*, Suppl. 2. Rijksherbarium, Leiden.
- Klaus, A., Kozarski, M., Nikšić, M., Jakovljević, D., Todorović, N., Stefanoska, I., Van Griensven, L. J. L. D. (2012): The edible mushroom *Laetiporus sulphureus* as potential source of natural antioxidants. *International Journal of Food Sciences and Nutrition* **64**(5): 599–610.
- Knudsen, H., Vesterholt, J., ured. (2012): *Funga Nordica: Agaricoid, Boletoid, Clavarioid, Cyphelloid, and Gastroid Genera*. Nordsvamp, Copenhagen.
- Kouassi, K. A., Kouadio, E. J. P., Kouassi, H. K., Dué, A. E., Kouamé, L. P. (2016): Phenolic compounds, organic acid and antioxidant activity of *Lactarius subsericatus*, *Cantharellus platyphyllus* and *Amanita rubescens*, three edible ectomycorrhizal mushrooms from center of Côte d'Ivoire. *Eurasian Journal of Analytical Chemistry* **11**(3): 127–139.
- Kozarski, M., Klaus, A., Nikšić, M., Jakovljević, 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**: 1667–1675.

- Kränzlin, F. (1991): Fungi of Switzerland, Volume 6 Russulaceae. Verlag Mykologia Luzern, Luzern.
- Kumari, B., Atri, N. S. (2014): Nutritional and nutraceutical potential of wild edible macrolepiotoid mushrooms of North India. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. **6**: 200–204.
- Kushiro, T., Ebizuka, Y. (2010): Triterpenes, Volume 1: Natural Products Structural Diversity-I Secondary Metabolites: Organization and Biosynthesis. U: Mander, L., Liu, H.-W. (ur.) *Comprehensive Natural Products II*, Elsevier, Oxford, str. 673–708
- Lee, E. J., Jang, H. D. (2004): Antioxidant activity and protective effect of five edible mushrooms on oxidative DNA damage. *Food science and biotechnology*. **13**: 443–449.
- Li, C. H., Chen, P. Y., Chang, U. M., Kan, L. S., Fanga, T. W. H., Tsai, K. S., Lin, S. B. (2005): Ganoderic acid X, a lanostanoid triterpene, inhibits topoisomerases and induces apoptosis of cancer cells. *Life Sci*. **77**: 252–265.
- Liu, R. H. (2004): Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action. *J. Nutr*. **134**: 3479S–3485S.
- Llarena-Hernández, R. C., Renouf, E., Vitrac, X., Mérillon, J.-M., Savoie, J.-M. (2017): Antioxidant activities and metabolites in edible fungi, a focus on the almond mushroom *Agaricus subrufescens*. str. 739–760. U: Mérillon, J.-M., Ramawat, K. G. (ur.) *Fungal Metabolites*. Springer International Publishing AG, Cham.
- Maestri, D. M., Nepote, V., Lamarque, A. L., Zygadlo, J. A. (2006): Natural products as antioxidants. U: Imperato, F. (ed.) *Phytochemistry: Advances in Research*. Research Signpost, Trivandrum, India, str. 105–135.
- Mallavadhani, U., Sudhakar, A., Sathyanarayana, K. V. S., Mahapatra, A., Li, W., Richard, B. (2006): Chemical and analytical screening of some edible mushrooms. *Food Chemistry* **95**: 58–64.
- Masella, R., Di Benedetto, R., Vari, R., Filesi, C., Giovannini, C. (2005): Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. *Journal of Nutritional Biochemistry* **16**, 577–586.
- Mau, J. L., Lin, H. C., Song, S. F. (2002): Antioxidant properties of several specialty mushrooms. *Food Res Int* **35**: 519–526.
- Moore, J. C., DeVries, J. W., Lipp, M., Griffiths, J. C., Abernethy, D. R. (2010): Total Protein Methods and Their Potential Utility to Reduce the Risk of Food Protein Adulteration. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* **9**: 330–357.
- Morgado, L. N., Noordeloos, M. E., Hausknecht, A. (2016): *Clitopilus reticulosporus*, a new species with unique spore ornamentation, its phylogenetic affinities and implications on the spore evolution theory. *Mycological Progress* **15(3)**: 26.

- Mothana, R. A. A., Ali, N. A. A., Jansen, R., Wegner, U., Mentel, R., Lindequist, U. (2003): Antiviral lanostanoid triterpenes from the fungus *Ganoderma pfeifferi*. *Fitoterapia* **74**: 177–180.
- Mridu, Atri, N. S. (2017): Nutritional and nutraceutical characterization of three wild edible mushrooms from Haryana, India. *Mycosphere* **8(8)**: 1035–1043.
- Noordeloos, M. E., Kuyper, T. W., Vellinga, E. C., ured. (2001): *Flora agaricina neerlandica*. 5. A. A. Balkema, Abingdon – Exton – Tokyo.
- Noordeloos, M. E., Kuyper, T. W., Vellinga, E. C., ured. (2005): *Flora agaricina neerlandica*. 6. Taylor & Francis Group, Boca Raton – London – New York – Singapore.
- Nowacka, N., Nowak, R., Drozd, M., Olech, M., Los, R., Malm, A. (2014): Analysis of phenolic constituents, antiradical and antimicrobial activity of edible mushrooms growing wild in Poland. *LWT - Food Science and Technology*. **59(2)**: 689–694.
- Nowacka, N., Nowak, R., Drozd, M., Olech, M., Los, R., Malm, A. (2015): Antibacterial, Antiradical Potential and Phenolic Compounds of Thirty-One Polish Mushrooms. *PLoS ONE* **10(10)**: e0140355. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0140355>
- O'Connor, S. E. (2010): 1.25 – Alkaloids. U: Mander, L., Liu, H.-W. (ur.) *Comprehensive Natural Products II*, Elsevier, Oxford, str. 977–1007.
- Ohyama, K., Suzuki, M., Kikuchi, J., Saito, K., Muranaka, T. (2009): Dual biosynthetic pathways to phytosterol via cycloartenol and lanosterol in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **106(3)**: 725–30.
- Ouzouni, P. K., Petridis, D., Koller, W.-D., Riganakos, K. A. (2009): Nutritional value and metal content of wild edible mushrooms collected from West Macedonia and Epirus, Greece. *Food Chemistry* **115**: 1575–1580.
- Öztürk, M., Tel-Çayan, G., Muhammad, A., Terzioğlu, P., Duru, M. E. (2015): Mushrooms: A Source of Exciting Bioactive Compounds. U: Rahman, A. (ur.) *Studies in Natural Products Chemistry*, **45**, Elsevier, str. 363–456.
- Palacios, I., Lozano, M., Moro, C., D'Arrigo, M., Rostagno, M. A., Martínez, J. A., García-Lafuente, A., Guillamón, E., Villares, A. (2011): Antioxidant properties of phenolic compounds occurring in edible mushrooms. *Food Chemistry* **128(3)**: 674–678.
- Pandey, K. B., Rizvi, S. I. (2009): Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* **2(5)**: 270–278.
- Pegler, D. N., Læssøe, T., Spooner, M. (1995): *British Puffballs, Earthstars and Stinkhorns. An Account of the British Gasteroid Fungi*. Royal Botanic Gardens, Kew.
- Petrović, J., Papandreou, M., Glamočlija, J., Ćirić, A., Baskakis, C., Proestos, C., Lamari, F., Zoumpoulakis, P., Soković, M. (2014): Different extraction methodologies and their influence on the bioactivity of the wild edible mushroom *Laetiporus sulphureus* (Bull.) Murrill. *Food Funct*. **5(11)**: 2948–2960.

- Piljac-Žegarac, J., Šamec, D., Piljac, A., Mešić, A., Tkalčec, Z. (2011): Antioxidant Properties of Extracts of Wild Medicinal Mushroom Species from Croatia. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, **13** (3): 257–264.
- Puttaraju, N. G., Venkateshaiah, S. U., Dharmesh, S. M., Urs, S. M. N., Somasundaram, R. (2006): Antioxidant Activity of Indigenous Edible Mushrooms. *J. Agric. Food Chem.* **54**: 9764–9772.
- Quideau, S., Deffieux, D., Douat-Casassus, C., Pouységu, L. (2011): Plant Polyphenols: Chemical Properties, Biological Activities, and Synthesis. *Angew. Chem. Int. Ed.* **50**: 586–621.
- 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 Res.* **2**(2): 107–112.
- Ribeiro, B., Lopes, R., Andrade, P. B., Seabra, R. M., Gonçalves, R. F., Baptista, P., Quelhas, I., Valentão, P. (2008): Comparative study of phytochemicals and antioxidant potential of wild edible mushroom caps and stipes. *Food Chem.* **110**: 47–56.
- Rodrigo, R., Gil, D., Miranda-Merchak, A., Kalantzidis, G. (2012): Antihypertensive role of polyphenols. *Advances in Clinical Chemistry* **58**: 225–244.
- Rodrigo, R., Bosco, C. (2006): Oxidative stress and protective effects of polyphenols: comparative studies in human and rodent kidney. A review. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology.* **142**: 317–327.
- Ryvarden, L., Melo, I. (2014): Poroid fungi of Europe. *Synopsis Fungorum* 31. Fungiflora, Oslo.
- Salvador, J. A. R., Leal, A. S., Alho, D. P. S., Goncalves, B. M. F., Valdeira, A. S., Mendes, V. I. S., Jing, Y. (2014): Highlights of Pentacyclic Triterpenoids in the Cancer Settings. U: Rahman, A. (ur.), *Studies in Natural Products Chemistry*, **41**, Elsevier B. V., Amsterdam, str. 33–73.
- Sarasini, M. (2005): *Gasteromiceti epigei*. Associazione Micologica Bresadola, Trento.
- Schaich, K. M., Tian, X., Xie, J. (2015): Reprint of “Hurdles and pitfalls in measuring antioxidant efficacy: A critical evaluation of ABTS, DPPH, and ORAC assays”. *Journal of Functional Foods* **18B**: 782–796.
- Sharma, S. K., Gautam, N. (2015): Chemical, bioactive, and antioxidant potential of twenty wild culinary mushroom species. *BioMed Research International* 2015: 346508.
- Smolskaitė, L., Venskutonis, P. R., Talou, T. (2015): Comprehensive evaluation of antioxidant and antimicrobial properties of different mushroom species. *LWT - Food Science and Technology* **60**(1): 462–471.
- Song, J., Cui, B.-K. (2017) Phylogeny, divergence time and historical biogeography of *Laetiporus* (*Basidiomycota, Polyporales*). *BMC Evolutionary Biology* **17**(1): 102.

- Stilinović, N., Škrbić, B., Živančev, J., Mrmoš, N., Pavlović, N., Vukmirović, S. (2014): The level of elements and antioxidant activity of commercial dietary supplement formulations based on edible mushrooms. *Food and Function* **5(12)**: 3170–3178.
- Sułkowska-Ziaja, K., Muszyńska, B., Motyl, P., Pasko, P., Ekiert, H. (2012): Phenolic compounds and antioxidant activity in some species of polyporoid mushrooms from Poland. *International Journal of Medicinal Mushrooms* **14(4)**: 385–393.
- Teissedre, P. L., Landrault, N. (2000): Wine phenolics: contribution to dietary intake. *Food Research International* **33**: 461–467.
- Tkalčec, Z., Mešić, A., Matočec, N., Kušan, I. (2008): *Crvena knjiga gljiva Hrvatske*. Ministarstvo kulture, Državni zavod za zaštitu prirode, Zagreb.
- Toledo, C. V., Barroetaveña, C., Fernandes, Â., Barros, L., Ferreira, I. C. F. R. (2016): Chemical and antioxidant properties of wild edible mushrooms from native *Nothofagus* spp. forest, Argentina. *Molecules* **21(9)**: 1201.
- Tsao, R. (2010): Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols. *Nutrients* **2**: 1231–1246.
- Udovičić, M., Baždarić, K., Bilić-Zulle, L., Petrovečki, M. (2007): Što treba znati kada izračunavamo koeficijent korelacije? *Biochemia Medica* **17**: 10–15.
- Unekwu, H. R., Audu, J. A., Makun, M. H., Chidi, E. E. (2014): Phytochemical screening and antioxidant activity of methanolic extract of selected wild edible Nigerian mushrooms. *Asian Pac J Trop Dis* **4(Suppl 1)**: S153–S157.
- Vasaitis, R., Menkis, A., Lim, Y. W., Seok, S., Tomsofsky, M., Jankovsky, L., Lygis, V., Slippers, B., Stenlid, J. (2008): "2009" Genetic variation and relationships in *Laetiporus sulphureus* s. lat., as determined by ITS rDNA sequences and in vitro growth rate. *Mycological Research* Volume **113(3)**: 326–336.
- Vizzini, A., Angelini, C., Ercole, E. (2014): Le sezioni *Velatae* e *Aporus* di *Agrocybe* sottogenere *Aporus*: Rivalutazione del genere *Cyclocybe* Velen. ed una nuova specie. *Rivista Micologica Romana* **30(92)**: 21–38.
- Wanasundara, P. K. J. P. D. i Shahidi, F. (2005): Antioxidants: science, technology, and applications. U: Shahidi, F. (ur.) *Bailey's Industrial Oil and Fat Products*. Volume 1, *Edible Oil and Fat Products: Chemistry, Properties, and Health Effects*, 6th edn. Wiley-Blackwell, Hoboken, New Jersey, str. 431–489.
- Ward, S., Watling, R. (2003): *Fungi – Naturally Scottish*. Scottish Natural Heritage, Perth, 35 str.
- Watkinson, S. C., Boddy, L., Money, N.P. (2016): *The Fungi*. 3rd ed. Academic Press, United Kingdom. 449 str.
- Weber, R. W. S., Webster, J. (2007): *Introduction to Fungi*. Third Edition. Cambridge University Press, New York.

Wieczorek, P. P., Witkowska, D., Jasicka-Misiak, I., Poliwoda, A., Oterman, M., Zielin'ska, K. (2015): Bioactive Alkaloids of Hallucinogenic Mushrooms. U: Rahman, A. (ur.) Studies in Natural Products Chemistry, **46**, Elsevier, B. V., str. 133–168.

Witkowska, A. M., Zujko, M. E., Mirończuk-Chodakowska, I. (2011): Comparative study of wild edible mushrooms as sources of antioxidants. International Journal of Medicinal Mushrooms **13(4)**: 335–341.

Yahia, E. M., Gutiérrez-Orozco, F., Moreno-Pérez, M. A. (2017): Identification of phenolic compounds by liquid chromatography-mass spectrometry in seventeen species of wild mushrooms in Central Mexico and determination of their antioxidant activity and bioactive compounds. Food Chemistry **226**: 14–22.

Yaoita, Y., Kikuchi, M., Machida, K. (2015): Terpenoids and Sterols from Mushrooms. U: Rahman, A. (ur.) Studies in Natural Products Chemistry, **44**, Elsevier, str. 1–32.

Zaninović, K., Gajić-Čapka, M., Perčec Tadić, M. (2008): Klimatski atlas Hrvatske / Climate atlas of Croatia 1961–1990., 1971–2000. Državni hidrometeorološki zavod, Zagreb, 200 str.

Zudaire, L., Viñas, I., Abadias, M., Simó, J., Echeverria, G., Plaza, L., Aguiló-Aguayo, I. (2017): Quality and bioaccessibility of total phenols and antioxidant activity of calçots (*Allium cepa* L.) stored under controlled atmosphere conditions. Postharvest Biol Tec. **129**: 118–128.

Životopis

Vedran Bahun rođen je 18. veljače 1993. godine u Zagrebu. Pohađa Osnovnu školu Otona Ivekovića i završava je 2008. godine. Srednjoškolsko obrazovanje stječe u V. gimnaziji u Zagrebu. Godine 2012. upisuje preddiplomski studij Znanosti o okolišu na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. U listopadu 2014. sudjelovao je na radionici „DIG - 2. radionica o Dinaridskoj Glacijaciji: donje/gornjo pleistocenske oledbe SI Mediterana - popunjavanje nepoznanica u rekonstrukciji njegove geološke povijesti i klimatskih promjena. Fokus na prijelaze glacijal-interglacijal (sedimenti i procesi)“ u Starigradu-Paklenici. Godine 2015. postaje prvostupnik Znanosti o okolišu na temelju seminarskog rada pod naslovom „Djelovanje onečišćenja na mikorizne gljive“. Tijekom ljetnog razdoblja 2016. godine odradio je stručnu praksu u sklopu Erasmus+ programa stručne prakse na Sveučilištu Jagiellonian u Krakowu pod naslovom „Istraživanje interakcija biljaka i mikroorganizama“.