

Senka S. Vidović, dipl. inž.

**EKSTRAKCIJA, SASTAV, DELOVANJE I
MOGUĆE PRIMENE ODABRANIH VRSTA
PEČURAKA**

Doktorska disertacija



Novi Sad, 2011.

Veliku zahvalnost na pomoći i podršci koju mi je pružio tokom izrade i pisanja doktorske disertacije dugujem svom mentoru prof. dr Zoranu Zekoviću.

Iskreno se zahvaljujem i prof. dr Žiki Lepojeviću na korisnim savetima, sugestijama i pomoći prilikom izrade ovog rada.

Zahvaljujem se prof. dr Ibrahimu Mujiću, redovnom profesoru Biotehničkog fakulteta u Bihaću, na zajedničkom radu i entuzijazmu uloženom u izradu moje doktorske disertacije.

Prof. dr Mirjani Antov zahvaljujem se na iskrenoj i neizmernoj podršci koju mi je pružila od prvog dana mog rada na fakultetu.

Posebno se zahvaljujem mojoj ekipi, koleginicama i prijateljima, Slavici Ostojić, Mariji Radojković i Svetlani Milošević, na prijateljstvu, razumevanju i nesebičnoj pomoći koju su mi pružile prilikom izrade moje doktorske disertacije.

Hvala kolegici sa Prehrambeno-tehnološkog fakulteta iz Osjeka Steli Jokić na pomoći pruženoj kad god je to trebalo. Hvala mojoj Jeleni Banić Simičić. Na tehničkoj podršci hvala Nemanji Pantošu.

Najsrdačnije se zahvaljujem dr Ivanu Spasojeviću iz Centra za multidisciplinarna istraživanja iz Beograda i dr Dejanu Gođevcu sa Hemijskog fakulteta u Beogradu na velikoj pomoći u eksperimentalnom radu i značajnim sugestijama tokom obrade rezultata ovog rada.

Kolegama i prijateljima zahvaljujem se na podršci.

Najveću zahvalnost dugujem mojoj majci i mom suprugu na neizmernoj ljubavi, pomoću, strpljenju, podršci i razumevanju.

Autor

UNIVERZITET U NOVOM SADU
TEHNOLOŠKI FAKULTET

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

Redni broj
RBR

Identifikacioni broj
IBR

Tip dokumentacije
TD

Monografska publikacija

Tip zapisa
TZ

Tekstualni štampani materijal

Vrsta rada
VR

Doktorska disertacija

Autor
AU

Senka S. Vidović

Mentor
MN

Prof. dr Zoran P. Zeković

Naslov rada
NR

EKSTRAKCIJA, SASTAV, DELOVANJE I MOGUĆE
PRIMENE ODABRANIH VRSTA PEČURAKA

Jezik publikacije
JP

Srpski (latinica)

Jezik izvoda
JI

Srpski/engleski

Zemlja publikovanja
ZP

Srbija

Uže geografsko područje
UGP

Vojvodina

Godina
GO

2011.

Izdavač
IZ

Autorski reprint

Mesto i adresa MA	Tehnološki fakultet, Bulevar Cara Lazara 1, 21000 Novi Sad
Fizički opis rada FO	7 poglavlja, 133 stranice, 207 citata, 27 tabela i 62 slike
Naučna oblast NO	Tehničko-tehnološke nauke
Naučna disciplina ND	Farmaceutske tehnologije
Predmetna odrednica/Ključne reči PO	Pečurke, ekstrakcija, fenoli, antioksidativno delovanje, adenzin, mikro-elementi, makro-elementi, superkritična ekstrakcija, masne kiseline
UDK	
Čuva se ČU	Biblioteka Tehnološkog fakulteta u Novom Sadu, Bulevar Cara Lazara 1, 21000 Novi Sad
Važna napomena VN	Nema
Izvod/Abstrakt I/A	<p>Upotrebom 50% etanola i superkritičnog ugljendioksida kao ekstragensa izvršena je ekstrakcija različitih vrsta pečuraka. Nakon određivanja prinosa suvih ekstrakata, u njima su određeni: sadržaj ukupnih fenola i ukupnih flavonoida, sadržaj makro- i mikro-elemenata, sadržaj adenozina, kao i sadržaj karakterističnih komponenata pistilarina i variegetične kiseline. Najveći sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja određen je u suvom ekstraktu pečurke <i>C. pistillaris</i>, najveći sadržaj ukupnih flavonoida u ekstraktu <i>D. confragosa</i>, a najviše esencijalnog cinka i selena sadrži suvi ekstrakt pečurke <i>B. edulis</i>. U odnosu na ostale suve ekstrakte ekstrakt pečurke <i>L. saccatum</i> sadrži nekoliko puta veću količinu adenozina. Antioksidativno delovanje suvih ekstrakata analizirano je primenom spektrofotometrijskih i EPR metode. Ekstrakti <i>C. pistillaris</i>, <i>B. edulis</i> i <i>A. mellea</i> pokazali su se kao najefikasniji skevindžeri najopasnije slobodnoradikalne vrste hidroksil radikala, dok se efikasnim u prevenciji lipidne peroksidacije mogu smatrati ekstrakti <i>B. edulis</i>, <i>A. mellea</i> i <i>L. saccatum</i>.</p> <p>Nakon određivanja prinosa supekritičnih ekstrakata</p>

ispitivanih pečuraka, u njima je analiziran sastav masnih kiselina i detektovana jedinjenja sterolnog tipa. U ispitivanim ekstraktima dominantna je nezasićena linoleinska kiselina, a značajan je udeo i oleinske nezasićene masne kiseline. Dominantno jedinjenje sterolne strukture u gotovo svim ekstraktima je ergosterol. Ispitan je uticaj superkritičnih ekstrakata pečuraka na fluidnost membrane eritrocita i na osnovu dobijenih rezultata zaključeno da bi značajnu ulogu u antihipertenzivnoj ishrani mogle imati pečurke *A. mellea* i *M. procera*.

Datum prihvatanja teme od strane NN Veća
DP

19.11.2010.

Datum odbrane
DO

Članovi komisije
KO

Predsednik: Dr Žika Lepojević, redovni profesor Tehnološkog fakulteta u Novom Sadu

Član: Dr Zoran Zeković, redovni profesor Tehnološkog fakulteta u Novom Sadu

Član: Dr Mirjana Antov, vanredni profesor Tehnološkog fakulteta u Novom Sadu

Član: Dr Ibrahim Mujić, redovni profesor Biotehničkog fakulteta u Bihaću, BiH

**UNIVERSITY OF NOVI SAD
FACULTY OF TECHNOLOGY**

KEY WORD DOCUMENTATION

Accession number
ANO

Identification number
INO

Document type
DT Monographic publication

Type of record
TR Textual material, printed

Contents code
CC PhD thesis

Author
AU Senka S. Vidović

Mentor
MN Prof. dr Zoran P. Zeković

Title
TI EXTRACTION, CONTENT, ACTIVITY AND POSSIBLE
APPLICATIONS OF SELECTED MUSHROOM SPECIES

Language of text
LT Serbian (Roman alphabet)

Language of abstract
LA Serbian/English

Country of publication
LP Serbia

Locality of publication
LP Vojvodina

Publication year
PY 2011.

Publisher
PU Author's reprint

Publisher place PP	Faculty of Technology, Bulevar Cara Lazara 1, 21000 Novi Sad
Physical description PD	7 chapters, 133 pages, 207 references, 27 tables and 62 figures
Scientific field SF	Technical-technological sciences
Scientific discipline SD	Pharmaceutical technologies
Subject/Key words SX	Extraction, mushrooms, phenols, antioxidant activity, micro-elements, macro-elements, adenosine, supercritical extraction, fatty acids
UC	
Holding data HD	Library of Faculty of Technology, 21000 Novi Sad, Bulevar Cara Lazara 1, Serbia
Note N	None
Abstract AB	<p>Using 50% ethanol and supercritical carbon dioxide different mushroom extracts were prepared. After analysis of extraction yield, content of total phenols and total flavonoids, content of macro-elements and micro-elements, as well as content of adenosine and characteristic compounds (pistilarin and variegatic acid) were determined. Highest content of total phenols was determined in <i>C. pistillaris</i> extract, highest content of total flavonoids in <i>D. confragosa</i> and highest content of essential zinc and selenium in <i>B. edulis</i> dry extract. In comparison to other extracts <i>L. saccatum</i> possesses few times higher content of adenosine. Antioxidant activity was analysed by spectrophotometric and EPR methods. Extracts of <i>C. pistillaris</i>, <i>B. edulis</i> and <i>A. mellea</i> have been shown as most efficient in scavenging of dangerous OH[·] radical. In lipid peroxidation prevention significant were mushroom extracts of <i>B. edulis</i>, <i>A. mellea</i> and <i>L. saccatum</i>.</p> <p>After determination of mushrooms supercritical extraction yield, fatty acid composition and sterol components were analysed. Dominant unsaturated fatty acid in investigated mushroom extracts was linoleic acid. Content of oleic fatty acid was also significant. Dominant compound of sterol</p>

structure, in almost all supercritical extracts, was ergosterole. Influence of supercritical mushroom extracts on eritrocite membrane fluidity was investigated. Acording to obtained results, mushrooms *A. mellea* and *M. procera* could have significant role in antihypertensive diet.

**Accepted by the Scientific
Board on
ASB**

19.11.2010.

**Defended on
DE**

**Thesis defend board
DB**

Chairman: Dr Žika Lepojević, full professor, Faculty of Technology, Novi Sad

Member: Dr Zoran Zeković, full professor, Faculty of Technology, Novi Sad

Member: Dr Mirjana Antov, associated professor, Faculty of Technology, Novi Sad

Member: Dr Ibrahim Mujić, full professor, Biotechnical Faculty, Bihać, BiH

SADRŽAJ:

1. UVOD	1
2. OPŠTI DEO	3
2.1. PEČURKE	3
2.2. PEČURKE I NJIHOVA UPOTREBA KROZ ISTORIJU	6
2.3. EKONOMSKI POKAZATELJI SAVREMENOG ZNAČAJA PEČURAKA	8
2.4. SASTAV PEČURAKA	9
2.4.1. Suva materija i sadržaj vode	10
2.4.2. Proteini i aminokiseline	10
2.4.3. Ugljeni hidrati	11
2.4.3.1. <i>Beta glukani</i>	11
2.4.3.2. <i>Dijetetska vlakna</i>	12
2.4.4. Masti	13
2.4.5. Vitamini	13
2.4.6. Mikro- i makro-elementi pečuraka	14
2.4.7. Aromatične komponente	17
2.4.8. Enzimi	18
2.4.9. Kalorijska vrednost	18
2.5. LEKOVITO DELOVANJE I NOSIOCI LEKOVITOG DELOVANJA PEČURAKA	18
2.5.1. Antioksidativno delovanje	19
2.5.1.1. <i>Slobodni radikali i mehanizmi njihovog delovanja</i>	19
2.5.1.2. <i>Antioksidasi i mehanizmi njihovog delovanja</i>	22
2.5.1.3. <i>Lipidna peroksidacija</i>	25

2.5.1.4. Cink i selen kao antioksidanti u pečurkama	26
2.5.1.5. Polifenolna jedinjenja kao antioksidansi u pečurkama	28
2.5.1.6. Ostale antioksidativne komponente pečuraka	32
2.5.1.7. Metode određivanja sadržaja fenola i antioksidativnog delovanja	32
2.5.2. Kardiovaskularno delovanje	36
2.5.2.1. Adenozin	37
2.5.2.2. Masne kiseline	38
2.5.2.3. Steroli	40
2.5.3. Imunomodulatorno i antikancerogeno delovanje	41
2.5.4. Antimikrobno delovanje pečuraka	42
2.5.5. Hepatoprotektivno delovanje pečuraka	43
2.5.5.1. Terpenoidi	43
2.6. LEKOVITE PEČURKE KINE, KOREJE I JAPANNA	44
2.7. PEČURKE NAŠEG PODRUČJA	47
2.8. EKSTRAKCIJA I EKSTRAGENSI	50
2.8.1. Klasična ekstrakcija organskim rastvaračima	50
2.8.2. Ekstrakcija ugljendioksidom u superkritičnom stanju	51
3. EKSPERIMENTALNI DEO	54
3.1. PRIPREMA MATERIJALA	55
3.2. EKSTRAKCIJA ETANOLOM	55
3.3. EKSTRAKCIJA UGLJENDIOKSIDOM U SUPERKRITIČNOM STANJU	56
3.4. ODREĐIVANJE SADRŽAJA UKUPNIH FENOLA U EKSTRAKTIMA PEČURAKA	57

3.5. ODREĐIVANJE SADRŽAJA UKUPNIH FLAVONOIDA	
U EKSTRAKTIMA PEČURAKA	57
3.6. HPLC/DAD I LC/MS ANALIZA	
EKSTRAKATA PEČURAKA	57
3.7. KVANTITATIVNO ODREĐIVANJE MIKRO- I MAKRO- ELEMENATA	
EKSTRAKATA PEČURAKA	58
3.8. GC/MS ANALIZA SUPERKRITIČNIH EKSTRAKATA PEČURAKA	58
3.9. ISPITIVANJE ANTIOKSIDATIVNOG DELOVANJA	59
3.9.1. DPPH metod	59
3.9.2. Metoda <i>reducing power</i>	59
3.9.3. Određivanje skevindžer aktivnosti hidrosil i superoksid radikala	60
3.9.3.1. <i>Određivanje relativne inhibicije hidrosil radikala</i>	60
3.9.3.2. <i>Određivanje relativne ihibicije superoksid radikala</i>	61
3.9.4. Isitivanje uticaja ekstrakata pečuraka na proces lipidne peroksidacije	63
3.10. ISPITIVANJE UTICAJA SUPERKRITIČNIH EKSTRAKATA	
PEČURAKA NA FLUIDNOST MEMBRANE ERITROCITA	65
4. REZULTATI I DISKUSIJA	67
4.1. SREDNJI PREČNIK ČESTICA USITNJENOG MATERIJALA	67
4.2. EKSTRAKCIJA ODABRANIH VRSTA PEČURAKA ETANOLOM	68
4.3. SADRŽAJ UKUPNIH FENOLA I FLAVONOIDA	69
4.4. ANTIOKSIDATIVNO DELOVANJE	71
4.4.1. DPPH test	71

4.4.2. Reducing power	74
4.4.3. Antioksidativno delovanje ekstrakata pečuraka na hidroksil i superoksid radikale	77
4.4.4. Lipidna peroksidacija	79
4.5. MIKRO- I MAKRO-ELEMENTI U PEČURKAMA	81
4.6. PISTILARIN, VARIEGETIČNA KISELINA I DRUGE KOMPONENTE EKSTRAKTIMA PEČURAKA	83
4.7. ADENOZIN U EKSTRAKTIMA PEČURAKA	86
4.8. EKSTRAKCIJA ODABRANIH VRSTA PEČURAKA UGLJENDIOKSIDOM U SUPERKRITIČNOM STANJU	87
4.9. SASTAV MASNIH KISELINA SUPERKRITIČNIH EKSTRAKATA ISPITIVANIH PEČURAKA	92
4.10. STEROLNA JEDINJENJA PRISUTNA U SUPERKRITIČNIM EKSTRAKTIMA PEČURAKA	97
4.11. UTICAJ EKSTRAKATA PEČURAKA NA FLUIDNOST MEMBRANE ERITROCITA	99
5. ZAKLJUČCI	102
6. LITERATURA	105
7. PRILOG	122

1. UVOD

Pečurke su poznate hiljadama godina kao kvalitetan izvor hrane. Najpre su sakupljane u svom prirodnom staništu, a tek u skorije vreme započeto je njihovo intenzivno gajenje u veštačkim uslovima, što je dovelo i do porasta njihove upotrebe. Istorijski gledano, uloga pečurka u lečenju mnogih oblika poremećaja imuniteta je opisana još u starim tradicionalnim istočnjačkim medicinama. Kineska farmakopeja dokumentuje upotrebu od preko 100 vrsta pečuraka od strane tradicionalne medicine u lečenju raznih vrsta oboljenja. Jestive pečurke često se smatraju terapijskom hranom koja poseduje antikancerogena, antiholestolemijska, antivirusna, kao i profilaktička dejstva na bolesti srca i hipertenziju.

U poslednje dve decenije naučna istraživanja pečuraka, ispitivanja njihovog sastava, osobina i delovanja naročito su intenzifikovana. Savremena istraživanja potvrđuju pozitivna dejstva konzumacije pečuraka i proizvoda na bazi pečuraka. Naročito se ističe njihovo antitumorno delovanje. Ključna komponenta antitumornog delovanja pečuraka jeste određena grupa polisaharidnih jedinjenja. Polisaharidi izolovani iz pečuraka definisani su i kao veoma značajni imunomodulatori. U Kini, Japanu i SAD klinički se testira i upotrebljava nekoliko proizvoda na bazi pečuraka: Letinan izolovan iz plodonosnog tela pečurke *Letinula edodes*, Schizofilan izolovan iz micelije *Schizophyllum commune*, PSK i PSP, dobijeni iz kulture micelije pečurke *Trametes versicolor* i Grifon-D izolovan iz plodnog tela pečurke *Grifola frondosa*.

Pečurke su bogate proteinima, imaju nizak sadržaj masti, ali vrlo visok udeo nezasićenih masnih kiselina. One su bogat izvor gotovo svih esencijalnih aminokiselina i vitamina, naročito vitamina B i D gupe. Nukleozidi, posebno adenzin, smatraju se aktivnim komponentama pečurke *Cordyceps*, koja je svoju dugogodišnju primenu u tradicionalnoj Kineskoj medicine pronašla u terapiji nesvestice, hiperglikemije, hiperlipidemije, srčanih aritmija, bolesti respiratornog sistema i jetre. Pečurke su takođe, izvor mineralnih komponenata, poput esencijalnih selena i cinka, čije prisustvo utiče pozitivno u prevenciji karcinogenih i kardiovaskularnih oboljenja. Cink i selen, fenolne komponente i neka specifična jedinjenja (eritadenin), nosioci su antioksidativnog delovanja pečuraka i proizvoda na bazi pečuraka.

Zbog ovih osobina pečurke su funkcionalna hrana, izvor lekovitih komponenata i važan činilac pravilne ishrane, pa bi se upotreba pečuraka mogla opisati Hipokratovim načelom “*Neka hrana bude tvoj lek, a lek tvoja hrana*”.

Sve veće interesovanje za lekovite preparate tradicionalne medicine koji se koriste u terapiji raznih poremećaja, kao i otkriće modifikatora biološkog odziva - imunomodulatora u pečurkama, doveli su do pojave termina “nutriceutici na bazi pečuraka”. Proizvodi dobijeni iz lekovitih pečuraka kreirani kao dodatak ljudskoj ishrani, a ne kao regularna hrana, u cilju poboljšanja zdravlja, mogu se svrstati u kategoriju dijetetskih suplementa/nutriceutika. Ovi proizvodi su prečišćeni, delimično definisani ekstrakti koji se konzumiraju u obliku kapsula ili tableta. Mnogi proizvodi, odnosno dijetetski suplementi na bazi pečuraka, danas se proizvode i intenzivno koriste u Japanu, Koreji i Kini, dok zapadna medicina proizvode na bazi pečuraka još uvek nedovoljno koristi.

Područje Srbije, kao i cela teritorija Balkana, smatraju se područjem bogatim različitim vrstama pečuraka. Vrste koje ovde rastu, od kojih se neke sakupljaju i koriste u ishrani, slabo su istražene u pogledu nutritivnih karakteristika, kao i u pogledu potencijalno farmakološki vrednih komponenata.

Cilj ove doktorske disertacije je ispitivanje nekoliko odabranih vrsta pečuraka, ekstrakcija i analiza sastava dobijenih ekstrakata, identifikacija farmakološki značajnih komponenata prisutnih u ekstraktima, kao i ispitivanje potencijalno pozitivnog delovanja i moguće primene ekstrakata u ishrani i farmaciji.

Istraživanje je bazirano na dobijanju i ispitivanju dva različita ekstrakta pečuraka. Jedan ekstrakt dobijen je primenom etanola kao ekstragensa, a drugi primenom superkritičnog ugljendioksida. U etanolnim ekstraktima pečuraka određen je sadržaj fenola, flavonoida, mikro- i makro-elemenata, kao i adenzina, a antioksidativno delovanje ekstrakata je ispitano na različitim sistemima i primenom različitih metoda analize. U ekstraktima dobijenim primenom superkritičnog ugljendioksida ispitan je sastav masnih kiselina, a identifikovana su i neka potencijalno farmakološki značajna jedinjenja sterolne strukture. *In vivo* istraživanjem uticaja superkritičnih ekstrakata pečuraka na propustljivost membrane eritrocita ispitan je njihovo delovanje na hipertenziju.

2. OPŠTI DEO

2.1. PEČURKE

Postoji razlika između termina gljiva i pečurka. Zanimljivu definiciju pečuraka, na osnovu koje ova razlika postaje jasnija, dali su 1997. godine Chang i Miles: pečurke su mikrofungusi sa posebnim plodnim telom koje može da se razvija iznad ili ispod zemlje, a dovoljno je veliko da se vidi golim okom ili da se ubere rukom. Ova definicija nije savršena, ali se može koristiti kao radni termin da bi se pečurke definisale (Miles i Chang, 1997).

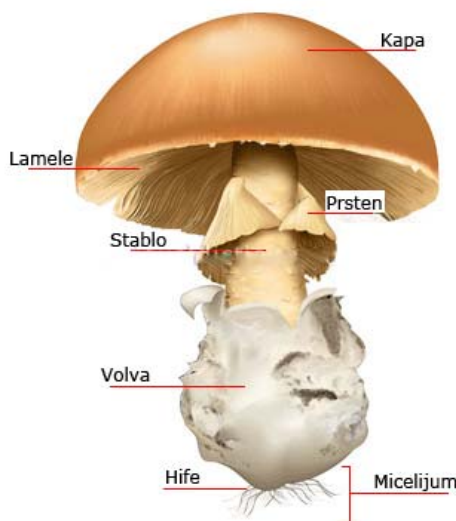
Gljive se smatraju drugom najvećom grupom organizama u biosferi posle insekata. 1990. godine broj poznatih vrsta gljiva iznosio je oko 69.000 (Hawksworth, 1991), ali je ukupni broj vrsta procenjen na 1,5 milion. U period od 1920. do 1950. godine na godišnjem nivou opisivalo se oko 700 novih vrsta gljiva. Taj broj se tokom godina povećavao, da bi u periodu između 1986. i 1990. godine iznosio godišnje oko 1.700 novih vrsta (UN APCAEM). Od oko 70.000 opisanih vrsta, oko 14.000-15.000 proizvode plodonosno telo dovoljne veličine da se smatraju makrofungama, odnosno pečurkama. Od ovog broja oko 5.000 poseduju različiti stepen jestivosti, a oko 2.000 vrsta smatraju se primarnim jestivim pečurkama. Samo 100 vrsta se uzgaja u eksperimentalnim uslovima, od tog broja 30 se uzgaja komercijalno, a samo 6 vrsta dostiglo je industrijsku *scale-up* proizvodnju. 1.800 vrsta pečuraka su lekovite. Otrovnost je oko 10% od ukupnog broja vrsta, a njih 30 se smatraju letalnim (Miles i Chang, 1997).

Pečurke su neobičan, raznovrstan i nedovoljno proučen svet. Budući da ne vrše osnovnu funkciju biljaka, fotosintezu, jer ne poseduju hlorofil, da se ne kreću i ne razmnožavaju polno poput životinja, ne mogu se svrstati ni u prvo ni u drugo carstvo, već predstavljaju carstvo za sebe.

Mogu se pronaći gotovo svuda. Odgovara im vlaga, pa se češće mogu pronaći na terenima sa ovom karakteristikom. U kišnim tropskim šumama ima ih tokom cele godine (UN APCAEM). U suvljim regionima pojavljuju se nakon kiše. U ovim ekosistemima određene vrste pečuraka nalaze se u proleće ili u letnjem periodu, a nekima za razvoj plodonosnog tela odgovara jesen. Samo mali broj vrsta se javlja i opstaje tokom zime. U nekim godinama, zbog perioda intenzivne suše, formiranje plodonosnog tela pečurke može u potpunosti da izostane.

Boje pečuraka kreću se od sasvim neupadljivih do izuzetno jakih. Po mirisu i ukusu su takođe raznolike. Miris pečurke podseća na miris belog luka, brašno, voće, krompir, buđ, badem, kajsiju, neke su ljute, neke gorke, neke blagog, a neke veoma prijatnog ukusa. Po obliku su veoma različite. Sreću se tanjiraste, peharaste, trubaste, loptaste, valjkaste i mnoge druge forme.

Struktura koja se naziva pečurkom u suštini je samo plodonosno telo. Vegetativni, odnosno podzemni deo gljive koji se zove micelija, prožima zemlju, odnosno supstrat ili lignocelulozni materijal na kome raste. Nakon perioda rasta i pod povoljnim uslovima razvijena micelija proizvodi plodonosnu strukturu gljive – pečurku (slika 1).



Slika 1. Prikaz građe pečurke

Za opstanak, rast i metabolizam, pečurke se oslanjaju na organsku materiju koja nas okružuje i koja je sintetisana od strane biljaka ili na supstrat - organske ostatke poljoprivrednih useva. Pečurke su jedinstven deo živog sveta koji svoju hranu prikuplja na način da izlučuju enzime koji razlažu hranljivu materiju, prisutnu na biomasi na kojoj rastu, na jednostavnije komponente, koje zatim absorbiraju i transformišu u svoje tkivo (UN APCAEM). Zbog ovoga načina funkcionisanja pečurke se smatraju heterotrofnim ili autotrofnim organizmima.

Sa ekološkog aspekta pečurke se mogu svrstati u tri različita modela ili grupe rasta. Dakle, one mogu biti saprofiti, paraziti ili mikorizne pečurke.

Saprofitske pečurke pripadaju grupi primarnih reciklera u prirodi koji enzimskim putem razlažu kompleksnu organsku materiju uginulih organizama, naročito drvenih struktura, čime se organske komponente vraćaju ekosistemu na ponovno korišćenje. U okviru ove grupe pečuraka nalaze se tri odvojene podgrupe organizama, koje se u mnogome i preklapaju:

1. **Primarni dekompoziteri**, su veliki razlagači drvenih struktura i karakterišu se enzimima koji su sposobni da razlažu kompleksnu strukturu makromolekula, lignina i celuloze. Mnoge lekovite gljive koje se koriste na Orijentu, na primer *L. edodes*, pripadaju ovoj vrsti pečuraka.
2. Kada se micelija ovih gljiva formira i započne inicijalno razlaganje sirovog materijala, **sekundarni dekompoziteri** nastavljaju dalje razlaganje i korišćenje delimično razloženog materijala. U ovu grupu pečuraka spada *Agaricus campestris*.
3. Kada je organski materijal intenzivno razložen treća grupa pečuraka počinje na njemu da se razvija.

U prirodi ove tri grupe pečuraka nisu jasno odvojene (Smith i saradnici, 2002). Većina uzgajanih vrsta pečuraka pripadaju grupi saprofita.

Pečurke paraziti najčešće napadaju živo i zdravo drveće čineći pri tome veliku štetu u šumskim ekosistemima. Ova šteta ponekad je i veoma velikih finansijskih srazmera. Neke od parazitskih pečuraka, na primer *Armillaria mellea*, koju nazivaju i “šumska smrt”, smatraju se veoma štetnim rastinjem. U većini slučajeva micelija ovakvih pečuraka raste i razvija se u telu zdravog drveta i ponekad dovodi i do smrti domaćina. Neke od ovih pečuraka mogu da rastu i na uginulom drveću i tada se nazivaju fakultativni paraziti. Primer ove grupe pečuraka je *Pleurotus ostreatus* (Smith i saradnici, 2002).

Najveću grupu čine **mikorizne pečurke** (*myco*-pečurka, *rhizal*-koren). Ove pečurke su simbiotičke, što znači da žive u zajednici sa drugim biljnim vrstama i sa njima se ispomažu. U ovu grupu pečuraka spadaju veoma ukusne jestive vrste, kao što su tartufi i lisičice. Podzemna micelija ovih pečuraka raste intenzivno oko korena određene biljne vrste i formira zaštitni omotač. Micelija dalje raste kroz zemlju i pojavljuje se na površini kao plodonosno telo gljive ili se u zemlji formira specifična fungalna masa. Fungalni omotač povećava absorpciju esencijalnih nutritijenata, naročito minerala, čime omogućava povećanje otpornost drveta prema bolestima. Mnoge mikorizalne pečurke se danas uzgajaju na odabranom medijumu-supstratu. U mnogim zemljama širom sveta sakupljanje, distribucija i prodaja ukusnih pečuraka ove grupe iz prirodnih staništa predstavlja industriju vrednu nekoliko miliona funti (Smith i saradnici, 2002). U poznate jestive pečurke ove grupe spadaju *Tuber melanosporum* (crni tartuf) i *Tricholoma matsutake*.

Neke vrste pečuraka se ne mogu svrstati samo u jednu vrstu. Tako je *Ganoderma lucidum* saprofitna pečurka, ali može biti i patogen.

Pečurke su veoma značajne sa aspekta iskorišćenja lignoceluloznog materijala, odnosno značajne su za reciklažu organskog otpada, koji predstavlja supstrat, odnosno najvažniji izvor rasta za proizvodnju drugih lekovitih i jestivih vrsta pečuraka, koje su proizvođači nutritivno značajnih komponenta i lekovitih supstanci (antibiotika, antikancerogenih komponenta, vitamina, organskih kiselina, itd.).

Što se tiče podele pečuraka, prihvatljiva je jednostavna podela po kojoj se pečurke mogu svrstati u sledeće grupe:

1. Jestive pečurke, koje su ukusne i jestive, npr. *Agricus bisporus*.
2. Lekovite pečurke, za koje se smatra da imaju lekovito delovanje, npr. *G. lucidum*.
3. Otrovnice pečurke, za koje je dokazano ili se smatra da su otrovne, npr. *Amanita phalloides*.
4. Ostale pečurke, one čije su osobine slabije definisane (UN APCAEM).

2.2. PEČURKE I NJIHOVA UPOTREBA KROZ ISTORIJU

U mitologiji mnogih drevnih naroda pečurke zauzimaju značajno mesto i smatraju se simbolom dugovečnosti. Značajna svojstva pečuraka, poput lekovitog, prepoznata su još pre više hiljada godina. Teritorijalno upotreba pečuraka je bila veoma raširena, pa podaci o njihovom korišćenju potiču sa gotovo svih meridijana.

Najstariji arheološki dokaz o upotrebi pečuraka potiče sa drevnog Afričkog kontinenta i predstavlja Tassili sliku, otkrivenu u kamenim pećinama Alžira, za koju se smatra da potiče još iz perioda od pre 5000 godina p.n.e. (slika 2). Na slici je prikazan igrač, najverovatnije šaman, sa pečurkama u rukama, za koje se pretpostavlja da su služile kao halucinogena sredstva (Samorini, 2001).



Slika 2. Prikaz šamana iz kamene pećine u Alžiru

Nedavno otkriće “Otzi the Iceman”, mumije pronađene u Italijanskim Alpima septembra 1991. godine, za koju se veruje da je stara oko 5.300 godina, donosi dalje zanimljive dokaze o drevnoj upotrebi pečuraka (slika 3). Među stvarima ovog drevnog lovca pronađene su dve drvenaste pečurke *Polyporaceae* (*Fomes fomentarius* i *Piptorus betulinis*). Smatra se da se jedna od njih koristila za paljenje vatre, a da je druga imala lekovita svojstva, odnosno da se koristila za tretman rana, kao i za proizvodnju čaja za poboljšanje imuniteta (Hobbs, 1995).



Slika 3. “Otzi the Icemann” i stvari pronađene uz ovu mumiju

Akumulirani podaci jasno ukazuju na upotrebu snažnih halucinogenih osobina pečuraka u primitivnim formama religije. Kamene skulpture koja potiču iz perioda od oko 3000 godina p.n.e. pronađene na teritoriji prapostojbine drevnih Maja u Gvatemali (slika 4) jasno ukazuju da je postojao i kult pečuraka (Smith i saradnici 2002). Autorima prvih pisanih spisa, napisanih oko 3000 godina p.n.e., koji dokumentuje upotrebu pečuraka u medicinske svrhe, smatraju se drevni Indijanci (UN APCAEM).



Slika 4. Kamene skulpture pečuraka iz Gvatemale

U Staroj Grčkoj može se pronaći veliki broj podataka o raznim vrstama pečuraka i njihovim specifičnim osobinama. Velika količina saznanja o pečurkama uslovlila je formiranje posebne nauke **mikologije** (od grčkog *myko* - šampinjon, pečurka, *logos* - nauka). Ova nauka je prošla dug razvojni put, a njenim rodonačelnikom smatra se grčki filozof Aristotel, koji je dao i prve opise pečuraka. U etnomikološkim dokumentima pronađenim u Grčkoj je zapisano da su pečurke korišćene na ovoj teritoriji u religiozne svrhe, pa su se tako u obliku dekokta konzumirale u toku raznih religioznih ceremonija.

Dalje kroz istoriju, Rimljani su ih nazivali hranom bogova, a Plinije u svojoj knjizi „*Istorija prirode*” ih po prvi put deli na otrovne i jestive. Pečurke se spominju u delima najpoznatijih pisaca i umetnika sveta, naročito u doba renesanse, a u istorijskim spisima ostaju zabeležene i povezane sa dve smrti, francuskog kralja Šarla VI i pape Klementa VII, za koje se veruje da su umrli od trovanja pečurkama.

Najlepši istorijski podaci o pečurkama beleže se ipak na teritoriji Kine, gde su pečurke smatrane “eliksirom života”.

2.3. EKONOMSKI POKAZATELJI SAVREMENOG ZNAČAJA PEČURAKA

Porast korišćenja pečuraka može se pratiti kroz podatke o porastu njihove proizvodnje (tabela 1). Na osnovu prikazanih podataka može se zaključiti da je Kina definitivno svetski lider u proizvodnji pečuraka.

Tabela 1. Prikaz rasta proizvodnje pečuraka (Chang, 1999, 2006; Delcaire, 1978; UN APCAEM)

Godina	Ukupna proizvodnja (x 1.000 tona)	Kineska proizvodnja (x 1.000 tona)	Učešće Kine u svetskoj proizvodnji (%)
1983.	1.453,0	174,5	12,0
1990.	3.763,0	1.083,0	28,8
1994.	4.909,3	2.640,0	53,8
1997.	6.158,4	3.918,0	63,6
2002.	12.250,0	8.650, 0	70,6
2006.	nije dostupan podatak	14.000,0	nije dostupan podatak

1997. godine Azija je u ukupnoj svetskoj proizvodnji pečuraka imala učešće od 74,4%, Evropa 16,3%, Severna Amerika 7,0%, a Afrika i Latinska Amerika zajedno nešto manje od 1%. Ova razlika u proizvodnji prouzrokovana je nedostacima saznanja o pozitivnom delovanju pečuraka na zdravlje čoveka, znanja o nutritivnim vrednostima pečuraka, podrške lokalnih vlasti i države u proizvodnji pečuraka i ulagačkog kapitala u poređenju sa podrškom pri proizvodnji nekih drugih sirovina, kao što su kafa, čaj, duvan (UN APCAEM).

Proizvodnja pečuraka u evropskim i američkim zemljama prilično je jednolična, jer se bazira uglavnom na proizvodnji jedne vrste pečuraka (*A. bisporus*). U Severnoj Americi oko 98% proizvodnje pripada proizvodnji *A. bisporus*, nešto više od 1% *L. edodes* i oko 0,5% *Pleurotus*. Potpuno druga slika o proizvodnji pečuraka u azijskim zemljama se dobija na osnovu podataka datih u tabeli 2.

Svetsko tržište pečuraka 2001. godine procenjeno je na preko 40 milijardi dolara i može se podeliti na tri kategorije: jestive pečurke sa oko 30 milijardi dolara, proizvodi na bazi lekovitih pečuraka oko 10 milijardi dolara i divlje pečurke na oko 4-5 milijardi dolara (UN APCAEM). U kategoriju lekovitih pečuraka koje se najviše koriste svrstavaju se: *Auricularia auricular*, *T. versicolor*, *Flammulina velutipes*, *G. lucidum*, *G. frondosa*, *Hericium erinaceus*, *L. edodes*, *Poria*

cocos (Smith i saradnici, 2002). Tržišna vrednost lekovitih pečuraka i njihovih dijetetskih suplemenata stalno raste. Tako je ova vrednost 1994. godine iznosila je oko 1,2 milijarde dolara, da bi se 1999. godine uvećala za oko čak 5 puta i iznosila oko 6 milijardi dolara (Chang, 2006). Samo vrednost dijetetskih proizvoda na bazi pečurke *G. lucidum* 1995. godine iznosila je 1,6 milijardi dolara. Slični podaci dobijeni su i za pečurku *L. edodes*, kao i njene dijetetske suplemente. Najveća količina ovih proizvoda 1999. godine (gotovo 99%), prodavala se na tržištu Azije, a svega oko 1% na tržištu Severne Amerike. U kasnijim godinama primećen je rast u prodaji dijetetskih suplemenata na bazi pečuraka i na teritoriji Severne Amerike za oko 20% do 40% godišnje (UN APCAEM)

Tabela 2. Proizvodnja pečuraka u nekim Azijskim zemljama u 2003. godini (Chang, 2006; UN APCAEM)

Proizvodnja	Kina	Japan	S. Koreja	Tajvan
<i>Agricus</i>	12,8%	-	11,6%	4,0%
<i>Letinula</i>	21,5%	10,7%	24,6%	33,4%
<i>Pleurotus</i>	24,0%	1,6%	36,5%	4,2%
Ostale pečurke	41,8%	87,8%	27,3%	58,4%
Ukupno (t)	10.386,9	330.864	170.000	107.800

Na osnovu prikazanih podataka može se zaključiti da proizvodnja i upotreba pečuraka širom sveta intenzivno raste. Paralelno sa povećanjem proizvodnje povećava se i broj naučnih istraživanja kojima se potvrđuju značajna nutritivna i lekovita svojstva velikog broja različitih vrsta pečuraka, ali i stiču nova, značajna saznanja o ovoj vrednoj i još uvek nedovoljno iskorišćenoj prirodnoj sirovini.

2.4. SASTAV PEČURAKA

Namirnice koje se koriste u ljudskoj ishrani treba da budu veoma kvalitetne i da zadovoljavaju nekoliko osnovnih zahteva:

- da su izvor dovoljne količine kvalitetnih proteina koji predstavljaju gradivni materijal tela (*body building material*),
- da su izvor visoko energetske komponente (ugljenih hidrata i masti),
- da sadrže vitamine,
- da sadrže neorganske komponente koje su neophodne za održavanje zdravlja (UN APCAEM).

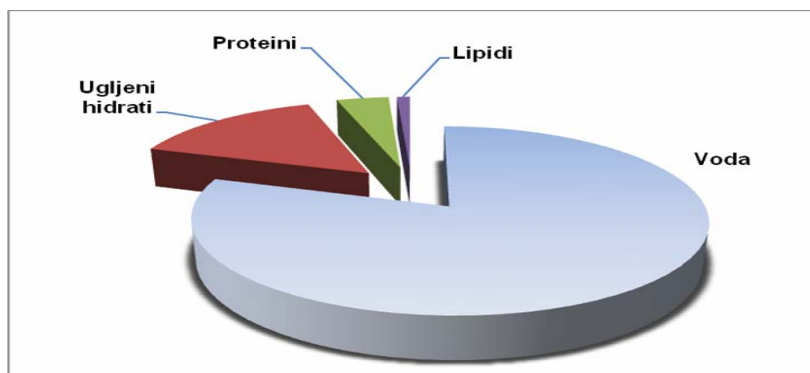
Pečurke zadovoljavaju sve navedene zahteve, pa se mogu smatrati kvalitetnim i značajnim namirnicama. Osim toga, one su se od davnina širom sveta cenile zbog svojih nutritivnih vrednosti i specifičnog ukusa. U nekim zemljama, poput Kine i Japana, predstavljaju nezamenljivu namirnicu koja se svakodnevno i intenzivno koristi, i to kao osnovna hrana, kao dodatak supama ili u obliku čaja. Neke vrste pečuraka, poput belih i crnih tartufa, predstavljaju

pravi delikates, a cena jednog kilograma ovih retkih pečuraka može dostići i više hiljada eura. Kao namirnica najviše se koriste uzgajane pečurke i to šampinjon (*A. biosporus*), mada je sve veća potražnja za kvalitetnim, neobičnim i veoma ukusnim divljim pečurkama (crna truba, lisičica, sunčanica, smrčkak, itd.).

Hemijski sastav pečuraka određuje njihovu hranljivu vrednost i organoleptičke osobine, a razlikuje se u zavisnosti od vrste gljive, podloge na kojoj se razvija, atmosferskih uslova, starosti i faze sakupljanja.

2.4.1. SUVA MATERIJA I SADRŽAJ VODE

Suva materija je jedan od osnovnih parametara za karakterisanje sirovog materijala u odnosu na hemijski sastav. Sveže gljive mogu da sadrže 10 - 20% suve materije, a nekad i manje, odnosno od 70% do 95% vode u zavisnosti od vremena sakupljanja i uslova sredine u kojoj su se razvijale (slika 5). Ovaj procenat sadržaja vlage nešto je niži za pojedine vrste (*G. lucidum*, *Fomes fomentarius*, *Daedaleopsis confragosa*). U osušenim pečurkama sadržaj vlage je mnogo manji i iznosi od 10 do 13 % (UN APCAEM).



Slika 5. Prikaz osnovnog hemijskog sastava svežih pečuraka

2.4.2. PROTEINI I AMINOKISELINE

Proteini su važan sastojak suve materije kod pečuraka. Kao i kod mesa, proteini pečuraka imaju zadatak da vežu i zadržavaju vodu. Više od polovine ukupnog azota ulazi u sastav proteina. Visok sadržaj proteina i niska kalorična vrednost glavni su razlozi hranljivosti pečuraka. Sadržaj proteina zavisi od vrste pečuraka, od substrata na kome se razvijaju i vremena sakupljanja. Sadržaj proteina u svežim pečurkama iznosi od 1,75 do 5,9%. U odnosu na suhu materiju sadržaj proteina varira od 19 do 39%. U *Pleurotus ostreatus* i *A. bisporus*, vrstama koje se najčešće koriste u ishrani, sadržaj proteina je 11%, odnosno od 7 do 19,5% (Barros i saradnici, 2007). *Boletus edulis* sadrži visok udeo proteina, oko 28%. Najveći sadržaj proteina ima divlja vrsta pečurke *T. melanosporum* (5,5 g na 100 g sveže materije). Sadržaj proteina u svežim pečurkama je oko dva puta veći u odnosu na sadržaja proteina u luku (1,4%) i kupusu (1,4%), a oko 12 puta veći od sadržaja proteina u jabukama (0,3%). Sadržaj proteina u mesu i namirnicama

životinjskog porekla je: od 9 do 16% u svinjskom mesu, od 12 do 20% u goveđem mesu, od 18 do 20% u pilećem mesu i ribi i od 2,9 do 3,3% u mleku. Dakle, sadržaj proteina u svežim pečurkama je manji od sadržaja proteina u mesu, ali mnogo veći od sadržaja u ostalim često korišćenim namirnicama i mleku. Ukoliko se posmatra sadržaj proteina u pečurkama sračunat na suhu bazu, ovaj iznos je mnogo veći i iznosi od 19 do 35% (Miles i Chang, 1997).

Pečurke sadrže gotovo sve aminokiseline, jedino mogu biti limitirane u pogledu sadržaja amino kiselina koje sadrže sumpor, metionina i cisteina, ili izoleucina (Chang, 1997; Barros i saradnici, 2007). Osim esencijalnih aminokiselina u pečurkama se mogu naći i značajne količine lizina, alanina, arginina, glicina, histidina, glutaminske kiseline, asparaginske kiseline, prolina i serina. Zahvaljujući izbalansiranom sadržaju različitih aminokiselina pečurke se preporučuju u ishrani (Barros i saradnici, 2007).

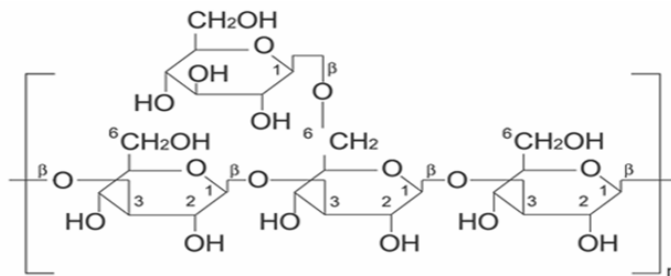
2.4.3. UGLJENI HIDRATI

Sveže pečurke sadrže od 3 do 21% ugljenih hidrata. U odnosu na suhu materiju sadržaj ugljenih hidrata je značajan i iznosi od 16 do 85%. Sadržaj ugljenih hidrata najčešće korišćenih jestivih svežih pečuraka iznosi od 3,8 do 6,7% kod *P.ostreatus* i od 2,6 do 5,2% kod *A.bisporus* (Manzi i saradnici, 2001). Divlje pečurke sadrže manju količinu ugljenih hidrata, pa tako, posmatrano na suhu materiju, *Xerocomus badius* sadrži 1,5%, *A. mellea* 16,4%, a *Coprinus atramentarius* 24,0% (Florczak i saradnici, 2004). Značajan deo ugljenih hidrata su dijetetska vlakna zbog čega je kalorijska vrednost pečuraka veoma niska. Ugljeni hidrati pečuraka se nalaze u obliku koji humani organizam može da koristi, najčešće u obliku polisaharida različitih veličina. Polisaharidi iz gljiva su pre svega glikogen i neki nesvarljivi oblici, kao što su hranljiva vlakna, celuloza, hitin, manani i glukani koji su važni za pravilno funkcionisanje digestivnog trakta. Od ugljenih hidrata najviše su zastupljene pentoze (ksiloze, riboze), heksoze, glukoza, fruktoza, galaktoza, manoza, dominantan je šećerni alkohol manitol, šećerne kiseline, amino-šećeri i hitin. Sadržaj manitola u *A. bisporus* iznosi od 3 do 30% sračunato na suhu materiju, zbog čega ova vrsta pečuraka ima slatkast ukus (Bernas i saradnici, 2006).

2.4.3.1. BETA GLUKANI

Među komponentama sa biološki aktivnim osobinama koje su izolovane iz pečuraka centralno mesto po lekovitom delovanju, a koje se odnosi prvenstveno na imunomodulatorno, a samim tim i antikancerogeno delovanje, pripada polisaharidima. Najznačajnijim polisaharidima pečuraka smatraju se β -glukani sa $\beta(1-3)$, $\beta(1-4)$ i $\beta(1-6)$ glikozidnim vezama (slika 6). Ovi polisaharidi naročito su efikasni u terapiji različitih oblika kancera, kao i mnogih drugih oboljenja. Ista jedinjenja pokazuju izraženo dejstvo u eliminisanju propratnih negativnih efekata hemoterapije (Smith i saradnici, 2002). 2001. godine dat je pregled od 650 vrsta pečuraka iz 182 različita genusa koje poseduju farmakološki aktivne polisaharide (Reshetnikov i saradnici, 2001). Biološki aktivni polisaharidi mogu biti izolovani iz plodonosnog tela pečurke, micelije ili kulture na kojoj raste. *P. ostreatus* sadrži značajne količine β -glukana (139 mg/100 g sveže materije), dok ih najčešće korišćena u ishrani pečurka *A. bisporus* sadrži malo (1,4 mg/100 g sveže materije) (Manzi i saradnici, 2001). Sadržaj β -glukana u lekovitoj pečurki *L. edodes* iznosi od 240 do 380 mg na 100 g sveže sirove materije (Ko i Lin, 2003).

Jačina antitumornog delovanja povezana je sa molekulskom masom glukana i njegovom rastvorljivosti u vodi. Povećana rastvorljivost u vodi povećava antitumornu aktivnost (Bohn i BeMiller, 1995). Smatra se da antitumorna aktivnost β -glukana potiče i iz helikoidalne konformacije spoljašnjeg lanca, ili, što je još važnije, od prisustva hidrofilnih grupa lociranih na spoljašnjoj površini heliksa.



Slika 6. Struktura β -D glukana

2.4.3.2. DIJETETSKA VLAKNA

Visokomolekularne komponente koje se nalaze u određenim namirnicama i koje se izbacuju iz ljudskog organizma bez prethodne digestije i absorpcije nazivaju se dijetetska vlakna. Pečurke sadrže dijetetska vlakna koja pripadaju klasi β -glukana, hitina i heteropolisaharida (pektinske supstance, hemiceluloza, poliuronidi, itd.). One čine od 10 do 50% suve materije. Većina aktivnih polisaharida iz pečuraka, rastvornih i nerastvornih u vodi, klasifikuju se kao dijetetska vlakna. Mnoge od ovih komponenata poseduju karcinostatičku aktivnost, što znači da absorbuju potencijalno karcinogene komponente i ubrzavaju njihovu ekskreciju iz creva. Prema tome, pečurke mogu imati značajnu ulogu u prevenciji kolorektalnog karcinoma (Mizuno, 1996). Sadržaj dijetetskih vlakana u pečurki *A. bisporus* iznosi 2,0 g, u *P. ostreatus* 4,1 g, odnosno 7,6 g u divljoj pečurki *A. mellea*, sračunato na 100 g sveže materije (Manzi i saradnici, 2001).

2.4.4. MASTI

Pečurke imaju veoma nizak sadržaj masti koji iznosi od 2 do 8%, sračunato na suhu materiju (Breene, 1990). Pečurka *P. ostreatus* ima mali sadržaj masnih komponenata (oko 2%), a *A. bisporus* još i manji (1,8%). Nešto veći sadržaj ovih komponenata nalazi se u divljim pečurkama *Boletus edulis* i *Chantarelus cibarus* (3,6, odnosno 2,6%) (Karkocha i Mlodecki, 1965). Pečurke sadrže sve lipidne komponente uključujući i slobodne masne kiseline, mono-, di- i tri-gliceride, sterole, estre sterola i fosfolipide. Najmanje 72% masnih kiselina čine nezasićene masne kiseline, koje su značajne za čovekovo zdravlje (Huang i saradnici, 1985). Među ovim komponentama pečuraka može se pronaći i lecitin, što je sa nutricionističke tačke gledišta vrlo značajno (Barasi, 1997). Lecitin pripada grupi fosfolipida i značajan je za mnoge biološke aktivnosti.

2.4.5. VITAMINI

Pečurke se smatraju značajnim izvorom vitamina, naročito vitamina B grupe i to tiamina (B1) i riboflavina (B2). Od ostalih vitamina ove grupe prisutni su piridoksin, pantotenska kiselina, folna kiselina i kobalmin. Pored ovih vitamina u pečurkama se mogu naći ergosterol, biotin, fitohinon i tokoferoli (Matilla i saradnici, 2001). Mišljenje je da se, uzimajući u obzir sadržaj tiamina, pečurke mogu smatrati vezom između kvasaca i namirnica biljnog porekla (Karkocha i Mlodecki, 1995). U pečurkama je takođe zapažena značajna količina vitamina PP (Bernas i saradnici, 2006). Ispitivanjem sadržaja vitamina nekoliko vrsta pečuraka najprisutnijih na tržištu utvrđeno je da *B. edulis* ima najveći sadržaj vitamina, a *L. edodes* najmanji (tabela 3, Bernas i saradnici, 2006).

Tabela 3. Sadržaj vitamina u nekim vrstama pečuraka sračunato na 100 g suve materije

Vitamin	<i>P. ostreatus</i>	<i>A. bisporus</i>	<i>L. edodes</i>	<i>B. edulis</i>	<i>C. cibarus</i>
B1, mg	0,9-4,25	0,56-0,60	0,60	1,25	0,58
B2, mg	2,5-2,84	4,39-5,10	1,80	9,36	5,58
B3, mg	65,0	39,7-43,0	31,0	69,5	47,0
B12, mg	0,6	0,8	0,8	-	-
Folacin, µg	640	450	300	-	-
D, µg	0,3	3,0	22,0-110,0	35,0	-
C, mg	20	17	25	-	-

Preporučena dnevna doza (*recommened daily intake-RDI*) tiamina, koja bi se trebala uneti hranom ili na drugi način, je oko 1,00 mg. RDI riboflavina je nešto veća i iznosi od 1 do 3 mg (Demirci, 2006). Preporučena dnevna doza niacina iznosi od 15 do 20 mg. Obzirom na RDI i sadržaj ovih vitamina u pečurkama, moglo bi se zaključiti da su one veoma korisne namirnice koje omogućavaju zadovoljenje dnevnih potreba za vitaminima ove grupe.

2.4.6. MIKRO- I MAKRO-ELEMENTI PEČURAKA

Minerali su neophodni u ishrani za normalno odvijanje metaboličkih funkcija, transmisiju nervnih impulsa, pravilno formiranje kostiju, regulaciju balansa vode i soli (Kalac i Svoboda, 2000). Pečurke su dobar izvor gvožđa, kalijuma, fosfora, magnezijuma, mangama, cinka i kalcijuma. Utvrđeno je da kalijum iz voća i povrća smanjuje krvni pritisak. Nizak nivo natrijuma i prisustvo velike količine kalijuma u pečurkama daje preporuku njihovoj upotrebi u antihipertenzivnoj ishrani (Genccelep i saradnici, 2009).

Sadržaj pepela u jestivim pečurkama varira između 5 i 13% sračunato na suhu materiju (Bernas i saradnici, 2006). Pečurka sa vrlo visokim sadržajem pepela je divlja pečurka *C. cibarus* (10,7%), dok *B. edulis*, vrlo zastupljena pečurka na našem području, sadrži nešto manje pepela (6,7%) (Rudawska i Laski, 2005). Sadržaj pepela utiče na unos minerala u organizam, jer se minerali prisutni u pepelu smatraju biodostupnim.

Mineralne komponente pečuraka mogu se podeliti na makroelemente i mikroelemente (Rudawska i Laski, 2005). Makroelementi ili makrokonstituenti su elementi koji su neophodni u relativno velikim količinama za normalno funkcionisanje fizioloških procesa ljudskog organizma. U makroelemente pečuraka spadaju: kalijum, natrijum, magnezijum, fosfor i sumpor. Mikroelementi, mikronutritijenti ili “*trace elements*”, su esencijalni sastojci hrane neophodni za normalno funkcionisanje organizma, a potrebni su u vrlo malim količinama. U mikroelemente pečuraka spadaju: bakar, kobalt, gvožđe, jod, mangam, molibden, cink i selen. Sadržaj makrokonstituenata kao što su natrijum, kalijum i fosfor je prilično konstantan, dok se sadržaj kalcijuma, magnezijuma i sumpora menja u zavisnosti od sastava supstrata na kome se pečurka razvija. Od mineralnih materija u pečurkama se u najvećim količinama mogu naći upravo makrokonstituenti, i to kalijum i fosfor (od 20 do 57%, odnosno oko 39% u pepelu) (Mattila i saradnici, 2001).

Mikroelementi pečuraka mogu imati važnu ulogu u prevenciji mnogih oboljenja biološkog sistema. Što se tiče mikroelemenata ustanovljeno je da neke pečurke imaju visok sadržaj selena, oko 26 µg/100 g, što čini oko 47% preporučenih dnevnih količina. Smatra se da su pečurke odličan izvor bakra i da sadržaj bakra iznosi i oko 0,5 mg/100 g suve materije, što čini oko 55% preporučenih dnevnih količina. Sadržaj esencijalnog cinka u nekim vrstama može da iznosi i oko 1,1 mg/100g suve materije, što čini oko 11% ukupnih dnevnih potreba za cinkom. Nedostatak mikroelemenata može da dovede do nastanka srčanih oboljenja, malignih bolesti, dijabetesa tipa 2 i povišenog krvnog pritiska.

Tabela 4. Sadržaj (mg/100g suve materije) mikro- i makro-elemenata u pečurkama

Mikro- i makro- elementi	<i>Pleurotus ostreatus</i>	<i>Agricus bisporus</i>	<i>Boletus edulis</i>	<i>Chantharellus cibarus</i>
Natrijum	44-144	76-86	12-52	4-14
Kalijum	2.722-5.100	3.500-4.520	2.376-3.900	5.400-5.900
Kalcijum	89-150	46-99	46-99	19-57
Fosfor	618-1339	969-1730	1024-1730	500-657
Magnezijum	128-190	91-124	100-120	110-120
Sumpor	210	450	450	-
Gvožđe	9-15	5-50	5-50	10-18
Cink	3-12	2-12	12	9-11

U tabeli 4 prikazan je sadržaj mikro- i makro-elemenata kod nekoliko vrsta pečuraka najčešće korišćenih u ishrani (Bernas i saradnici, 2006).

Pečurke sadrže gotovo svaki mineral koji se može naći na podlozi na kojoj rastu. Nivo mineralnih komponenata zavisi od vrste i starosti pečurke, veličine podzemnog dela i sastava podloge. U podzemnom delu pečurke nalazi se veća količina bakra, gvožđa, kalijuma, magnezijuma, fosfora i cinka, a u plodonosnom telu natrijuma. Poslednjih godina svetski trend je proizvesti pečurke sa dodatnom količinom određene željene komponente. Najčešće su u pitanju esencijalni mikroelementi. Wermer i Beelman (2002) izveštavaju o proizvodnji pečuraka obogaćenih selenom. Dodatkom jedinjenja natrijum selenita u supstrat (kompost) na kome se razvija pečurka omogućava se njegovo povećano usvajanja, a time i proizvodnja vrste koja će u sebi sadržati mnogo veću i tačno određenu količinu dodate željene komponente.

Gotovo svi mikro- i makro-elementi koji se mogu naći u pečurkama su uključeni u normalno funkcionisanje biološkog sistema i pozitivno deluju na određena fiziološka stanja. **Kalijum** je neophodan za održavanje kiselo-bazne ravnoteže u organizmu. Dnevne potrebe za kalijumom iznose 590 mg, a mogu biti i veće. Pečurke se smatraju bogatim izvorom kalijuma. Nedostatak kalijuma izaziva hipertenziju, srčanu aritmiju, mišićnu slabost, smanjenu pokretljivost creva itd. Višak kalijum izlučuje se preko zdravih bubrega. Ukoliko višak kalijuma, iz nekog razloga, ne može da se izluči iz organizma, može izazvati smetnje u sprovodnom sistemu srca. Dozvoljen dnevni unos kalijuma je 1.000 mg (*Dietary supplement fact sheet-DSFS*).

Dozvoljene dnevne količine **natrijuma** iznose 2.400 mg (DSFS). Sadržaj natrijuma u pečurkama je nizak, zbog čega se ova namirnica posebno preporučuje (Vetter, 2003).

Kalcijum je neophodan za pravilan razvoj kostiju, a utiče i na zgrušavanje krvi. Nedostatak kalcijuma izaziva rahitis kod dece, a kod odraslih dovodi do razređenja koštane mase i osteoporoze. Dozvoljen dnevni unos kalcijuma iznosi 1.000 mg (DSFS).

Gvožđe ulazi u sastav hemoglobina, mioglobulina i respiratornih enzima, i jedan je od najvažnijih oligoelemenata. Neophodan je sastojak važnih enzima i koenzima (peroksidi, citohrom) (Tasić i saradnici, 2004). Gvožđe može da vrši inhibiciju oksidacije LDL (*Low Density Lipoproteins*) na endotelnim ćelijama, a time i zaštitnu ulogu u procesima oksidativnog oštećenja ćelije (Thompson i saradnici, 1991). Osim toga, povećava otpornost prema bolestima, sprečava zamor i anemiju. Od unete količine gvožđa organizam apsorbuje samo 10%. Dozvoljen unos gvožđa dnevno je 18 mg za muškarce i 8 mg za žene, starije od 19 godina (DSFS).

Magnezijum predstavlja treći po redu mineral (posle fosfora i kalijuma) prisutan u pečurkama (Mattila i saradnici, 2001), a četvrti mineral po količini prisutan u telu. Oko 50% magnezijuma nalazi se u kostima. Druga polovina se nalazi u ostalim tkivima i organima. Oko 1% magnezijuma nalazi se u krvi. Magnezijum je potreban za više od 300 biohemijskih reakcija u organizmu. Omogućava normalno funkcionisanje mišića i nervnog sistema, podržava imunitet, čini kosti snažnim i omogućava odvijanje normalnog srčanog ritma. Smatra se da reguliše nivo šećera u krvi i da utiče na krvni pritisak (Saris i saradnici, 2000). Epidemiološka istraživanja pokazuju da magnezijum igra značajnu ulogu u regulaciji krvnog pritiska (Institute of Medicine, 1999). Magnezijum se smatra protektivnom komponentom kod dijabetesa tipa 2. Igra bitnu ulogu u metabolizmu ugljenih hidrata. Ova aktivnost utiče na oslobađanje i delovanje insulina, hormona koji kontroliše nivo šećera u krvi. Nizak nivo magnezijuma u krvi često se sreće kod osoba obolelih od dijabetesa (Kobrin i Goldfarb, 1990). Poznat je antistresni mineral. Magnezijum doprinosi zdravlju kardiovaskularnog sistema i pomaže u prevenciji od srčanih napada. U kombinaciji sa kalcijumom deluje kao prirodno sredstvo za umirenje. Mnoga istraživanja pokazuju da su visok nivo magnezijuma u krvi i mali rizik od koronarnih bolesti povezani. Takođe se smatra da visok dnevni unos magnezijuma u organizam smanjuje rizik od moždanog udara (Ascherio i saradnici, 1998). Preporučene dnevne doze magnezijuma su 400 mg za muškarce, odnosno 310 mg dnevno za žene između 19-30 godina starosti, a za osobe starije od 30 godina nešto veće (Institute of Medicine, 1999).

Cink se smatra jednim od osnovnih nutritivnih mikroelementa pečuraka. On je esencijalni sastojak biomembrana i neophodan je za njihovo održavanje i funkciju. Potreban je element za normalan metabolizam proteina i ugljenih hidrata, funkcionisanje žlezda (prostate), kao i za mnoge druge biološke funkcije. Najnovija istraživanja pokazuju njegovu važnu ulogu u funkcionisanju mozga, zbog čega se primenjuje u lečenju mentalnih poremećaja (npr. šizofrenije). Potreban je za sintezu DNK, a ima veliku ulogu u razvoju i funkcionisanju organa za reprodukciju. Cink je esencijalni oligoelement značajan za stabilizaciju membrana i aktivnost metaloenzima. *In vitro* ispitivanjima dokazano je da deficit cinka dovodi do oštećenja endotelne membrane (Leonhardt i saradnici, 1997). Smatra se da cink ima protektivno dejstvo u održavanju integriteta endotela i da je ovaj efekat u vezi sa aktivacijom citokina u uslovima oksidativnog stresa (Tasić i saradnici, 2004). Cink povećava broj odbranbenih T ćelija i njihovu efikasnost, pomaže u lečenju neplodnosti, čira na želucu, ubrzava zarastanje rana. Smatra se da oko 48%

globalne populacije ima rizik od nedostatka ovog esencijalnog elementa (Oteiza i Mackenzie, 2005). Dozvoljen dnevni unos cinka je 15 mg (DSFS).

Selen je esencijalni mikronutritijent koji je naročito interesantan u medicinskim istraživanjima i u poslednje vreme zanimljiv za industriju hrane (Beelman and Royse, 2006). Dnevne potrebe seleno su između 50 i 200 µg (Tasić i saradnici, 2004). Pozitivno delovanje i uticaj na mnoštvo fizioloških funkcija vezuje se prvenstveno za antioksidativnu aktivnost seleno. U sklopu toga selen je neophodan sastojak glutation-peroksidaze i mišićnog citohroma, što mu daje poseban značaj u uslovima oksidativnog oštećenja, posebno karcinogeneze i kardiovaskularnih oboljenja. Glutation-peorksidaza se nalazi u mnogim ćelijama (eritrociti, leukociti, makrofagi, trombociti i druge), pa nedostatak seleno može dovesti do brojnih poremećaja (hemolize eritrocita, poremećaja homeostaze, edema, peroksidacije kapilarnih membrana, oštećenja jetre, itd.). Eksperimentalne studije su pokazale da je nedostatak seleno u vezi sa kardiomiopatijom, naglom smrću, kao i sniženim brojem i funkcijom T-limfocita (Alissa i saradnici, 2003). Utvrđeno je da su kod bolesnika sa akutnim infarktom miokarda značajno niže koncentracije seleno u eritorcitima i serumu (Bor i saradnici, 1999). Eksperimentalna i klinička istraživanja pokazuju da je pojava i smrt uzrokovana kancerom pluća, kolorektalnim kancerom i kancerom prostate mnogo manja kod osoba koje imaju visok dnevni unos seleno (Russo i saradnici, 1997; Knekt i saradnici, 1998; Shamberg, 1985). Naučnici pretpostavljaju da selen utiče na kancer na dva načina. Kao antioksidant selen deluje protektivno u odnosu na oštećenja koja mogu da prouzrokuju slobodni radikali. Selen može da uspori rast kancera. Drugo delovanje seleno vezuje se za određene produkte razlaganja preko kojih deluje na povećanje i poboljšanje imuniteta organizma (Combs i saradnici, 2001). Selen spada u grupu antioksidanata koja može pomoći u smanjenju oksidacije LDL holesterola (oksidovana forma proteina niske gustine) i time pomoći u prevenciji koronarne arterijske bolesti (Neve, 1996).

2.4.7. AROMATIČNE KOMPONENTE

Pečurke sadrže specifične aromatične komponente. Ove komponente imaju značajnu ulogu u odabiru i konzumaciji od strane krajnjih potrošača. Aromatične komponente nemaju značajnu hranljivu vrednost, ali stimulišu apetit jer pečurkama daju karakterističan ukus i miris. Identifikovano je oko 150 aromatičnih komponenti u raznim vrstama pečuraka. Najznačajnije aromatične komponente u pečurkama su terpeni, ugljovodonici formirani od izoprenskih jedinica, kao i zasićene i nezasićene masne kiseline (Jong and Birmingham, 1993). Neke od značajnijih aromatičnih komponenta su oktavalentni alkoholi i karbonilna jedinjenja, kao što su 1-oktanol, 3-oktanol, 3-oktanon, 1-kaprinol-3-ol, 1-oktanol-3-ol, 2-oktanol-3-ol i 1-kaprinol-3-on. 1-oktanol-3-ol je tipična aroma za sveže vrganje (*B. edulis*) i u većim količinama se pojavljuje u mladim plodovima. Sa starenjem pečurke količina te aromatične komponente se smanjuje (Mau i Hwang, 1997). Aroma pečuraka takođe zavisi i od sadržaja aminokiselina, nukleotida i nekih drugih elemenata, kao što su azot, fosfor, kalijum, sumpor, gvožđe, cink, ali i od autooksidacije nezasićenih masnih kiselina. Na prisustvo i sadržaj aromatičnih komponenta pečuraka utiču, kao i na gotovo sve ostale komponente pečuraka, sastav podloge na kojoj rastu, spoljašnji uslovi, kao i genetske varijacije (Jong and Birmingham, 1993).

2.4.8. ENZIMI

Enzimski sistem pečuraka čine enzimi: oksidaze, lipaze koje razgrađuju masti, invertujuć i proteolitički enzimi. Najviše je ispitivana koncentracija i aktivnost polifenoloksidaze. Dejstvo ovog enzima zasniva se na katalizi fenolnih komponenata oksidacije što uzrokuje ubrzano tamnjenje šumskih pečuraka čime se menjaju njihove senzorne i hranljive karakteristike (Espin i Witchers, 1999). Različite vrste pečuraka karakteriše različita aktivnost ovog enzima. Poređenjem aktivnosti u slučaju tri najčešće korišćene pečurke utvrđeno je da je aktivnost ovog enzima najveća kod pečurke *A. bisporus*, a nešto manja kod pečuraka *P. ostreatus* i *L. edodes*.

2.4.9. KALORIJSKA VREDNOST

Zahvaljujući velikom sadržaju vode i maloj kalorijskoj vrednosti pečurke se smatraju dobrom dijetetskom namirnicom. Uzgajane vrste pečuraka *A. bisporus* i *P. ostreatus* se karakterišu srednjom kalorijskom vrednošću od 125-151 J/100 g (Manzi i saradnici, 2001). Pečurke koje se mogu pronaći u šumskom staništu (*Suillus luteus*, *Morchella esculenta*, *C. cibarus* i *Lactarius deliciosus*) imaju malu kalorijsku vrednost koja iznosi od 46 do 59 J/100 g sveže materije. Kalorijska vrednost često konzumirane divlje jestive pečurke *B. edulis* iznosi 71 J/100 g. Pečurka sa visokom kalorijskom vrednošću je *T. melanosporum*, ili crni tartuf (234 J/100 g) (Elmadfa i Fritzche, 1999).

2.5. LEKOVITO DELOVANJE I NOSIOCI LEKOVITOG DELOVANJA PEČURAKA

Lekovito delovanje pečuraka ogleda se kroz nekoliko osnovnih delovanja:

1. imunomodulatorno,
2. antioksidativno,
3. antikancerogeno,
4. kardiovaskularno,
5. hepatoprotektivno,
6. antimikrobno delovanje.

Bioaktivne, odnosno lekovite komponente prisutne u pečurkama su:

1. polisaharidi velike molekulske mase,
2. polisaharidni-protein kompleksi,
3. glikoproteini,
4. imunomodulatorni proteini,
5. triterpenoidi,
6. antioksidativne komponente,
7. određeni mikroelementi,
8. druge specifične komponente pečuraka.

Mnoge bioaktivne komponente identifikovane i izolovane iz pečuraka mogu ispoljavati više različitih lekovitih delovanja.

2.5.1. ANTIOKSIDATIVNO DELOVANJE

U smislu antioksidativnog delovanja pečuraka većina naučnih istraživanja bavila se ispitivanjem antioksidativnog delovanja metanolnih, vodenih i etanolnih ekstrakata različitih vrsta pečuraka primenom različitih metoda i na različitim reaktivnim vrstama. Istraživanja antioksidativnog delovanja ovako dobijenih ekstrakata pečuraka pokazuju da su za antioksidativno delovanje pečuraka i njihovih različitih ekstrakata odgovorna uglavnom fenolna jedinjenja i prisutne organske kiseline (Valentao i saradnici 2005). Ispitivanjem antioksidativnog delovanja heksanskog ekstrakta pečuraka utvrđeno je da 90 do 96% ovog delovanja potiče od ergosterola, kao i njegovih analoga prisutnih u pečurkama (Suqin i saradnici 2010). Pored ergosterola, heksanski ekstrakt pečuraka sadrži i druge lipofilne komponente, npr. masne kiseline (Kavishree et al, 2008). Smatra se da masne kiseline ne doprinose antioksidativnom delovanju ekstrakata pečuraka. Primenom DPPH metode utvrđeno je da je IC_{50} vrednost ergosterola 0,112 mg/ml što ga svrstava u red mnogo slabijih antioksidanata u odnosu na fenole i tokoferole (Li i saradnici 2007).

Pored nabrojanih komponenata sa jakim (fenoli), ili slabim antioksidativnim delovanjem (jedinjenja ergosterolne strukture), antioksidativno delovanje pečuraka vezuje se za još neke specifične komponente pečuraka.

2.5.1.1. SLOBODNI RADIKALI I MEHANIZMI NJIHOVOG DELOVANJA

Da bi se razumelo delovanje i značaj antioksidanata, pa i antioksidanata prisutnih u pečurkama, u terapiji i prevenciji mnogih bolesti savremenog čoveka, neophodno je detaljno upoznati izazivače ovih bolesti, odnosno reaktivne vrste, njihovu strukturu, kao i mehanizam delovanja.

Paradoks metabolizma ogleda se u tome što se normalno funkcionisanje živih sistema ne može odvijati bez kiseonika, a s druge strane isti taj kiseonik je veoma reaktivan molekul koji šteti živim organizmima preko reaktivnih oblika kiseonika koji iz njega ili njegovim posredstvom mogu nastati (Sies, 1993). Široki spektar patoloških promena, kao što su karcinogeneza i degradacija ćelija vezana za proces starenja i samo starenje, uzrokovane su upravo reaktivnim kiseonikovim oblicima, odnosno vrstama (ROS-radical oxygen species). ROS nastaju pod delovanjem sunčeve svetlosti, ultravioletnog i jonizujućeg zračenja, hemijskih reakcija i metaboličkih procesa (Sarafian i Bredesen, 1994).

ROS se mogu podeliti na reaktivne slobodnoradikalske vrste i neradikalske vrste (oksidaciona sredstava koja lako mogu preći u slobodne radikale). U tabeli 5 dat je pregled neradikalskih i slobodnoradikalskih reaktivnih kiseonikovitih vrsta.

Tabela 5. Reaktivne kiseonikove vrste (ROS)

Neradikalske ROS	Slobodnoradikalske ROS
Vodonik peroksid, H ₂ O ₂	Superoksid radikal, $\cdot\text{O}_2^-$,
Hipohloritna kiselina, HClO	Hidroksil radikal, OH \cdot ,
Ozon, O ₃	Peroksil radikal, ROO \cdot ,
Singletni kiseonik, $^1\text{O}_2$	Alkoksil radikal, RO \cdot ,
	Hidroperoksil radikal, HO ₂ \cdot

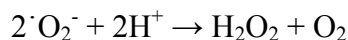
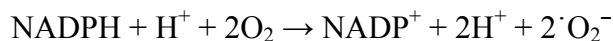
Slobodnoradikalske reaktivne kiseonikove vrste su vrlo nestabilni reaktivni oblici koje poseduju nesparen elektron, odakle i potiče njihova reaktivnost. U slobodno radikalske vrste spadaju slobodni radikali, kao što su superoksid anjon radikal ($\cdot\text{O}_2^-$), hidroksil radikal ($\cdot\text{OH}$), hidroperoksil radikal (HO₂ \cdot), peroksil radikal (RO₂ \cdot), alkoksil radikal (RO \cdot), itd. U reaktivne kiseonikove neradikalske vrste spadaju vodonik peroksid (H₂O₂), ozon (O₃), hipohloritna kiselina (HOCl) i druga jedinjenja.

U biološkim sistemima se produkcija slobodnih radikala dešava tokom raznih procesa: oksidoredukcije u prisustvu metala sa promenljivom valencom, lipidne peroksidacije nezasićenih masnih kiselina, apsorpcije zračenja, oksidativne fosforilacije u mitohondrijama, fagocitoze, metabolizma etanola, enzimskih reakcija koje katalizuju oksidaze, itd. Reaktivni slobodni radikali nastaju brojnim reakcijama koje se uglavnom svode na četiri osnovna tipa: termolizu, fotolizu, oksido-redukcione procese i radijaciju visoke energije (Piletić i saradnici, 1993).

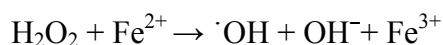
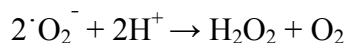
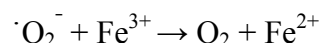
Slobodni radikali nastaju na različite načine i mogu biti različite reaktivnosti. Superoksid anjon radikal i hidroksil radikali postoje u gotovo svim aerobim organizmima. Jedan od osnovnih činilaca uključenih u produkciju reaktivnih kiseoničnih vrsta u ćelijama je prolaz molekuskog kiseonika kroz elektron-transportni niz u mitohondrijama, pri čemu se kao sporedni proizvod stvara minimalna količina superoksid anjon radikala ($\cdot\text{O}_2^-$) (Cadenas i Davies, 2000). Takođe, ovaj radikal može nastati i u toku reakcije kiseonika sa jonima prelaznih metala, aktivnošću nekih enzima, u toku degradacije oksihemoglobina, itd. (McCall i Frei, 1999). Superoksid anjon radikal u medijima poput citoplazme slab je oksidant, a mnogo je snažnije redukciono sredstvo koje je u stanju da redukuje komplekse gvožđa poput citohroma c. U ćelijskim oksidacionim reakcijama superoksid anjon radikal se formira prvi, a njegov efekat može biti uvećan produkcijom drugih radikalskih vrsta i oksidujućih agenasa. Hidroperoksil radikal, HO₂ \cdot , je radikal slabiji po reaktivnosti od hidroksilnog, a jači od superoksidnog radikala. Smatra se da su hidroksil radikali najreaktivniji radikali, nespecifični prema većini biomolekula i radikali koji najviše štete prouzrokuju u biološkim sistemima (Liu i saradnici, 1997; Nunoshiba i saradnici, 1999). Superoksid radikal ($\cdot\text{O}_2^-$) pripisuju se i pozitivne i negativne biološke funkcije, dok se

aktivnost hidroksil radikala ($\text{OH}\cdot$) vezuje za isključivo negativne biološke funkcije zbog njegove visoke reaktivnosti (Halliwell i Gutteridge, 1999).

Neradikalska reaktivna kiseonična vrsta, H_2O_2 , može da nastane u sledećoj reakciji uz prisustvo superoksid anjon radikala (Štefan i saradnici, 2007):



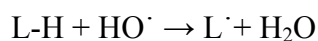
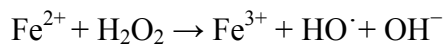
H_2O_2 , prisutan u biološkim sistemima deluje kao pokretač u produkciji drugih ROS. U prisustvu reaktivnog metalnog jona Fe^{3+} (ili Cu^{2+}) iz H_2O_2 i superoksid radikala dolazi do nastanka hidroksil radikala (Božin, 2004). Reakcija u kojoj dolazi do nastanka veoma opasne i reaktivne radikalske vrste, odnosno hidroksil radikala, je reakcija Fentonovog tipa, Haber-Weiss-ova reakcija, gde se Fe^{3+} redukuje sa $\cdot\text{O}_2^-$ do Fe^{2+} i ponovo oksiduje u prisustvu H_2O_2 :



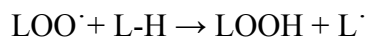
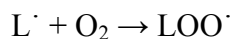
Uz reaktivne kiseonikove vrste veliki značaj imaju i reaktivne vrste azota, od kojih su najvažniji $\text{NO}\cdot$ i $\text{NO}_2\cdot$.

ROS, ili slobodni radikali, imaju različite mehanizme delovanja. Jedna od najpoznatijih slobodnoradikalskih reakcija u biološkom sistemu je lančana reakcija peroksidacije lipida. Ona se odvija kroz tri stupnja (inicijacija, propagacija i terminacija).

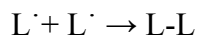
I – stupanj inicijacije

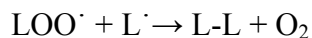


II – stupanj propagacije



III – stupanj terminacije





$2\text{LOO}^\cdot \rightarrow$ neradikalni proizvodi

Prema prikazanim lančanim reakcijama u prvom stupnju inicijacije, slobodni radikal, ili neki destruktivni spoljašnji faktori, započinju reakciju lipidne peroksidacije u kojoj dolazi do razrušavanja strukture viših masnih kiselina. Lipidna peroksidacija je proces koji može uticati na fluidnost ćelijske membrane, a time i na odvijanje mnogih biohemijskih procesa. U toku ovog procesa kao produkti razlaganja nastaju i mnoga karbonilna jedinjenja sa citotoksičnim efektom (Božin, 2004).

ROS u pojedinim fiziološkim uslovima imaju značajnu ulogu, aktivno učestvuju u odbrani organizma od infekcija inaktiviranjem mikroorganizama i imaju važnu ulogu u regulaciji i inhibiciji respiracije i apoptoze mitohondrija. Značajna je i njihova uloga u biosintezi aktivnih molekula, kao što su prostaglandini (Halliwell, 1994). Određen fiziološki nivo ROS je od velikog značaja za regulaciju ćelijskih funkcija (intracelularne signalizacije, aktivacije transkripcije i ćelijske proliferacije) (Herrera i saradnici, 2001).

2.5.1.2. ANTIOKSIDANTI I MEHANIZMI NJIHOVOG DELOVANJA

Biološki sistemi poseduju kompleksne mehanizme kojima kontrolišu prekomernu produkciju slobodnih radikala, a time i sprečavaju negativne procese do kojih prekomerna količina radikala može da dovede. Ovi sistemi odbrane obuhvataju: antioksidativni sistem, enzime, proteine i druge biomolekule, koji su u stanju da inhibiraju stupanj inicijacije, propagacije ili obnavljaju strukture oštećene dejstvom slobodnih radikala.

Kompleksni mehanizmi antioksidativne zaštite aerobnih organizama mogu se podeliti u dve grupe. Prvu grupu obuhvataju sistemi primarne zaštite u koju spadaju enzimski i neenzimski sistemi. Enzimski sistemi koji u biološkim sistemima imaju funkciju uklanjanja toksičnih oblika kiseonika su: superoksid dismutaza (SOD), glutation peroksidaza (GSHPx), katalaza (CAT) i citohrom oksidaza. Ovi enzimski sistemi deluju na sledeći način:

- ✓ superoksid dismutaza omogućava neutralisanje superoksid anjona uz produkciju kiseonika i H_2O_2 ;
- ✓ Glutation peroksidaza uklanja H_2O_2 neradikalnu ROS, kada je prisutna u malim koncentracijama. Ovaj enzimski sistem uklanja organske hidroperokside;
- ✓ Katalaza uklanja H_2O_2 prisutan u velikim koncentracijama;
- ✓ Citohrom oksidaza sprečava oslobađanje reaktivnih ROS tokom redukcije O_2 u H_2O (Štefan, 2007).

U primarnu antioksidativnu zaštitu ubrajaju se i još neki enzimi (npr. selenijum-nezavisna GSHPx, glutation reduktaza, redukovani glutation (GSH) i glukoza-6-fosfat dehidrogenaza), kao i albumin, mokraćna kiselina i bilirubin (Primiano i saradnici, 1997). Nedostatak ovi kompleksnih sistema je što su nedovoljni za potpunu zaštitu organizma od slododnoradikalnog delovanja.

Druga grupa jedinjenja, ili jedinjenja sekundarnog sistema antioksidativne zaštite, čine mnoga niskomolekularna jedinjenja (tokoferoli, karotenoidi, ubihinon (koenzim Q10), L-askorbinska kiselina, fenoli, flavonidi i dr.), kao i neki enzimski sistemi koji učestvuju i u ispravljanju nastalog oksidativnog oštećenja nukleinskih kiselina, proteina i lipida (Božin, 2004).

Postoji i podela antioksidanata na: unutarćelijske antioksidante, membranske antioksidante i izvanćelijske antioksidante. U unutarćelijske antioksidante spadaju već spomenuti enzimski sistemi. U membranske antioksidante spadaju vitamin E, β -karoten i koenzim Q10. Membranski antioksidanti se svojim lipofilnim delovima integrišu u membranske strukture delujući u njima lokalno. Vitamin E reaguje sa peroksil radikalima brže nego što oni uspevaju da reaguju sa nezasićenim masnim kiselinama i proteinima (Štefan i saradnici, 2007). Osnovna uloga izvanćelijskih antioksidanata jeste da zadržavaju gvožđe i bakar u nereaktivnim oblicima, čime sprečavaju njihovo dalje delovanje sa vodonikperoksidom i superoksid radikalom.

Po opštoj definiciji antioksidativnim komponentama se mogu smatrati sve one komponente koje su u stanju da spreče proces oksidacije (Fraga i Oteiza, 2002). Antioksidanti, ili antioksidativni sistemi sprečavaju formiranje ROS ili ih uklanjaju pre nego što oštete vitalne komponente ćelija (Sies, 1993). Međutim, ROS učestvuju i u korisnim i neophodnim procesima koji omogućavaju normalno funkcionisanje ćelija, funkcija antioksidanata bi se pre mogla definisati kao funkcija u cilju održavanje nivoa ROS na optimalnom nivou.

Delovanje antioksidanata zasniva se na njihovoj sposobnosti da:

- ✓ deluju kao hvatači “skevindžeri” slobodnih radikala, odnosno donori elektrona ili H-atoma peroksil ili hidrokstil radikalima,
- ✓ deluju kao akceptori elektrona ili H-atoma ugljenikovih slobodnih radikala,
- ✓ razgrađuju hidroperokside lipida nastale u stupnju propagacije,
- ✓ kompleksiraju jone metala (čime je onemogućeno stvaranje inicijatora oksidacije, npr. $\cdot\text{OH}$ radikala),
- ✓ eliminišu dejstvo singletnih oblika kiseonika, inhibiraju neke enzime (Cheesman i Slater, 1993).

U zavisnosti od sposobnosti rastvaranja u vodi, antioksidanti se dele na hidrofilne i hidrofobne. Hidrofilni antioksidanti deluju sa oksidantima u citosolu ćelije i krvnoj plazmi, dok hidrofobni antioksidanti štite membranu ćelije od procesa lipidne peroksidacije (Sies, 1997). U najpoznatije hidrofilne radikale spadaju: glutation, vitamin C, polifenoli, bilirubini, urati, glukoza, selen, itd. (Štefan i saradnici, 2007).

Ravnoteža koja u biološkim sistemima postoji između antioksidativnog zaštitnog sistema organizma i produkcije slobodnih radikala može da se poremeti. Poremećaj ravnoteže prouzrokovan je endogenim izvorima ili stresnim faktorima okoline. Ovo stanje narušene ravnoteže je uzrok nastanka mnogih oboljenja i naziva se oksidativni stress, koji se opisuje i kao stanje u kome generacija slobodno radikalskih vrsta prevazilazi sposobnost sistema (organizma) da ih neutrališe ili eliminiše (Sies, 1985).

Negativno delovanje prekomerno proizvedenih slobodno radikalnih vrsta vrlo lako može dovesti do neželjenih dejstava, odnosno poremećaja na ćelijskim strukturama i biomolekulima. Ova destrukcija slobodnih radikala odnosi se prvenstveno molekule proteina, lipida, ugljenih hidrata, itd. Oksidacija tiolnih grupa proteina dovodi do disfunkcije enzima i proteinskih molekula, kao i do poremećaja u transmembranskom i jonskom transportu. Oksidativno razlaganje DNK dovodi do oštećenja genoma odnosno, mutacije i karcinogeneze. Usled oksidativne destrukcije polisaharida dolazi do poremećaja i gubitka njihove funkcije i gubitka viskoznosti hijaluronske kiseline (Božin, 2004).

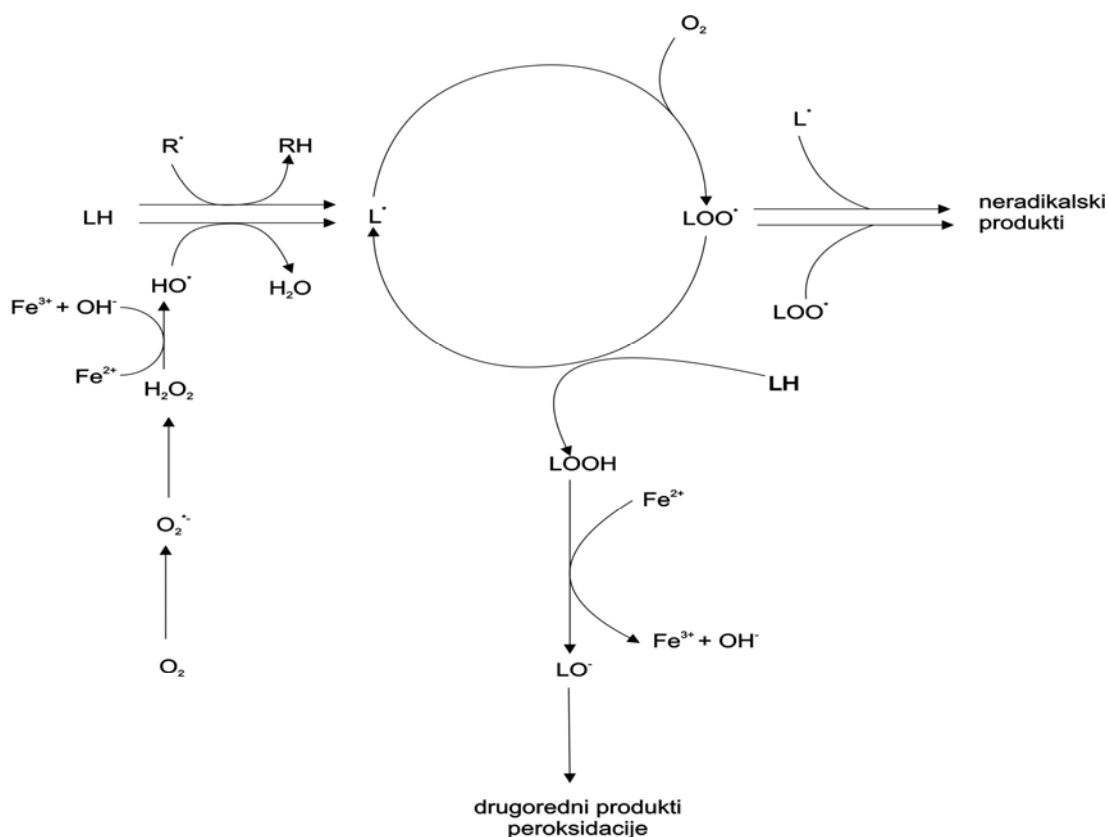
Prekomerna produkcija slobodnih radikala u vezi je sa nizom patofizioloških stanja (neurodegenerativne bolesti, mailgnitet, dijabete melitus i ateroskleroza) (Suay i Arenal, 2000). Veliki broj naučnih studija ukazuju na direktnu vezu između slobodnih radikala (superoksid i hidrosil) i inflamacije, šoka i ishemije (Cuzzocrea i saradnici, 2001). Zbog prethodno navedenog i mnogih drugih procesa koji se dovode u vezu sa ROS, odnosno slobodnim radikalima, kontrolisana produkcija slobodnih radikala vrlo je bitna za normalno funkcionisanje biološkog sistema. Kontrolisana produkcija slobodnih radikala ima značajnu ulogu u fiziološkim procesima i imunom odgovoru organizma (Dröge, 2002).

Kao nosioci antioksidativnih komponenata antioksidativni suplementi su od velikog značaja, jer sadrže antioksidativne komponente i u stanju su da spreče štetno delovanje slobodnoradikalnih vrsta (Zhao i saradnici, 2008).

Značaj antioksidativnih komponenata prirodnog porekla u poslednje vreme sve više raste, obzirom da je za neke od često korišćenih sintetičkih antioksidanata, naročito u prehrambenoj industriji (butilovani hidroksianizol (BHA) i butilovani hidroksitoluen (BHT)) utvrđeno da poseduju određene toksične osobine.

2.5.1.3. LIPIDNA PEROKSIDACIJA

Lipidna peroksidacija je proces peroksidacije membranskih lipida izazvan lančanom reakcijom koju su započele ROS i u kojoj dolazi do reakcije sa nezasićenim masnim kiselinama. U normalnim uslovima ROS, kao što su vodonik peroksid i superoksid radikal, nisu sposobne da započnu reakciju lipidne peroksidacije. Za proces lipidne peroksidacije se smatra da je najčešće odgovoran mnogo reaktivniji hidroksil radikal, OH^\cdot , ali ga mogu izazvati i HO_2^\cdot , RO^\cdot i RO_2^\cdot . Hidroksil radikal reaguje sa višestruko nezasićenim masnim kiselinama, dok su zasićene masne kiseline mnogo otpornije na delovanje ROS. Proces lipidne peroksidacije odvija se slobodnoradikaliskim mehanizmom koji je objašnjen u delu o slobodnim radikalima. Na slici 7 prikazan je proces lipidne peroksidacije (Šefan i saradnici, 2007).



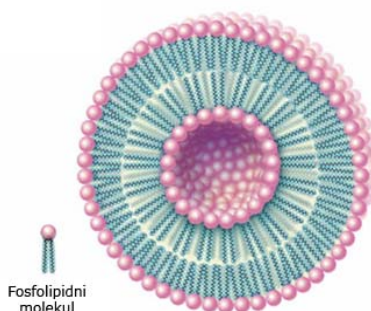
Slika 7. Lipidna peroksidacija

U lipidnim strukturama započinjanje peroksidacijskog niza odnosi se na napad ROS-a, sposobnog da izdvoji atom vodonika iz metilenske grupe ($-\text{CH}_2-$). Tako iz višestruko nezasićenih masnih kiselina nastaju slobodni radikali. Prisustvo dvostrukih veza u masnim kiselinama slabi C-H vezu u blizini dvostruke veze, što premeštanje vodonika čini lakšim.

U biološkim sistemima intenzivna lipidna peroksidacija dovodi do gubitka fluidnosti, opadanja vrednosti membranskog potencijala, povećanja permeabilnosti prema H^+ i drugim jonima,

moгуće konačne repture ćelije i otpuštanja njenog unutrašnjeg sadržaja. Povećana lipidna peroksidacija dovodi se u vezu sa nizom oboljenja, npr. nastankom aterosklereoze.

Ispitivanje procesa lipidne peroksidacije najčešće se vrši na membranskim modelima poput lipozoma. Lipozomi predstavljaju dobre modele membrana obzirom da ispoljavaju selektivnost na jone, osmotsko oticanje i odgovor na veliki broj faktora koji ubrzavaju ili usporavaju gubitak jona ili molekula na način koji bar kvantitativno imitira njihovu aktivnost u prirodnim membranskim sistemima. Pored toga, lipozomi omogućavaju laku manipulaciju u smislu jednostavnog menjanja sastava membranskih lipida, menjanja pH vrednosti, temperature, kao i sadržaja različitih jedinjenja na definisan način (Božin, 2004). Na slici 8 prikazana je struktura lipozoma.

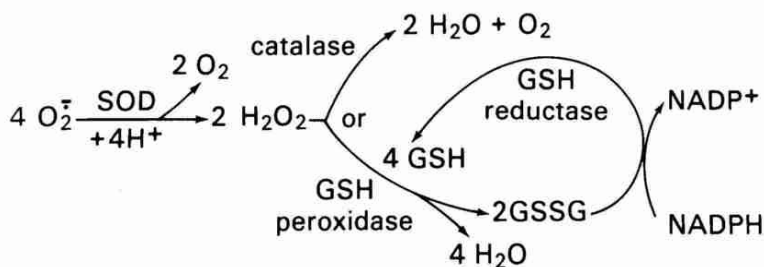


Slika 8. Lipozom

2.5.1.4. CINK I SELEN KAO ANTIOKSIDANTI U PEČURKAMA

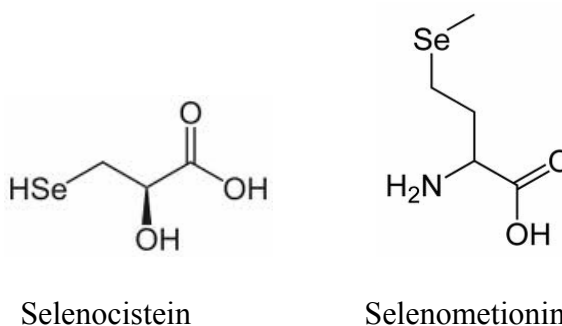
Cink i selen se vrlo često nazivaju i antioksidativnim nutritijentima, i pored toga što ne poseduju antioksidativnu aktivnost, jer se njihovo antioksidativno delovanje ispoljava samo u vezi sa određenim enzimima, najčešće glutation peroksidazom i superoksid dismutazom (SOD).

Cink ima nekoliko značajnih funkcija u biološkom sistemu. Nalazi se u sastavu mnogih proteina, pa je njegova funkcija strukturalna, a učestvuje i u katalizi. Značajan je fiziološki konstituent antioksidativnog odbrambenog sistema. Vežan za membranu cink ima nekoliko uloga: strukturalnu, regulatornu i antioksidativnu (Oteiza i Mackenzie, 2005). Cink je sastavni element superoksid dismutaze, enzima u kome se nalazi kao metalni jon ili kofaktor. SOD pripada klasi enzima koji učestvuju u razgradnji superoksid anjona, pri čemu nastaje kiseonik i vodonik peroksid (Bannister i saradnici, 1987). SOD je prisutna u gotovo svim aerobnim ćelijama i ekstracelularnim fluidima. Pored cinka kofaktori ovog enzima mogu biti bakar, mangan ili gvožđe. SOD koja sadrži bakar ili cink kao kofaktore nalazi se u citosolu ili ekstracelularnim fluidima (Johnson i Giulivi, 2005). Na slici 9 prikazan je antioksidativni odbrambeni sistem koji uključuje SOD.



Slika 9. Antioksidativni enzimski odbrambeni sistem

Nedostatak cinka menja aktivnost i koncentraciju enzima i drugih komponenata antioksidativnog odbrambenog sistema i dovodi do povećanog oksidativnog oštećenja lipida, proteina i DNK (Ho i Ames, 2002). Ovaj nedostatak dovodi do povećanja ćelijskih oksidanata, pri čemu se povećanje odvija na nivu reaktivnih kiseoničnih (ROS) i reaktivnih azotni vrsta (RNS) (Oteiza i saradnici, 2000; Zago i Oteiza, 2001; Ho i Ames, 2002). Povećana produkcija reaktivnih vrsta usled nedostatka cinka nastaje veoma brzo. Nedostatak cinka menja mitohondrijalnu funkcija što dovodi do povećanja reaktivnih vrsta, smanjuje se ekspresija komponenata respiratornog lanca i menja se aktivnost enzima koji su uključeni u metabolizam ROS (Oteiza i saradnici, 2000). Pored ovih uloga, cink učestvuje i u izgradnji metalotionena, proteina koji je bogat cisteinom, i koji ima skevindžer sposobnost oksidanata, kao i sposobnost vezivanja aktivnih redoks metala (Oteiza i Mackenzie, 2005). Cink može da zameni aktivne redoks metale na vezujućim mestima membrane. Zahvaljujući ovoj sposobnosti inhibira proces lipidne peroksidacije, jer sprečava jone gvožđa i bakra da se vežu za fosfolipide membrane (Oteiza i saradnici, 2001). Takođe, cink sinergistički deluje sa hidrofobnim α -tokoferolom i hidrofilnim epikatehinom u prevenciji Fe^{2+} indukovane lipidne oksidacije (Zago i Oteiza, 2001).

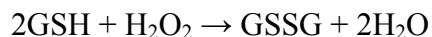


Slika 10. Struktura selenocisteina i selenometionina

Selen svoju antioksidativnu ulogu ispoljavaju preko aminokiseline selenocisteina (kao sastavni deo antioksidativnog enzima tioredoksinreduktaze) i selenometionina, koji su značajan integralni deo protektivnih enzima (slika 10) (Klotz i saradnici, 2003).

Selen je konstitutivni deo enzima glutathion peroksidaze, vrlo važnog enzima sistema antioksidativne odbrane. Za funkcionisanje glutathion peroksidaze neophodan je glutathion kao kofaktor i selen lociran u aktivnom centru i kovalentno vezan za enzim. Glutathion peroksidaza je

vrlo efikasan skevindžer vodonik peroksida (Brigelius Flohe, 1999). Glutation peroksidaza koja sadrži selenocistein, katališe redukciju vodonik peroksida do vode, a organske hidroperoksidge (ROOH) redukuje do odgovarajućih alkohola (ROH). Kosupstrat za enzimsko delovanje je redukovani glutation (GSH), koji se oksiduje u glutation dipeptid (GSSG):



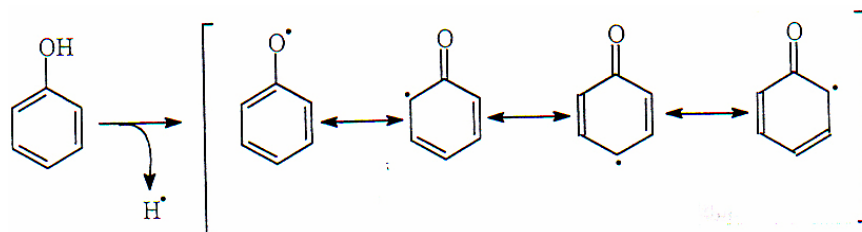
Proteini koji sadrže selen podeljeni su u tri grupe: proteine u koje je selen ugrađen nespecifično, proteine sa specifično vezanim selenom i „prave selenoproteine“ koji sadrže selen u formi selenocisteina. Selenoproteini imaju značajnu ulogu u nizu bioloških procesa, između ostalog i u spomenutim procesima antioksidativne odbrane. Jedan od prvih identifikovanih selenoproteina bila je upravo glutation peroksidaza (Brenneisen i saradnici, 2005).

2.5.1.5. POLIFENOLNA JEDINJENJA KAO ANTIOKSIDANTI U PEČURKAMA

Polifenolne komponente, ili fenoli, predstavljaju heterogenu grupu sekundarnih metabolita, prisutnih u gotovo svim biljkama, koji mogu da deluju kao antioksidanti ili neki drugi agensi i da svojim različitim mehanizmima delovanja doprinose antikarcinogenezi i kardioprotektivnom delovanju (Rice Evans i saradnici, 1995). Jedinjenja ove grupe danas se mogu smatrati najzanimljivijim i najznačajnijim fitokomponentama (Dimitros, 2006).

Poznato je više od 8.000 fenolnih jedinjenja, koja se po svojoj strukturi veoma razlikuju, od jednostavnih molekula kao što su fenolne kiseline do visoko polikondenzovanih jedinjenja kao što su tanini. Osnovna i najznačajnija osobina jedinjenja ove grupe je upravo njihovo antioksidativno delovanje. Smatra se da postoji oko 4.000 jedinjenja koja pripadaju ovoj grupi sekundarnih metabolita koja su antioksidanti (Williams i saradnici, 2004). Istraživanja polifenolnih jedinjenja novijeg datuma, koja obuhvataju eksperimente na humanom organizmu, potvrđuju da fenolna jedinjenja imaju nedvosmisleno pozitivan uticaj na zdravlje. Potreban dnevni unos polifenolnih komponenata iznos od 20 mg do 1 g (Hertog i saradnici, 1993).

Osnovna strukturalna karakteristika fenolnih jedinjenja je da se sastoje iz bar jednog aromatičnog prstena (C6) sa jednom ili više hidroksilnih grupa (slika 11). Složenije strukture se mogu naći i u obliku kompleksa sa ugljenim hidratima, proteinima i drugim komponentama biljaka.



Slika 11. Osnovna strukturalna karakteristika fenolnog jedinjenja

Postoje različite klasifikacije fenolnih jedinjenja, ali se u kao najznačajnija može navesti podela na: fenolne kiseline, flavonoidi, stilbeni, tanini (Kim i saradnici, 2008). Razlike između pojedinih grupa potiču od broja i položaja hibroksilnih grupa, kao i od prirode i veličine alkilovanog ili glikozilovanog dela strukture. Ove razlike uzrok su i različitog antioksidativnog delovanja.

Polifenolna jedinjenja u odnosu na antioksidativno delovanje su multifunkcionalna, što znači da deluju kao redukujući agensi, kvenčeri singelton kiseonika, antioksidanti donori vodonika, a imaju i osobine heliranja metala (Rice Evans i saradnici, 1995). Da bi se polifenolna jedinjenja definisala kao antioksidanti moraju da zadovoljavaju dva osnovna uslova:

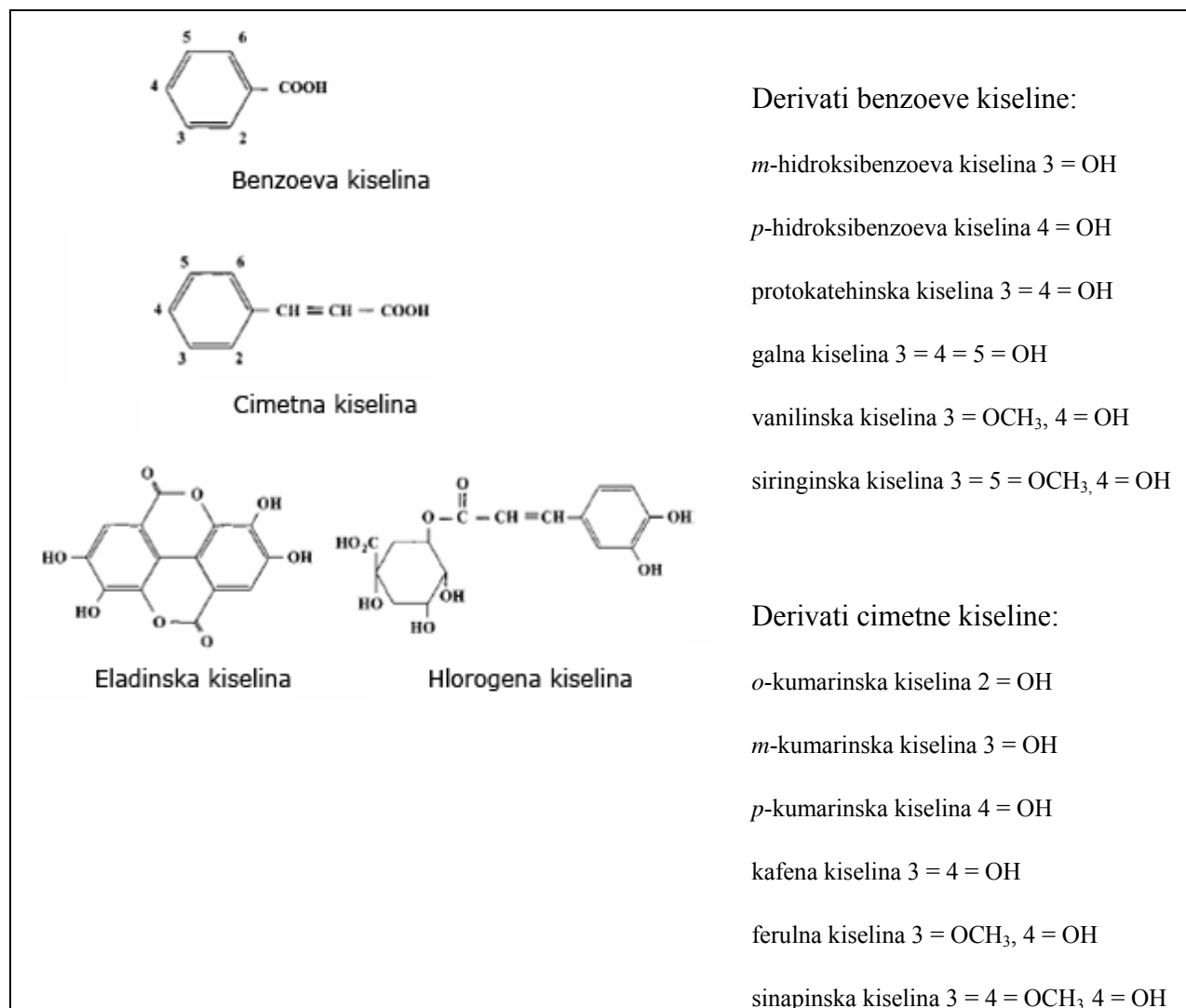
1. Prvi uslov je da prisutni u malim koncentracijama u substratu mogu da odlože, uspore ili spreče delovanje slobodnih radikala (Halliwell i Gutteridge, 1990).
2. Drugi uslov je da novonastali radikal (radikal nastao nakon delovanja antioksidanta) mora da bude stabilan (Shahidi i Wanasudara, 1992).

Ekstrakcija fenolnih jedinjenja iz biljnog materijala je aktuelan problem. Rastvarači koji se često koriste za ekstrakciju fenolnih komponenata iz biljnog materijala su etanol, etil acetat, metanol, aceton, voda i drugi. Na rastvorljivost fenolnih jedinjenja utiče ekstragens (odnosno njegova polarnost), stepen polimerizacije fenola, kao i interakcija fenola sa drugim komponentama i formiranje nerastvornih kompleksa. Iz ovog razloga ne postoji jedinstven i potpuno zadovoljavajući postupak koji je pogodan za ekstrakciju svih fenola ili određene vrste fenolnih jedinjenja iz biljnog materijala (Shahidi i Wanasudara, 1992).

U poslednje vreme pečurke se istražuju kao atraktivan izvor prirodnih antioksidativnih komponenata. Antioksidativnim osobinama i antioksidativnim komponentama pečuraka bavila su se mnoga istraživanja (Yen i Hung, 2000; Mau i saradnici, 2002; Cheung i saradnici, 2003; Cheung i Cheung, 2005; Lo i Cheung, 2005). Gotovo sva ova istraživanja osnovu antioksidativnog delovanja pečuraka pronalaze u jedinjenjima fenolne strukture (Kim i saradnici, 2008; Barros i saradnici 2007, Mau i saradnici, 2002; Cheung i saradnici, 2003; Cheung i Cheung, 2005; Lo i Cheung, 2005, Turkoglu i saradnici, 2007).

Fenolne kiseline i flavonoidi čine najznačajniju grupu polifenolnih jedinjenja. Fenolne kiseline su hidroksilovani derivati benzojeve i cimetne kiseline (slika 12) (Matilla i saradnici, 2002). Najčešći derivat hidroksicimetne kiseline je *p*-kumarinska kiselina, kafena i ferulna kiselina, a najpoznatija iz ove grupe kiselina je hlorogenska kiselina. Derivati hidroksibenzojeve kiseline u hrani su prisutni u obliku glikozida. Najčešće se sreću *p*-hidroksibenzojeva kiselina, vanilinska i protokatehinska kiselina (Herman, 1989).

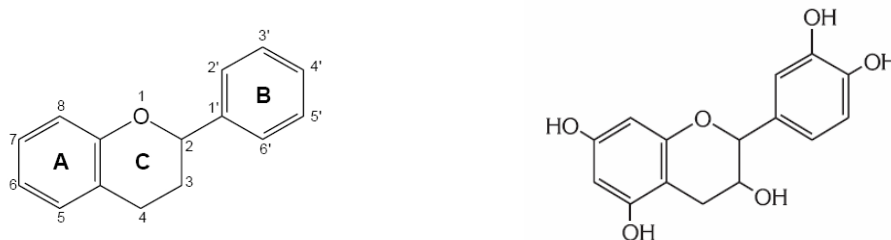
Antioksidativna aktivnost fenolnih kiselina zavisi od hemijske strukture jedinjenja, između ostalog broja hidroksilnih grupa i njihovog položaja, prisustva metoksi grupa, prirode grupe između aromatičnog prstena i karboksilne grupe, itd.



Slika 12. Hemijska struktura fenolnih kiselina

O uticaju strukture ovih komponenata na antioksidativnu aktivnost svedoči nekoliko sledećih podataka. Antioksidativna aktivnost raste sa povećanjem broja hidroksilnih grupa, pa derivati dihidroksibenzoeve kiseline imaju veću antioksidativnu aktivnost u odnosu na derivate hidroksibenzoeve kiseline. Galna kiselina, kao 3,4,5-trihidroksi benzoeva kiselina, ima jače antioksidativno delovanje od derivata dihidroksibenzoeve kiseline, što je u skladu sa prethodnom tvrdnjom, i smatra se benzoevom kiselinom sa najjačim antioksidativnim delovanjem. Monohidroksibenzoeve kiseline sa hidroksilnom grupom u *orto* i *para* položaju ne pokazuju antioksidativnu aktivnost, odnosno nemaju osobinu H-donora. Za razliku od njih *m*-hidroksibenzoeva kiselina, zbog *meta* položaja OH grupe, poseduje antioksidativnu aktivnost. Inkorporacija metilenske grupe između aromatičnog prstena i karboksilne grupe smanjuje uticaj karboksilne grupe, čime se gotovo udvostručuje antioksidativna aktivnost (Rice Evans i saradnici, 1995).

Flavonoidi predstavljaju najznačajniju grupu fenolnih jedinjenja. Osnovni strukturni skelet flavonoida čine 15 atoma ugljenika u osnovnoj C₆-C₃-C₆ strukturi, od kojih devet pripada benzopiranskom prstenu (benzenski prsten A kondenzovan sa piranskim prstenom C), a ostalih šest ugljenikovih atoma čine benzenski prsten B povezan sa benzopiranskim prstenom na poziciji dva (flavoni, flavonoli, flavononi, dihidroflavoni, flavani i antocijanidini), na poziciji tri (izoflavoni) i na poziciji četiri (neoflavoni) (slika 13).



Slika 13. Osnovna struktura flavonoida i katehina kao jednog od najzastupljenijih jedinjenja ove grupe

U prirodi se najčešće sreću jedinjenja sa hidroksilnim grupama u 3' i 4' položaju na B prstenu i nešto manje sa jednom hidroksilnom grupom u položaju 4' B prstena. Šećerna komponenta flavonoida je najčešće vezana u položaju 3 i ređe u položaju 7. Kao šećerna komponenta najčešće se javlja glukoza, a ređe galaktoza, ramnoza i ksiloza (Hermann, 1989).

Utvrđeno je da su flavonoidna jedinjenja efikasni skevindžeri superoksid i peroksil radikala, da imaju inhibitorni efekat na proces lipidne peroksidacije, kao i sposobnost heliranja metala. Kao i u slučaju fenolnih kiselina, antioksidativno delovanje jedinjenja ove grupe zavisi od strukturnih karakteristika.

Dokaz protektivnog delovanja flavonoida *in vivo* su epidemiološka istraživanja holandskih naučnika koja pokazuju da su koronarne bolesti i dnevni unos flavonoida obrnuto proporcionalni (Hertog i saradnici, 1993). Zahvaljujući skevindžer aktivnosti hidroksil radikala utvrđeno je da flavonoidi, kao i gotovo sva ostala fenolna jedinjenja, poseduju veliki broj bioloških aktivnosti: vazodilatorno, antikancerogeno, antibakterijsko, antiinflamatorno, antialergijsko, antivirusno, imunostimulatorsko, antialergijsko, itd. (Ho i saradnici, 1992; Brown, 1980; Middelton i Kandaswami, 1992).

Smatra se da su fenolne komponente osnovni nosioci antioksidativnog delovanja pečuraka. Dokazano je postojanje linearne korelacije između sadržaja ukupnih fenola i antioksidativnog delovanja pečuraka ili njihovih ekstrakata (Baros i saradnici, 2007). Vrlo je malo podataka o konkretnim pojedinim fenolnim komponentama prisutnim u pečurkama i njihovim ekstraktima. Jedno od istraživanja koja su se bavila ovom temom bilo je istraživanje Matile i saradnika (2001). Ovim istraživanjem utvrđeno je da pečurke *A. bisporus*, *P. ostreatus* i *L. edodes* kao

fenolne komponente sadrže *p*-hidroksi benzoevu kiselinu, protokatehinsku i kafenu kiselinu. Sadržaj *p*-hidroksi benzoeve kiseline iznosio je od 51 do 790 µg/100 g suve materije, sadržaj protokatehinske kiseline od oko 30 do 139 µg/100 g suve materije, a sadržaj kafene kiseline od 50 do 82 µg/100g suve materije (Mattila i saradnici, 2001.) Primenom HPLC metode Kim i saradnici (2008) su utvrdili da je jedno od najprisutnijih fenolnih jedinjenja u lekovitim i jestivim pečurkama (*L. edodes*, *P. ostreatus*, *G. lucidum*, *A. blazei*) galna kiselina, ali da je, u skladu sa prethodno spomenutim istraživanjem Matilla i saradnika, česta i protokatehinska kiselina. Ostale fenolne komponente prisutne su u malom udelu.

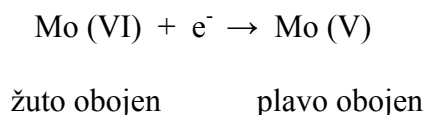
2.5.1.6. OSTALE ANTIOKSIDATIVNE KOMPONENTE PEČURAKA

Pečurke su u stanju da akumuliraju različite fitokomponente. Pored derivata fenola, kao nosioca antioksidativnog delovanja prisutni su terpeni, steroidi, poliketidi, β-karoten, tokoferoli, askorbinska kiselina i neke specifične antioksidativne komponente pečuraka, kao što je ergotionen. Većina od ovih komponenata su prisutne u različitim pečurkama, odnosno njihovim ekstraktima u relativno malim količinama.

Sadržaj tokoferola u metanolnim ekstraktima pečuraka kao što su *A. bisporus*, *P. ostreatus*, *Polyporus squamosus* i *Russula delica* kreće se od 4 do 9 mg/g. Najveći sadržaj tokoferola određen je u metanolnom ekstraktu pečurke *A. bisporus* (Elmastas i saradnici, 2006). Utvrđeno je da je sadržaj β-karotena u pečurkama i njihovim ekstraktima veoma nizak. U suvim uzorcima nekoliko vrsta pečuraka (*Pleurotus* i *Polyporus*) iznosi do 2 mg/g, dok u pojedinim vrstama nije ni detektovano njegovo prisustvo. Sadržaj askorbinske kiseline u pečurkama je takođe veoma nizak (Mau i saradnici, 2002).

2.5.1.7. METODE ZA ODREĐIVANJE SADRŽAJA FENOLNA I ANTIOKSIDATIVNOG DELOVANJA

Jedna od najčešće korišćenih metoda za **određivanje sadržaj ukupnih fenolnih komponenata** u pečurkama je metoda po **Folin-Ciocalteu** (Singelton i Rosi, 1965). Ova metoda po se zasniva na redukujućoj sposobnosti OH grupa, odnosno merenju redukujućeg kapaciteta polifenolnih jedinjenja, čijom disocijacijom nastaje proton i fenoksidni anjon. Formiran fenoksidni anjon redukuje Folin-Ciocalteu reagens, koji je žuto obojen, do plavo obojenog jona (Fenol – MoW₁₁O₄₀)⁴⁻. Ova reakcija je prikazana na slici 14.

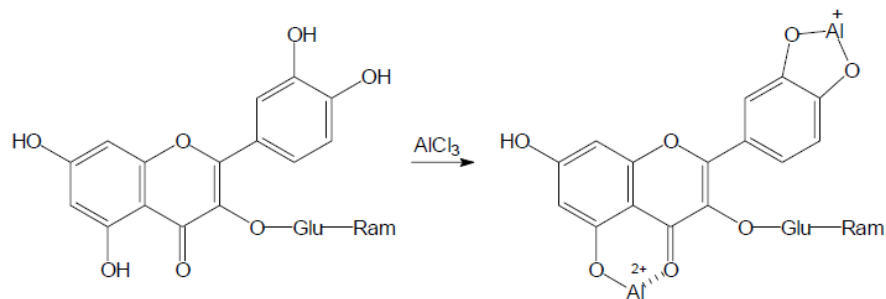


Slika 14. Reakcija po Folin-Ciocalteu

Reakcija na kojoj se zasniva merenje ukupnih fenolnih komponenata nije specifična, jer na isti način sa Folin–Ciocalteu reagensom mogu da reaguju još neka jedinjenja. Da bi se odredio **sadržaj pojedinačnih fenolnih komponenata** u nekom uzorku potrebna je primena preciznije

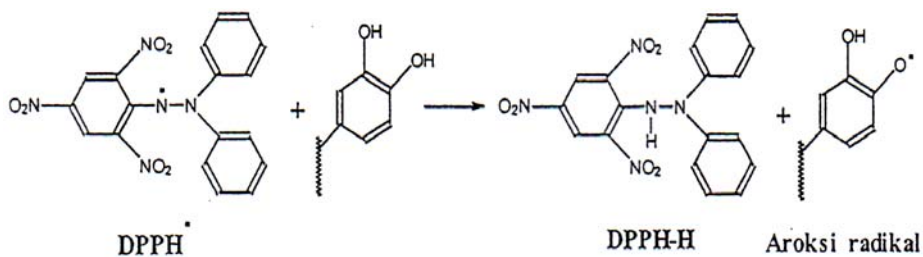
analitične metode, odnosno HPLC (High Pressure Liquid Chromatography), koja je i najčešće korišćena metoda za određivanje sadržaja pojedinačnih fenolnih komponenata. Fenolne komponente se, nakon razdvajanja na odgovarajućoj koloni, detektuju primenom različitih vrsta detektora: UV-VIS detektora sa fotodiodnim nizom (PDA), diodnim nizom (DAD), kao i UV fluorescentnim detektorom. Utvrđena je prednost HPLC/DAD tehnike u pogledu preciznosti određivanja fenolnih komponenata, a primena DAD detektora obezbeđuje skeniranje celog UV-VIS područja, od 210 do 650 nm (Živković, 2009). Za strukturno određivanje fenolnih komponenata može se koristiti HPLC/MS (masena spektrometrija), koja se karakteriše dobrim razdvajanjem i osetljivošću, a poseduje i veliku selektivnost zahvaljujući MS detektoru.

Sadržaj ukupnih flavonoida, kao fenolnih komponenata sa najjačim antioksidativnim delovanjem, se najčešće određuje primenom kolorimetrijske metode po Markham-u (1989, koja zasniva na osobini flavonoida da sa metalima, naročito Al^{3+} , grade odgovarajuće metalo-komplekse (slika 15).



Slika 15. Reakcija flavonoida (rutina) sa Al^{3+} metalnim jonom

Antioksidativna aktivnost se određuje se primenom različitih metoda. Jedna od najčešće korišćenih je **DPPH metoda**. Ova metoda se zasniva na neutralizaciji slobodnih DPPH radikala primenom DPPH testa po Espin-u (2000). DPPH \cdot (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) je relativno stabilan slobodni radikal. Primenu DPPH \cdot radikala radi utvrđivanja skevindžer kapaciteta prirodnih antioksidanata koristio je još pre oko pola veka Blois (1958). Danas gotovo sva istraživanja koja se tiču antioksidativnog delovanja započinju svoje preliminarno ispitivanje primenom ove metode.



Slika 16. Struktura DPPH radikala i reakcija sa slobodnim radikalom

Ovo je veoma jednostavna i brza spektrofotometrijska metoda u kojoj se nastale promene mogu i vizuelno pratiti. Stabilni DPPH[•] radikal je ljubičasto obojen. U prisustvu antioksidativne komponente, usled doniranja H atoma, dolazi do transformacije ovog radikala u DPPH-H formu, koja je žuto obojena (slika 16). Ova promena praćena je smanjenjem apsorbance na ispitivanoj talasnoj dužini. Za razliku od laboratorijski generisanih slobodnih radikala, kao što su superoksid i hidroksil radikal, upotreba ovog stabilnog radikala ima svoje prednosti jer na njega ne mogu uticati sporedne reakcije (heliranje od strane metala ili enzimska inhibicija). Antioksidativna aktivnost određena primenom ove metode izražava se preko RSC vrednosti (kapacitet “hvatanja” radikala, ili *Radical Scavenging Capacity*) koja se izračunava primenom jednačine:

$$RSC(\%) = \frac{100 - (A_{sample} \times 100)}{A_{blank}}$$

gde je A_{sample} absorbanca ispitivanog uzorka, a A_{blank} absorbanca kontrole.

Na osnovu dobijenih RSC vrednosti izračunavaju su IC_{50} vrednosti. Prema FDA (Food and Drug Administration) IC_{50} vrednost je koncentracija koja je potreban za inhibiciju 50% radikala u *in vitro* uslovima.

Kao preciznija metoda za određivanje antioksidativne aktivnosti koristi se **EPR spektroskopija** (Electron Paramagnetic Resonance Spectroscopy). EPR spektroskopija je analitička metoda koja se može koristiti za praćenje različitih fizičkih i hemijskih procesa (npr. oksido-redukcionih procesa i slobodnoradikalskih reakcija), kao i za određivanje strukture paramagnetnih supstanci. Primenljiva je za sve paramagnetne sisteme koji imaju zbirni elektronski spinski moment različit od nule. EPR tehniku karakteriše velika osetljivost (10^{-12} mol/l), nedestruktivno delovanje i mala masa uzorka potrebna za analizu (Živković, 2009). Za EPR spektralnu analizu antioksidativnog delovanja na hidroksil i superoksid radikal, radikale koji su osnovni uzročnici oštećenja u biološkim sistemima, neophodno je primeniti *spin trapping* metodu. Po ovoj metodi nestabilni radikali “hvataju se” pomoću određenih organskih jedinjenja tzv. *spin trapova*, nakon čega nastaju stabilni radikali, koji imaju duže vreme života od nestabilnih, i koji se mogu detektovati i pratiti. EPR *spin trapping* eksperiment obuhvata sledeće:

1. Odabrani radikal ($\cdot\text{OH}$ ili $\cdot\text{O}_2^-$) se proizvodi pomoću hemijskog generatorskog sistema. Njegov sadržaj određuje se na osnovu amplitude EPR signala koji potiče od *spin trap adukta* formiranog u reakciji sa radikalom.
2. Isti postupak se ponavlja uz dodatak uzorka (npr. ekstrakta), čije se inhibitorno delovanje određuje, i koji bi trebao da dovede do smanjenja EPR signala, ukoliko ispitivani uzorak inhibira određenu količinu nastalih radikala.

Sposobnost ispitivanih uzoraka da uklone određenu vrstu slobodnih radikala određena je na osnovu amplitude EPR signala koji potiče od *spin trap adukta*, sa ili bez dodatka ispitivanog uzorka. Rezultati se izražavaju preko relativane inhibicije (RI), koja predstavlja relativno smanjenje sadržaja radikala u sistemu i izračunava se na osnovu jednačine:

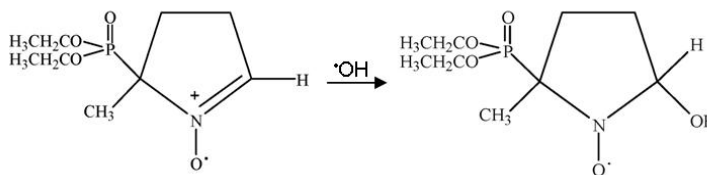
$$RI = \frac{PA_{rgs} - PA_{rgs+e}}{PI_{rgs}}$$

gde je: PA_{rgs} – pik amplitude (radikal generatorski sistem); PA_{rgs+e} – pik amplitude (radikal generatorski sistem + ekstrakt); PI_{rgs} – pik intenzitet (radikal generatorski sistem).

Skevindžer sposobnost $\cdot\text{OH}$ radikala određuje se pomoću Fenton-ove reakcije kao generatorskog sistema ove radikalske vrste. Ova reakcija se može prikazati na sledeći način:



Kao *spin trap* najčešće se koristi DEPMPO (5-dietoksifosforil-5-metil-1-pirolin-N-oksid). DEPMPO reaguje sa formiranim $\cdot\text{OH}$ radikalom pri čemu nastaje DEPMPO/OH adukt (slika 17).



Slika 17. Nastajanje DEPMPO/OH adukt.

Skevindžer sposobnost $\cdot\text{O}_2^-$ radikala najčešće se testira pomoću hipoksantin/ksantin oksidaza (HX/XO) reakcije kao generatorskog sistema ove radikalske vrste. Skevindžer aktivnost interpertrirana je preko RI vrednosti. Kao *spin trap* i u slučaju ovog radikala najčešće se koristi DEPMPO. DEPMPO reaguje sa formiranim $\cdot\text{O}_2^-$ radikalom pri čemu nastaje DEPMPO/OOH adukt.

EPR metoda je tehnika koja se koristi i za ispitivanje procesa lipidne peroksidacije. Kao generatorski sistem i u ovom slučaju koristi se Fenton-ova reakcija jer produkuje hidroksil radikale koji su najčešći uzročnici ovog procesa.

Za ispitivanje redukcionne moći pečuraka najčešće korišćena metoda je *Reducing power* po Oyaizu (Vidović i saradnici, 2010). Ova metoda se zasniva na praćenju redukcionne sposobnosti ispitivanog uzorka na transformaciju $\text{Fe}^{3+} \rightarrow \text{Fe}^{2+}$. Kao mera redukcionne sposobnosti koristi se EC_{50} vrednost koja predstavlja koncentraciju ispitivanog uzorka pri kojoj se postiže apsorbanca od 0,5 na talasnoj dužini od 700 nm. Redukcionna sposobnost ispitivanog uzorka najčešće se poredi sa redukcionom sposobnošću poznate antioksidativne komponente.

2.5.2. KARDIOVASKULARNO DELOVANJE

Veoma značajno lekovito delovanje pečuraka ogleda se i u pozitivnom uticaju na hipertenziju, uticaju na smanjenje holesterola, antidijabetičkom delovanju i uticaju na regulisanje srčanog protoka i srčanih aritmija.

Koronarna bolest arterija danas se smatra jednim od najčešćih uzroka smrti u razvijenim zemljama, a uzrokuju je dijabetes, visoki krvni pritisak, hiperholesterolemija, dislipoproteinemija, itd. (Alberts i saradnici, 1980). Gotovo 2/3 ukupnog holesterola u najvećem broju slučajeva endogenog je porekla. Inicijalni korak u prevenciji i lečenju koronarne bolesti arterija i hiperholesterolemije je modifikacija nutritivnog unosa i ishrana siromašna u mastima i zasićenim masnim kiselinama i bogata dijetetskim vlaknima. Pečurke, a posebno neke vrste (*Pleurotus*, *Letinula* i *Griofola*) zbog visokog sadržaja dijetetskih vlakana, prisustva sterola, proteina, mikroelemenata, kao i male kalorijske vrednosti, gotovo su idealno dizajnirana hrana za prevenciju kardiovaskularnih bolesti (Hobbs, 1995; Breene, 1990).

Kada se kontrolisana ishrana ne može koristiti u terapijske svrhe, primenjuju se lekovi. Regulacija poremećenog holesterola odnosi se na inhibiciju sinteze holesterola inhibitorima poput HMG-CoA (mikrozomalni enzim 3-hidroksi-3metilglutaril-koenzim A) reduktaze (Rodwell i saradnici, 1976). Mevilonin, proizveden komercijalno od *Aspergillus terreus*, je bio prvi specifični inhibitor HMG-CoA reduktaze, a time i lek koji je dobio odobrenje da može biti korišćen u terapiji hipoholesteremije (Alberts i saradnici, 1980). Nekoliko pečuraka genusa *Pleurotus* proizvode mevilonin (Gunde Cimerman i Cimerman, 1995). Pozitivno delovanje pečurke *Pleurotus* utvrđeno je u kliničkom istraživanju u kome je u periodu od mesec dana pacijentima sa dijagnozom hiperholesterolemija uz svakodnevnu ishranu davano 15-20 g osušenog suplementa *Pleurotus*. U većini slučajeva došlo je do smanjenja hiperholesterolemije (Bobek i saradnici, 1998). Iz ovih razloga pečurke genusa *Pleurotus* smatraju se prirodnim komponentama u humanoj ishrani za snižavanje nivoa holesterola (Gunde-Cimerman, 1999).

Polisaharidi izolovani iz pečuraka *Tremella fuciformis* i *Tremella aurantia* imaju antilipidemijski efekat, odnosno utiču na snižavanje nivoa holesterola u plazmi (Kiho i saradnici, 1995). Oдавno je utvrđeno da eritadenin, komponenta izolovana iz etanolnog ekstrakta pečurke *L. edodes*, ima sposobnost smanjenja nivoa holesterola u krvnom serumu, ali ne inhibicijom biosinteze holesterola, već ubrzanjem ekskrecije unetog holesterola i njegovom metaboličkom dekompozicijom (Susuki i Oshima, 1974). Različita istraživanja pokazuju da pečurka *L. edodes* utiče i na smanjenje krvnog pritiska i slobodnog holesterola u plazmi, kao i da ubrzava akumulaciju lipida u jetri. U jednom istraživanju kardiovaskularnog delovanja pečuraka od 17 ispitivani vrsta makrofungi, 16 je pokazalo bar jedan od sledećih efekata: sposobnost da utiče na smanjenje hiperholesterolemije, sposobnost da smanjuje arterijalnu hipertenziju ili hiperglikemiju, sposobnost normalizacije poremećene agregacije trombocita (Smith i saradnici, 2002).

Nukleinske kiseline u pečurkama su takođe značajne lekovite komponente koje mogu pronaći svoju primenu u terapiji i prevenciji kardiovaskularnih bolesti. Utvrđeno je da nukleinske kiseline iz *L. edodes* imaju značajnu antitrombotičku aktivnost (Smith i saradnici, 2002).

Zahvaljujući visokom sadržaju dijetetskih vlakana i proteina, a malom sadržaju masti, ekstrakti jestivih pečuraka smatraju se idealnom hranom za dijetetsku prevenciju hiperglikemije (Gunde Cimerman, 1999). Ekstrakti nekoliko lekovitih pečuraka (*Tremella aurantia*, *Cordyceps sinensis*, *G. lucidum* i *A. auricula judae*) pokazuju uticaj na smanjenje sadržaja glukoze u krvi (Kiho i saradnici., 1995). Smanjenje nivoa glukoze kao i smanjenje nivoa triglicerida u krvi, pokazuje nekoliko vodenih ekstraktata pečuraka (*L. edodes*, *P. ostreatus* i *Phellinus linteus*) (Kim i saradnici 2001).

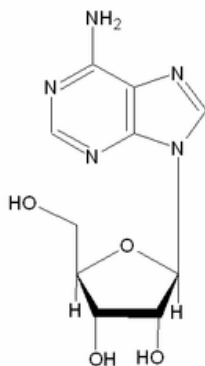
2.5.2.1. ADENOZIN

Veruje se da su aktivne komponente lekovite pečurke *Cordyceps* nukleozidi. Iz ove vrste pečuraka izolovano je 10 različitih nukleozida (Fan i saradnici, 2006). Utvrđeno je da su nukleozidi uključeni u regulaciju različitih fizioloških procesa u centralnom nervnom sistemu (Fan i saradnici, 2006). Oni imaju značajnu ulogu u razvoju i diferencijaciji gastrointestinalnog trakta, kao i u pravilnom funkcionisanju imunog odgovora humanog organizma. Smatra se da nukleozidi mogu nastati degradacijom DNK i RNK (Uauy i saradnici 1990; Carver, 1994).

Kineska pečurka *Cordyceps sinensis* se smatra jednim od najbogatijih izvora nukleozida sa značajnim farmakološkim delovanjem. *Cordyceps* je vrlo redak u prirodi i skup na tržištu, ali i veoma cenjen. Na tržištu Kine u prodaji je nekoliko produkata fermentacije ove pečurke i oni se koriste kao lek ili dijetetski suplement (Yin i Tang, 1995). U poslednjih nekoliko godina primećena je ekspanzija proizvoda na bazi ove pečurke i na drugim svetskim tržištima. Kao supstituent ove retke vrste pečuraka često se koristi *Cordyceps militaris* (Fan i saradnici, 2006).

Cordyceps sadrži značajne količine nukleozida adenzina, guanozina i uridina, a smatra se da adenzin (slika 19) ima ključnu ulogu u farmakološkim efektima. Adenzin je prirodni purinski nukleozid koji se sastoji od adenina vezanog β -N₉ glikozidnom vezom za molekul riboze (ribofuranoze). On ima značajnu ulogu u biohemijskim procesima transfera energije kao adenzin trifosfat (ATF) i adenzin difosfat (ADF), zatim u signalnoj transdukciji kao ciklični adenzin monofosfat, deluje na funkcije u nervnom tkivu (Ribeiro, 1995), smatra se inhibitornim neurotransmiterom, itd. Adenzin je potencijalni antiinflamatorni agens, ima sposobnost dilatacije arterija i relaksacije glatkih mišića arterija, poseduje širok spektar delovanja na koronarnu i cerebralnu cirkulaciju. Jedno od najznačajnijih osobina ovog jedinjenja je regulacija srčanog ritma kod osoba koje pate od supraventrikularnih tahikardija (Ribeiro, 1995).

Akumulacije adenzina i drugih modifikovanih nukleozida u pečurkama privukla je značajnu pažnju naučne javnosti, naročito zbog značajnih farmakoloških delovanja ovih komponenata (Li i saradnici, 2001). Sadržaj adenzina u *Cordyceps*-u smatra se markerom kvaliteta ove pečurke (Yue i saradnici, 1995). Pitanje određivanja kvaliteta pečurke na ovaj način je ipak diskutabilno, obzirom da je utvrđeno da efekat farmakoloških delovanja ove pečurke ne koreliše samo sa sadržajem adenzina (Fan i saradnici, 2006).



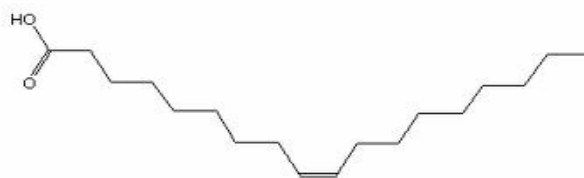
Slika 18. Adenozin

Zbog prisustva adenozina došlo je do pomaka u kultivaciji pečuraka vrste *Cordyceps*. Utvrđeno je da u većini slučajeva kultivisan *Cordyceps* sadrži više adenozina nego prirodno sakupljen. Visok sadržaj nukleozida u kultivisanim vrstama smatra se posledicom brzog metabolizma u kulturama dobijenim u veštačkim uslovima (Li i saradnici, 2001). Zanimljiv podatak je i da svež prirodni *Cordyceps* sadrži mnogo manje nukleozida u odnosu na osušen i industrijski obrađen (Li i saradnici, 2001).

2.5.2.2. MASNE KISELINE

Lipidi imaju značajnu ulogu u funkcionisanju čovekovog organizma, jer utiču na funkcionisanje hormona ili su njihovi prekursori, pomažu u procesu digestije i jedni su od osnovnih konstituenata u metabolizmu energije. Takođe, lipidi predstavljaju osnovne strukturne i funkcionalne komponente biomembrana (Burtis i Ashwood, 1996). Osnovne strukturne jedinice koje izgrađuju lipide su masne kiseline. Masne kiseline se dele na zasićene (*saturated fatty acids*, SFA) i nezasićene masne kiseline (*unsaturated fatty acids*, UFA). Postoji i podela nezasićenih masnih kiselina na zasićene masne kiseline sa jednom nezasićenom vezom (*monounsaturated fatty acids*, MUFA) i višestruko nezasićene masne kiseline (*polyunsaturated fatty acids*, PUFA). U ishrani supstitucija zasićenih masnih kiselina nezasićenim je veoma značajna, pošto takva ishrana dovodi do povećanja HDL (“dobrog” holesterola), odnosno do smanjenja LDL (“lošeg” holesterola) i triglicerida (Isang i Zhang 2007). Ova supstitucija izuzetno je značajna jer je dokazano da je ishrana bogata zasićenim masnim kiselinama povezana sa povećanjem bolesti kardiovaskularnog sistema, ateroskleroze i koronarne bolesti srca (Wang i saradnici, 2003). Nezasićene masne kiseline koje pripadaju grupi omega-6 i omega-3 masnih kiselina imaju značajno biološko delovanje i u malim koncentracijama. One su prekursori biosinteze eikozanoida (prostaglandina). Ove značajne komponente između ostalog kontrolišu mnoge sisteme u humanom organizmu i utiču pozitivno na kardiovaskularne bolesti, nivo triglicerida, krvni pritisak i artritis. Omega masne kiseline poseduju i antiinflamatorno, antitrombotičko, antiaritmičko, vazodilatatorno delovanje, a deluju i na dijabetes tip 2, ulcerativni kolitis, Hronovu bolest (Voet i Voet, 2004).

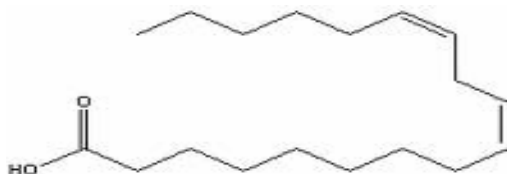
Smatra se da pečurke imaju mali sadržaj masti, a da su preovlađujuće masne kiseline nezasićene oleinska i linoleinska kiselina. Istraživanjem profila masnih kiselina pečuraka bavila su se mnoga naučna istraživanja (Yilmaz i saradnici 2006; Kavishree i saradnici; 2008 Ribeiro i saradnici, 2009, Vidović i saradnici, 2011). Nezasićena masna kiselina sa visokim udelom u gotovo svim analiziranim vrstama pečuraka je oleinska kiselina (C 18:1 n9) sa jednom nezasićenom vezom (MUFA) koja pripada grupi omega-9 masnih kiselina. Oleinska kiselina (slika 19) se u velikom udelu nalazi u maslinovom ulju i utvrđeno je da je efikasna u smanjuju nivoa holesterola i prevenciji kardiovaskularnih bolesti.



Slika 19. Oleinska kiselina

Snižavanje nivoa holesterola seruma može dovesti do prevencije koronarne arteroskleroze, kao i prevencije arista (Barter i Rey, 1996). Zbog sposobnosti regulacije nivoa holesterola pečurke se odavno koriste u hiperholesterolemičkim i antiskleroznim dijetama u orijentalnoj medicini (Sun i saradnici, 1984). Pored oleinske još nekoliko kiselina koje pripadaju grupi omega-9 masnih kiselina (nervonska i *cis*-11-eikosenoinska kiselina) detektovane su u pečurkama (Ribeiro i saradnici, 2009).

Esencijalne masne kiseline se moraju unositi putem hrane ili suplemenata. Nedostatak esencijalnih masnih kiselina može biti odgovoran za niz disfunkcija u organizmu (dermatitis, imunosupresija i srčana disfunkcija) (Voet i Voet, 2004). Najprisutnija esencijalna masna kiselina u pečurkama je linoleinska kiselina (C 18:2 n6), koja spada u grupu omega-6 masnih kiselina (slika 20). Ovoj grupi masnih kiselina pripadaju još neke kiseline kao što su γ -linoleinska, dihomo- γ -linoleinska i arahidonska kiselina (Voet i Voet, 2004).



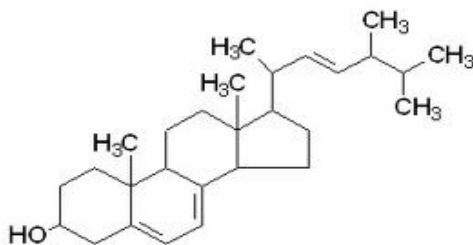
Slika 20. Linoleinska kiselina

Linoleinska kiselina u pečurkama je i prekursor aromatičnih alkohola sa osam ugljenikovih atoma (1-okten-3-ol, 3-oktanol, 1-okten-3-on i 3-oktanon), koji su nosioci arome pečuraka (Combet i saradnici, 2006).

2.5.2.3. STEROLI

Ergosterol i holesteroli su bioaktivne supstance u pečurkama. Ergosterol je osnovni sterol funglane ćelijske membrane i za nju je čvrsto vezan (Suqion i saradnici, 2010). Fungalni steroli omogućavaju karakteristične funkcije neophodne za rast pečurke. Većina fungalnih sterola (npr. ergosterol) sadrže 28 ugljenikovih atoma (Matilla i saradnici, 2002). U pečurkama su identifikovani različiti steroli, kao što su fungisterol, ergosta-5-7-dienol, 24-metil holesterol i metilen holesterol (Weete i Gandhi, 1997). Utvrđeno je da biljni steroli imaju pozitivan uticaj na ljudsko zdravlje. Smatra se da ove aktivne komponente pečuraka poseduju antidijabetičko i antiarterosklerozno delovanje, utiču na smanjenje nivoa holesterola u serumu, a značajni su i u prevenciji raka debelog creva (Piironen i saradnici, 2000). Fungalni steroli imaju slične karakteristike biljnim sterolima i poseduju ista pozitivna dejstva. Brojna naučna istraživanja pokazuju da ergosterol i njegovi produkti peroksidacije doprinose zdravlju u smislu smanjenja bola koji je izazvan zapaljenskim procesima, učestalosti kardiovaskularnih bolesti, a poseduju antimikrobno i antitumorno delovanje (Suqin i saradnici 2010). Antitumorno delovanje ergosterola povezuje se sa direktnom inhibicijom angiogeneze indukovane tumorom. Ergosterol se apsorbuje u digestivnom traktu, akumulira, i može biti metabolisan *in vivo* u nove bioaktivne produkte kao što je 17, 24-dihidroksiergosterol (Slominski i saradnici, 2005).

Ergosterol (slika 21) prisutan u pečurkama je prekursor vitamina D2 i u ovaj vitamin može biti konvertovan pomoću UV zračenja (Jasinghe i Perera, 2005). Vitamin D2 ima značajnu ulogu u regulaciji nivoa kalcijuma i fosfora (Greer i Marshall, 1989). Klinička istraživanja ukazuju na uticaj između nivoa vitamina D i kardiovaskularnih bolesti. Nizak nivo vitamina D smatra se jednim od uzroka kongestivne bolesti srca (Pilz i saradnici, 2008). Istraživanjem je utvrđeno i da vitamin D ima protektivnu ulogu u prevenciji kolorektalnog kancera, kancera dojke, prostate i kancera jajnika (Rossi i saradnici, 2009).



Slika 21. Ergosterol

Kultivisane pečurke imaju relativno visok sadržaj sterola i sračunato na suhu materiju on iznosi od 625 do 774 mg/100 g. Ergosterol je dominantni sterol pečuraka i u odnosu na ukupan sadržaj sterola prisutan je u udelu od 83 do 89% u pečurkama *C. cibarus* i *B. edulis*. Sadržaja ergosterola u suvoj materiji pečurke *A. bisporus* iznosi 6,54 mg/g (Matilla i saradnici, 2002).

U *A. bisporus* i *P. ostreatus* prisutan je i ergosta-5,7-dienol i to u udelu od 7 do 12%, dok je kod *L. edodes* u sličnom udelu detektovan fungisterol.

2.5.3. IMUNOMODULATORNO I ANTIKANCEROGENO DELOVANJE

Imunomodulatorno i antikancerogeno delovanje mogu se, zbog mehanizma delovanja, posmatrati zajedno. Najznačajnijim lekovitim komponentama izolovanim iz pečuraka smatraju se polisaharidi i njihovi kompleksi. Ove komponente poseduju oba delovanja.

Osnovni nosioci imunomodulatornog delovanja su: polisaharidi (naročito β -glukani), protein i triterpenoidi, određeni steroidi i organski geranijum.

Ispitivanja lekovitih gljiva u svom fokusu imaju istraživanje komponenata koje pozitivno ili negativno stimulišu biološki odgovor imunih ćelija. Jedinjenja koja su sposobna na interakciju sa imunim sistemom, pri čemu dolazi do specifičnih odgovora domaćina koji podrazumeva podizanje nivoa imuniteta ili smanjenja u određenim uslovima, mogu se smatrati imunomodulatorima (*biological response modifier*). Komponente koje mogu da stimulišu humani imuni odgovor mogu naći svoju primenu u terapiji kancera, kao i drugih bolesti izazvanih smanjenjem ili nedostatkom imuniteta.

Danas je u svetu poznato nekoliko preparata na bazi polisaharida pečuraka, koji se smatraju imunomodulatorima. Među najpoznatijim nalaze se polisaharidi izolovani iz pečurke *L. edodes*, Lentinan, LEM i LAP. Lentinan sarži polisaharide konstituenate ćelijskog zida plodonosnog tela i micelije *L. edodes*, visoko je prečišćen, velike molekulske mase, rastvoran u vodi, otporan na toplotu. Strukturno ovaj polisaharid se sastoji od osnovnog (β -D 1-3 glukoze) i bočnih lanaca (β -D 1-6 glukoze). Uspešno je primenjen u terapiji kolorektalnog i kancera želuca (Taguchi i Furue, 1985). LEM i LAP su ekstrakti dobijeni iz micelije *L. edodes*. Predstavljaju glukoproteine koji sadrže glukozu, galaktozu, ksilozu, arabinozu, manozu i fruktozu. LEM sadrži 24,6% proteina, 44% šećera, a ostali deo čine derivati nukleinskih kiselina, vitamini B grupe i ergosterol (Ilzuka, 1997). Slični polisaharidi i protein-polisaharidni kompleksi, PSK i PSP, dobijeni su iz pečurke *T. versicolor* i određenih frakcija pečurke *G. frondosa* (Nanba, 1997).

O prvom istraživanju koje se odnosi na antikancerogeno delovanje polisaharida iz pečuraka izveštavaju Ikekawa i saradnici (1968; 1969). Ovim istraživanjem dokazano je da ekstrakti nekoliko različitih vrsta pečuraka poseduju značajno antitumorno delovanje protiv Sarkoma 180. U oba istraživanja komponente sa antitumornim delovanjem ekstrahovane su vrlo jednostavno, vrelom vodom. Nakon ekstrakcije utvrđeno je da su ekstrahovane komponente sa antitumornim delovanjem bile polisaharidi. U tabeli 6 dati su primeri nekoliko komponenata sa antitumornim delovanjem (Ferreira i saradnici, 2010).

Tabela 6. Komponente pečuraka sa antitumornim delovanjem

Komponente sa malom molekulskom masom:	Komponente sa velikom molekulskom masom:
<ul style="list-style-type: none"> • cerebrozidi, • izoflavoni, • kateholi, • amini, • triacilgliceroli, • seskviterpeni, • steriodi i • organski germanijum i selen. 	<ul style="list-style-type: none"> • homo- i heteroglukani, • glikoproteini, • glikopeptidi, • proteini i • RNK-protein kompleks.

Smatra se da se antikancerogeno delovanje polisaharida i polisaharidnih kompleksa izolovanih iz lekovitih pečuraka bazira na aktivaciji makrofaga, prirodnih ćelija ubica i T ćelija. One u organizmu domaćina aktiviraju proizvodnju interleukina, interferona i tumor nekrosis faktore ((TNF)-alfa), kao i neke druge komponente, koje su u stanju da uspešno unište ćelije kancera (Smith i saradnici, 2002).

2.5.4. ANTIMIKROBNO DELOVANJE PEČURAKA

Droge koje sadrže antimikrobne komponente od davnina su se koristile u profilaktičke i terapijske svrhe. Utvrđeno je da oko 75% *Polyporace* pečuraka pokazuju snažno antimikrobno delovanje (Suay i saradnici, 2000). Ova aktivnost se vezuje ne samo za male molekule (sekundarne metabolite) već i za molekule velike molekulske mase kao što su polisaharidi izolovani iz ćelijskog zida pečuraka. Antimikrobne komponente pečuraka, se mogu svrstati u dve osnovne klase: komponente koje deluju indirektno preko modifikacije biološkog odgovora (obično su to polisaharidi) i na komponente koje deluju direktno kao inhibitori virusa (Brandt i Pirano, 2000).

Brojni su primeri antimikrobnog delovanja pečuraka i komponenata izolovanih iz njih. Tako su nekoliko polisaharida izolovanih iz lekovitih pečuraka pokazali antivirusno delovanje protiv citomegalovirusa (Jong i saradnici, 1991). Lentinan izolovan iz pečurke *L. edodes*, kao i sulfatni derivat Lentinana, pokazuju potencijalno anti HIV delovanje na taj način što inhibiraju replikaciju virusa (Smith i saradnici, 2002). Osim toga, Lentinan pokazuje i antivirusno delovanje na virus encefalitisa, Abelsonov virus, adenovirus tip 12, kao i značajano delovanje na *Mycobacterium tuberculosis*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, *Candida albicans* i *Saccharomyces cerevisie* (Smith i saradnici, 2002).

LEM i komponenta JLS-18 obogaćena lignanom pečuraka smatraju se značajnim faktorima koji se mogu uključiti u terapiju hepatitisa B i terapiju obolelih od HIV-a (Yamamoto i saradnici, 1997). Japanski Nacionalni Institut zdravlja i US Nacionalni Institut za kancer utvrdili su da je sulfonovan oblik ekstrakta *G. frondosa* sposoban da sačuva oko 97% HIV inficiranih *T-helper*

ćelija od uništenja. Ovo je značajno, jer se merenjem broja T ćelija prati progres HIV virusa ka punom ispoljavanju AIDS-a (Zhuang i Mizuno, 1999).

2000. godine u Španiji rađeno je intenzivno istraživanje antimikrobnog delovanja oko 200 vrsta *Basidiomyceta*. U ovom istraživanju gotovo 50% ispitivanih vrsta je pokazalo značajno antibiotsko delovanje na širokom spektru testiranih mikroorganizama. Među istraženim vrstama nalazile su se i *Polyporace* pečurke poput *Piptorus betulinus*, koja je pronađena u stvarima „Otzi the Iceman“ i koja je takođe pokazala intenzivno antimikrobno delovanje (Suay i Arenal, 2000).

2.5.5. HEPATOPROTEKTIVNO DELOVANJE PEČURAKA

Hepatoprotektivno delovanje pokazali su terpenoidi ganodermičke i ganospereričke kiseline i polisaharidna jedinjenja i njihovi kompleksi izolovani iz različitih vrsta pečuraka. Plodonosno telo gljive *G. lucidum* odavno se koristi kao osnovna komponenta u tradicionalnoj medicini u tretmanu hroničnog hepatitisa (Wilard, 1990). Ganodermičke kiseline R i S koje su izolovane iz kulture micelije *G. lucidum* pokazale su značajnu antihepatotoksičnu aktivnost u istraživanju rađenom na laboratorijskim pacovima. Iz etarskog ekstrakta *G. lucidum* izolovana je još jedna komponenta sa sličnim delovanjem, ganosporerička kiselina A. Kliničko istraživanje rađeno sa liofiziranim ekstraktom *G. lucidum* pokazuje veoma značajno delovanje ekstrakata ove pečurke na poboljšanje kvaliteta života pacijenata koji pate od aktivnog oblika hepatitisa B (Smith i saradnici, 2002).

Polisaharidi izolovani iz *L. edodes* pokazali su u istraživanju na životinjama, protektivno i delovanje na poboljšanje rada jetre, kao i povećanu proizvodnju antitela na hepatitis B (Mizuno i saradnici, 1995). Primenom Lentinana i LEM postižu se značajni rezultati u lečenju hroničnog i viralnog hepatitisa.

2.5.5.1. TERPENOIDI

Postoji čitav spektar jedinjenja terpenoidne strukture koji su izolovani iz pečuraka i koji imaju izuzetno značajna delovanja. Terpenoidi prisutni u pečurkama su uglavnom lanostanskog tipa (njih oko 150) ili su triterpeni. Oni deluju antioksidativno, antikancerogeno, hepatoprotektivno, antivirusno i inhibitorno na sintezu holesterola. Najpoznatiji su terpeni izolovani iz pečurke *G. lucidum*: ganoderična, ganodermična i ganolucidična kiselina. Smatra se da ove komponente deluju hepatoprotektivno i citotoksično. Za neke terpenoide i njihove derivate izolovane iz pečuraka vrste *Polyporales* i *Ganodermatales* utvrđeno je da poseduju citotoksične efekte i imunomodulatorno delovanje. Najmanje 100 različitih triterpena je identifikovano u plodonosnom telu i miceliji pečuraka *G. lucidum* i *Ganoderma applanatum*, a u identifikovane spadaju i već pomenuta ganoderična, ganoderenička, lucidenička kiselina i nekoliko ganoderala (Wasser i Weis, 1999). *G. lucidum* kao metabolite proizvodi terpen ganoderiol F i ganodermanotriol koji poseduju anti HIV aktivnost (El Mekawy i saradnici, 1998).

Primer citotoksičnog monoterpena je montadiol A, izolovan iz *Polyporace* pečurke *Bondarzewia montana*. Ovaj monoterpen ima citotoksično delovanje protiv limfocita leukemije kod miševa,

kao i kod ćelija humane leukemije. Dva nova triterpena 3,4-sekolanastan tipa izolovani su iz pečurke *Poria cocos*. Utvrđeno je da ove dve komponente, porikoična kiselina G i porikoična kiselina H imaju citotoksično delovanje na Epstein-Barr virus (Zjawiony, 2004).

2.6. LEKOVITE PEČURKE KINE, KOREJE I JAPANA

Pored nutritivnog značaja, druga po značaju osobina pečuraka, odnosno njihovo lekovito delovanje, prepoznata je još veoma davno u zemljama kao što su Kina, Koreja i Japan. Na Orijentu već nekoliko hiljada godina mnoge jestive i nejestive pečurke se koriste kao lekovita sirovina (Hobbs, 1995). Za oko 400 vrsta različitih pečuraka dokazano je da poseduju lekovito delovanje, ali se za oko 1.800 različitih vrsta smatra da sadrže potencijalno lekovite komponente (UN APCAEM).

Lekovite pečurke u kojima je već odavno prepoznato lekovito i nutritivno ili funkcionalno delovanje su gljive sledećih vrsta: *Lentinus* (Letinula), *Auricularia*, *Hericium*, *Grifola*, *Flammulina*, *Pleurotus* i *Tremella*, dok su neke druge, *Ganoderma* i *Trametes*, prepoznate samo zbog svojih lekovitih svojstava, pošto su identifikovane kao nejestive vrste. Lekovite pečurke su se kroz istoriju koristile obično osušene i samlevene, kao i u obliku vrelih vodenih ekstrakata, koncentrata, tonika, tinktura, čajeva i drugih oblika herbalnih formulacija. U neke od najviše korišćenih sa područja azijskih zemalja spadaju: *G. lucidum*, *C. sinensis*, *Griofola frondosa* i *L. edodes*.

Ganoderma lucidum (slika 22) se smatra pečurkom za koju se vezuje upotreba u medicinske svrhe duga više od 4.000 godina. U Japanu ova pečurka se naziva i Reishi ili Mannetake (što u prevodu znači “10.000 godina stara pečurka”). U Kini i Koreji zove se Ling Chu ili Ling Zhi (odnosno “pečurka besmrtnosti”). Ova pečurka raste u gotovo svim delovima sveta. U Japanu raste na drvetu šljive (Smith i saradnici, 2002). Danas se može dobiti kultivacijom, što značajno doprinosi njenoj široj upotrebi.



Slika 22. *Ganoderma lucidum*

U ovoj pečurki pronađeno je oko 100 različitih triterpena koji pokazuju antihipertenzivno i antialergijsko dejstvo. Tradicionalno, ona se koristi u terapiji hroničnog hepatitisa, nefritisa, hipertenzije, artritisa, bronhitisa, astme i gastritisa. Naučna istraživanja dokazala su da

komponente ekstrahirane iz ove pečurke smanjuju krvni pritisak, holesterol i šećer u krvi (Smith i saradnici, 2002). Poznate su i komponente sa imunomodulatornim delovanjem izolovane iz ove pečurke.

Letinula edodes (slika 23) je karakteristična za područje Kine, Japana i drugih azijskih zemalja zbog specifičnih klimatskih uslova u kojima raste. Proizvodnja ove pečurke evidentirana je, doduše u veoma malom proizvodnom obimu, i na teritoriji naše zemlje. U Kini je poznata kao Xiang Gu (“ukusna pečurka”), ali i kao shiitake pečurka. Za razliku od drugih pečuraka već je široko prihvaćena od strane zapadnih zemalja, kako zbog svojih nutritivnih karakteristika, tako i zbog svojih lekovitih svojstava.



Slika 23. *Letinula edodes*

U prethodnim poglavljima već je bilo reči o delovanju i značajnim komponentama izolovanim iz ove pečurke, kao i o proizvodima na bazi ove pečurke. U Japanu se koriste kao dodatak standardnoj hemoterapiji, jer je utvrđeno da znatno smanjuju negativna dejstva hemoterapije, poboljšavaju kvalitet života i produžuju život obolelih (Mizuno i saradnici, 1995).



Slika 24. *Grifola frondosa*

Grifola frondosa (slika 24) raste na korenu drveća ili na samom drveću, često i kao parazit, izazivajući truljenje drvene mase. Često se naziva i “Hen of woods” ili “Sheep’s head” zbog svog neobičnog izgleda. U Japanu ova pečurka se naziva Maitake, što u prevodu znači “ninja koja igra”. Od 1970. godine se uzgaja, na panjevima i strugotinama, čime je postala dostupna širokoj grupi konzumenata. U Kineskoj medicini tradicionalno se koristi kod stomačnih

problema, problema sa spavanjem, hemoroida i nervoze (Hobbs, 1995). Naučna istraživanja pokazuju da protein polisaharidni kompleks izolovan iz ove vrste pečuraka poseduje antikancerogeno delovanje (Kurashige i saradnici, 1997). Klinička ispitivanja urađena sa visoko prečišćenim polisaharidom iz ove pečurke pokazala su visoku efikasnost u terapiji kancera pluća, dojke, jetre, prostate i mozga. Ostale frakcije dobijene iz ove pečurke poseduju antihiperzitivno, antidijabetičk i anti-HIV delovanje (Zhuang i Mizuno, 1999). Kapsule koje u sebi sadrže osušenu Maitake pečurku široko su prihvaćeni dijetetski suplementi na tržištu azijskih zemalja, ali i SAD i Evrope (Smith i saradnici, 2002).

Cordyceps sinensis (slika 25) je jedna od najzanimljivijih lekovitih pečuraka azijskih zemalja. Radi se o pečurki parazitu koja parazitira na larvi *Lepidoptera*, polako zalazeći u sve delove njenog tela. Larva se zakopava u zemlju i umire, a kasnije se na istom mestu razvija pečurka *Cordyceps*. Ova takozvana katerpillar pečurka poznata i kao Tochukaso vekovima se koristi u tradicionalnoj kineskoj medicini. Micelijum *Cordyceps-a* ima primenu u lečenju nesvestice i vrtoglavice, kardioloških oboljenja, kao i u poboljšanju motornih funkcija (Mizuno i saradnici, 1995).



Slika 25. *Cordyceps sinensis*

2.7. PEČURKE NAŠEG PODRUČJA

Područje Balkana smatra se područjem bogatim različitim vrstama divljih pečuraka. Ovo bogatstvo uslovljeno je pogodnim klimatskim uslovima i sastavom terena na kome se pečurke mogu razvijati. Jedno od područja sa najpovoljnijim klimatskim uslovima za razvoj ovog posebnog živog sveta smatra se Istra u Hrvatskoj. Istra je ujedno veoma značajan svetski proizvođač i izvoznik skupih i veoma cenjenih tartufa, ali i drugih vrsta samoniklih pečuraka. Divlje i samonikle pečurke sa ostalih područja Balkana se ne koriste se dovoljno, mada je u poslednjih par godina jasno vidljivo sazrevanja svesti o značaju ovog prirodnog bogatstva, a time i povećana eksploatacija, odnosno povećano korišćenja pečuraka prvenstveno u ishrani. U Srbiji u mnogo većem obimu koriste se kultivisane vrste pečuraka, i to najviše *A. bisporus*, baš kao i u većini evropskih zemalja. Pored kultivacije ove vrste pečuraka u poslednjih par godina vidljiv je pomak u kultivaciji *P. ostreatus*, odnosno bukovače, i *L. edodes*, odnosno shitaki pečurke.

U Srbiji i Zapadnom Balkanu ukupno je do sada identifikovano nešto više od 1.200 različitih vrsta pečuraka (Uzelac, 2009). Neke od najpoznatijih vrsta pečuraka sa našeg terena su vrste *Morchella* (smrčak), *Agaricus* (rudnjača), *Tricholoma* (jurjevka), *Lepista* (modrikača), *Russula* (zekice), *Lactarius* (mlečnice), *Coprinus* (mastiljavke), *Amanita* (pupavke), *Cantharellus* (lisičarke), *Pleurotus* (bukovače), itd. Gotovo sve ove pečurke, sem što se smatraju namirnicama veoma kvalitetnog sastava, izvor su potencijalno značajnih farmakološki aktivnih supstanci. U tom smislu vrste pečuraka koje uspevaju u našem okruženju potrebno je detaljno ispitati, obzirom da ne postoje naučni podaci o njihovim lekovitim aktivnim komponentama i delovanju.

Tema ove doktorske disertacije bile su pečurke sa ovog terena, različitih genusa, jestive i nejestive: *Boletus edulis*, *Boletus aurantiacus*, *Lycoperdon saccatum*, *Lycoperdon perlatum*, *Armillaria mellea*, *Armillaria tabascens*, *Trametes gibbosa*, *Trametes versicolor*, *Daedaleopsis confragosa*, *Clavaria pistilaris*, *Clavaria fennica* i *Macrolepiota procera*. Neke od njih opisane su u daljem tekstu.



Slika 26. *Armillaria mellea*

Pečurka *Armillaria mellea* (slika 26) na našem području je poznata kao puza, mraznica ili medenjača. Raste na hrastvom i grabovom drveću i može da izazove njihovo truljenje pošto spada u parazitske vrste. Javlja u jesen, posle kiše, u grupacijama. Ovo je jestiva pečurka, ali je

teško svarljiva, pa kod nekih osoba može izazvati mučninu i povraćanje. Klobuk ove pečurke je mesnat i žučkast poput meda (odakle i naziv medenjača), širok je od 5 do 10 cm i nalazi se na dršci visine od 6 do 15 cm. Meso puze je belo ili bledo, nema izražen miris, niti ukus (Božac, 1984).



Slika 27. *Lycoperdon saccatum*

Pečurka *Lycoperdon saccatum* (slika 27) poznata je pod nazivom puhara. Ovih pečuraka ima svuda, po livadama, pašnjacima, svim šumama. Pojavljuju se početkom leta i mogu se pronaći do pred zimu posle svake obilnije kiše (Božac, 1984). Puhare su oblika vrećice ili jajolike, veličine plodonosnog tela od 5 do 20 cm. One nemaju odvojen klobuk (šešir) od drške. Unutrašnjost plodonosnog tela pečurke je ispunjena belim mesom, prijatnog mirisa, koje po sazrevanju prelazi u smeđi prah. Sve su jestive dok su mlade i kad su na poprečnom preseku snežno bele boje. Čim počnu da žute puhare nisu za jelo. Kada ova pečurka sazri izbacuje spore kroz otvor koji se formira na temenu plodonosnog tela.



Slika 28. *Boletus edulis*

Najviše korišćena divlja pečurka na našoj teritoriji je *Boletus edulis*, ili pečurka poznata pod nazivom vrganj (slika 28). Vrganj je izuzetno ukusna jestiva delikatesna vrsta pečuraka. Ova pečurka raste leti i u jesen u listopadnim, ali i jelovim i smrekovim šumama. Klobuk ove pečurke prilično je krupan i u širini može da iznosi od 5 do 30 cm, mesnat je, smeđe boje, sa obavezno svetlijim obodom. Drška na kojoj se klobuk nalazi je široka, a njena visina može da dostigne od 5 do 15 cm. Meso kod mladih plodova je tvrdo, ali kasnije omekša, prijatnog je ukusa i mirisa (Božac, 1984). Ova pečurka se u značajnim količinama sakuplja i priprema za otkup.



Slika 29. *Macrolepiota procera*

Macrolepiota procera (slika 29) je pečurka poznata i pod nazivom sunčanica, parazolka, kišobranara, itd. Ova pečurka raste tokom leta i jeseni gotovo u svim predelima, na šumskim čistinama, livadama, proplancima i u planinskim predelima. Ona je jestiva i vrlo ukusna pečurka. Za jelo se koristi samo klobuk, jer je drška dosta tvrda i vlaknasta. Klobuk ove pečurke je širok od 10 do 30 cm. Kada je pečurka mlada njen klobuk je okrugao i zatvoren, starenjem klobuk se otvara i na kraju formira potpuno otvorenu formu sivo bele boje sa jasno izraženim ispupčenim centrom. Drška na kojoj se nalazi klobuk može biti od 20 do 40 cm. Meso ove pečurke je belo, mekano, prijatnom mirisa i specifičnog ukusa koji podseća na ukus lešnika (Božac, 1984).

Daedaleopsis confragosa (slika 30) pripada velikom i značajnom genusu *Polyporace*, familiji *Polyporaceae*. Pečurke koje pripadaju ovom genusu najznačajniji su izvor farmakološki aktivnih komponenata izolovanih iz pečuraka. Ova pečurka raste na drveću, najčešće vrbovom, i može se pronaći od juna do decembra. Klobuk ove pečurke je veličine od 2,5 do 15 cm, ali se mogu javiti i krupnije forme. Boja klobuka kreće se od sive do braon. Ona je tvrde i drvenaste strukture i pripada grupi nejestivih pečuraka.



Slika 30. *Daedaleopsis confragosa*

Clavaria pistillaris (slika 31) je pečurka poznata u našim krajevima pod nazivom veliki buzdovan. Veliki buzdovan je jestiva pečurka i ona uglavnom raste u Severnoj Americi i Evropi. Raste u šumama i na đubrivu. Veličina plodonosnog tela *C. pistillaris* je od 7 do 30 cm, a debljina od 2 do 6 cm. Drška je bočna, zakržljala ili je nema. Ne postoji jasno uočljiva razlika

između klobuka i drške. Boja ove pečurke varira od žute i ljubičaste do braon. Spore su bele ili žućkaste. Ukus ove pečurke može biti blag ali i gorak.



Slika 31. *Clavaria pistillaris*

2.8. EKSTRAKCIJA I EKSTRAGENSI

2.8.1. KLASIČNA EKSTRAKCIJA ORGANSKIM RASTVARAČIMA

Pored odgovarajuće pripreme biljnog materijala, u smislu mlevanja droge, vrsta rastvarača, odnosno ekstragensa koji se primenjuje za ekstrakciju određenih aktivnih principa igra veoma važnu ulogu. Potrebno je da ekstragens omogući što potpunije iscrpljenje droge, odnosno da omogući ostvarenje visokih prinosa ekstrakcije. Takođe je neophodno voditi računa o selektivnosti ekstrakcije, odnosno dobijanju ekstrakata sa minimalnim sadržajem primesa, a maksimalnim sadržajem željenih aktivnih principa. Izbor rastvarača za ekstrakciju zavisi od stepena hidrofилnosti supstance koja se želi dobiti ekstrakcijom, pri čemu se može koristiti poznato pravilo, slično se rastvara u sličnom (Lepojević, 2000).

Jugoslovenska farmakopeja (*Ph. Jug. IV*) za upotrebu propisuje tečne i suve ekstrakte. U zavisnosti od karaktera rastvarača koji je korišćen za dobijanje ekstrakta, razlikuju se:

- ✓ vodeni ekstrakti (*Extracta aquosa*),
- ✓ alkoholni ekstrakti (*Extracta spirituosa*) i
- ✓ etarski ekstrakti (*Extracta etherea*).

Za ekstrakciju lekovitog bilja koristi se čitav niz različitih organskih rastvarača, kao što su etiletar, metilenhlorid, hloroform, benzol i dr. Većina organskih rastvarača je toksična za humani organizam. Obično ekstrakti dobijeni upotrebom ovakvih rastvarača predstavljaju prvu fazu u proizvodnji farmakološki aktivnih supstanci. Upotrebljeni organski rastvarači iz ovakvih sistema uklanjaju se uparavanjem pod sniženim pritiskom, ali u krajnjem proizvodu on uvek zaostaje u određenoj količini.

Mešanjem alkohola i vode u različitim kvantitativnim odnosima dielektrična konstanta smeše se menja u širokim granicama, što omogućuje primenu ovakvih smeša za ekstrakciju velikog broja supstanci iz biljnog materijala (Lepojević, 2000). Prednost ovog rastvarača, pored toga što se može koristiti za ekstrakciju čitavog niza različitih supstanci, je njegova netoksičnost u odnosu na humani organizam. Primenom smeše etanola i vode, kao polarnog rastvarača, mogu se iz polaznog materijala ekstrahovati polarne komponente kao što su fenoli, flavonoidi, tanini, šećeri, glikozidi, soli, neki vitamini, itd.

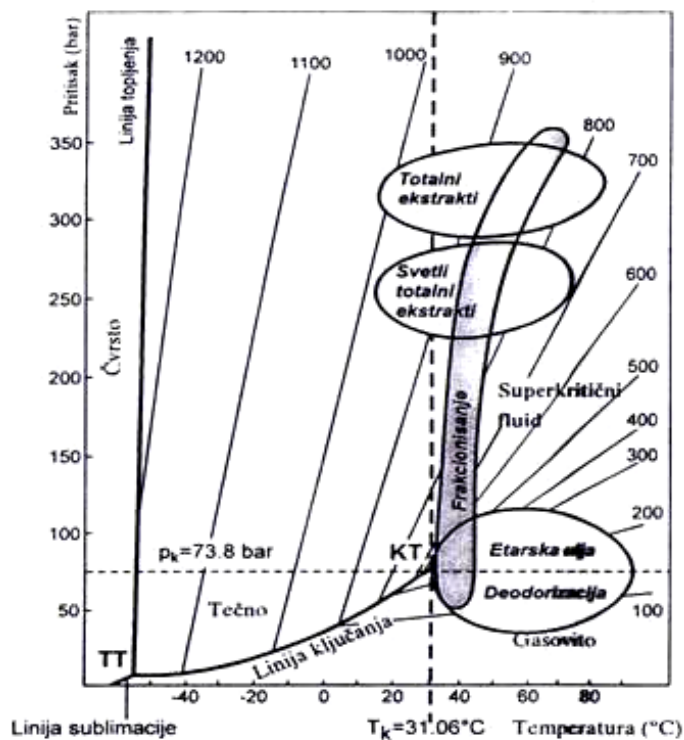
Proces ekstrakcije se može intenzifikovati primenom ultrazvuka. Ultrazvuk proizvodi razaranje ćelija, redukovanje veličine čestica i prolaz ultrazvučnog talasa kroz čvrst materijal, što dovodi do veće dodirne površine između čvrste i tečne faze, kao i boljeg kontakta rastvarača sa komponentama u poređenju sa tradicionalnim metodama ekstrakcije (maceracija, Soxhlet ekstrakcija). Njena primena preporučuje se za ekstrakciju supstanci sa manjom molekulskom masom. Tipičan proces podrazumeva ekstrakciju ultrazvukom usitnjenog ispitivanog materijala sa rastvaračem u vremenskom periodu od 0,5 do 2 sata (Živković, 2009).

Rastvarač pozitivnih karakteristika, što se tiče selektivnosti i netoksičnosti, koji se može koristiti za dobijanje ekstrakta visoke čistoće radi dalje prerade ili upotrebe od strane farmaceutske ili prehrambene industrije je i ugljendioksid u superkritičnom stanju.

Pečurke se ekstrahovane primenom različitih ekstragenasa, najviše metanola i vode (Cheung i saradnici, 2003; Elamstas i saradnici 2006; Mau i saradnici 2002; Chey i saradnici 2008), etanola (Turkoglu i saradnici, 2007; Turkoglu i saradnici, 2007), petrol etra i etil acetata (Cheung i saradnici 2003; Chey i saradnici 2008). Ekstrakcija se odvijala obično na temperaturi od 25°C ili 30°C, na mešalici, ili je korišćena metoda po Soxletu (Sarikurcku i saradnici 2008; Gezer i saradnici 2006; Turkoglu i saradnici 2007).

2.8.2. EKSTRAKCIJA UGLJENDIOKSIDOM U SUPERKRITIČNOM STANJU

Superkritična ekstrakcija predstavlja dobru alternativu klasičnim postupcima ekstrakcije. Ona predstavlja ekstrakciju gasovim pod pritiskom i temperaturom iznad kritičnih vrednosti. Superkritični fluid nema definisano agragatno stanje, već se njegove fizičko-hemijske karakteristike nalaze između karakteristika gasa i tečnosti. Gustina superkritičnih fluida slična je gustini tečnosti, a viskozitet sličan viskozitetu gasa (Pasquli, 2008). Jedan od najčešće korišćenih gasova u procesu superkritične ekstrakcije je ugljendioksid. Iznad temperature od 31°C i pritiska od 74 bara ugljendioksid prelazi u superkritično stanje. Iznad kritične tačke se malim promenama pritiska i/ili temperature menjaju i osobine superkritičnog gasa kao ekstragensa, čime je omogućena selektivna ekstrakcija. Povećanjem pritiska raste zapreminska masa i dielektrična konstanta, odnosno moć rastvaranja ekstragensa, odnosno ugljendioksida. Ugljendioksid u superkritičnom stanju ima osobine nepolarnog rastvarača, pa se njegovom primenom iz ispitivanog materijala mogu ekstrahovati nepolarne komponente: etarska ulja, masne kiseline, jedinjenja sterolne strukture, određeni vitamini, voskovi, itd.



Slika 32. pT dijagram sa označenim područjima za različite primene

U odnosu na ugljendioksid u gasovitom i tečnom stanju ekstrakcija ugljendioksidom u superkriticnom stanju ima niz prednosti poput:

- ✓ malog viskoziteta,
- ✓ velike gustine, jer gustina ovakvog ekstragensa odgovara gustini tečnosti,
- ✓ visoke vrednosti koeficijenta difuzije, što omogućava lako prodiranje ekstragensa,
- ✓ dobre rastvorljivosti teže isparljivih supstanci na određenom pritisku i temperaturi (Damjanović, 2005).

Pogodnom kombinacijom pritiska i temperature može se podešavati željeni efekat rastvaranja, odnosno može se postići određena selektivnost ugljendioksida kao ekstragensa. Područja pritiska i temperature u okviru kojih se mogu izolovati različiti ekstrakti prikazani su na slici 32. (Zeković, 1998).

Prednosti ugljendioksida u odnosu na ostale gasove, kao i u odnosu na ostale postupke ekstrakcije, su sledeće:

- ✓ netoksičan je u odnosu na humani organizam i spada u tzv. GRAS ekstragense (*generally recognized as safe*) (Martenis, 2001),
- ✓ nezapaljiv,
- ✓ jeftin i lako dostupan,

- ✓ bez mirisa i ukusa, što mu omogućava upotrebu u prehrambenoj industriji,
- ✓ omogućava frakcionisanje i selektivnu ekstrakciju,
- ✓ ne ekstrahuje pesticide, kao ni proizvode njihove degradacije,
- ✓ ima relativno nisku vrednost kritičnih parametara u odnosu na ostale gasove koji se primenjuju u ovoj tehnologiji,
- ✓ lako se odvaja od ekstrahovanih materija,
- ✓ njegova upotreba spada u ekološki bezbedne tehnologije, tzv. “environmental friendly” (El-Aty i saradnici, 2009).

Ekstrakcija ugljendioksidom u superkritičnom stanju vrši se pomoću uređaja koji je prikazan na slici 33. Ekstrakcija se vrši ugljendioksidom na određenoj temperaturi, određenom pritisku i pri određenom protoku, u ekstraktoru, a dobijeni ekstrakt se od ugljendioksida odvaja u separatoru pri uslovima sniženog pritiska i temperature, odnosno pri uslovima pod kojim ugljendioksid prelazi u gasovito stanje. Jedini nedostatak ovog postupka ekstrakcije jeste veoma skup uređaj za izvođenje ovakvog procesa. O ekstrakciji pečuraka superkritičnim ugljendioksidom vrlo je malo podataka (Abdullah i saradnici, 1994; Vidović i saradnici, 2011).



Slika 33. Slika ekstraktora i uređaja za superkritičnu ekstrakciju

3. EKSPERIMENTALNI DEO

U eksperimentalnom delu rada korišćeni su različiti uređaji i hemikalije. Podaci o modelu uređaja, kao i o proizvođaču korišćenog uređaja ili hemikalije navedeni su dalje u tekstu.

UREĐAJI

Za ekstrakciju na ultrazvučnom kupatilu korišćeno je kupatilo model Branson b-220, proizvođača Smith-Kline Company, SAD. Srednji prečnika čestica usitnjenog materijala određen je pomoću seta sita proizvođača Erweka GmbH, Nemačka. Supekritični ekstrakti dobijeni primenom uređaja HPEP (High Pressure Extraction Plant), proizvođača NOVA-Swiss, Effertikon, Švajcarska. Spektrofotometrijska određivanja rađena su na spektrofotometru model 6300, proizvođača Jenway, Velika Britanija. Korišćene su teflonske epruvete proizvođača Zeus industries, Raritan, SAD. EPR određivanja rađena su na EPR spektrometru Bruker 300E, proizvođača Bruker, USA, i Varian E104-A, proizvođača Varian, SAD, spektrometru koji je opremljen sa X-trakom (9,51 GHz). Snimanje na Varian E104-A spektrometru izvršeno je korišćenjem EW softvera, proizvođača Scientific Software, Bloomington, SAD. Sadržaj kalijuma određen je korišćenjem PFP7 plamenog fotometra, proizvođača Dunmow, Velika Britanija. Određivanje mikro- i makro-elemenata rađeno je pomoću mikrotalasne pećnice, proizvođača Anton Paar, SAD, i ICP/MS-u (indukovana kuplovana plazma sa masenim detektorom) model 9000, proizvođača Perkin Elmer. HPLC analiza je izvršena pomoću uređaja HPLC Agilent 1200 sa DAD detektorom i Zorbax Eclipse Plus C18 kolonom. LC/MS analiza je izvršena na uređaju Agilent MSD TOF koji je kuplovan sa Agilent 1200 HPLC-om. GC/MS analiza rađena je na uređaju Agilent 7890A GC koji je kuplovan sa kvadrupoln masenim spektrometrom model Agilent 5975C, proizvođača Agilent, SAD. Za GC/FID analizu metil estara masnih kiselina korišćen je hromatograf model HP 5890 Serija II sa FID-om, proizvođača Hewlett-Packard, SAD.

HEMIKALIJE

U eksperimentalnom radu korišćen je monohidrat galne kiseline i (+)-katehin monohidrat proizvođač Fluka A.G., Nemačka. Galna kiselina (98%) za HPLC, L- α -fosfatidilholin, DPPH, hipoksantin i ksantin oksidaza proizvođača Sigma, St. Luis, USA. FeSO₄, acetonitril i metanol, čistoće za hromatografiju proizvođača Marck, Dermstadt, Nemačka. 7-DS (7-Doksil Stearate) proizvođača Molecular Probe, Junction City, SAD. Spin trap DEPMPO (5-dietoksifosforil-5-metil-1-pirolin-N-oksidi) je proizveden u Alexis Biochemical, Lausen, Švajcarska. DEPMPO je prečišćen i testiran na hidroksilamin nečistoće. Proizvođač H₂O₂ je Renal, Budapest, Mađarska. Korišćena je trihlorsirćetna kiselina proizvođača Analyticals, Italija i FeCl₃·6H₂O i K₃(Fe(CN)₄) proizvođača Zorka, Šabac, Srbija. U superkritičnoj ekstrakciji korišćen je CO₂ proizvođača Messer Tehnogas, Novi Sad, Srbija. K₃EDTA proizvođača Greiner Bio-One, Austrija.

3.1. PRIPREMA MATERIJALA

Uzorci odabranih vrsta pečuraka sakupljeni su na području Istre, u blizini sela Mune, Hrvatska, u periodu između jula i augusta 2007. godine. Pre procesa ekstrakcije suvi uzorci pečuraka samleveni su u mlinu za kafu. Srednji prečnik čestica usitnjenog materijala određen je pomoću seta sita i jednačine:

$$\frac{100}{d} = \sum \left(\frac{m_i}{d_i} \right)$$

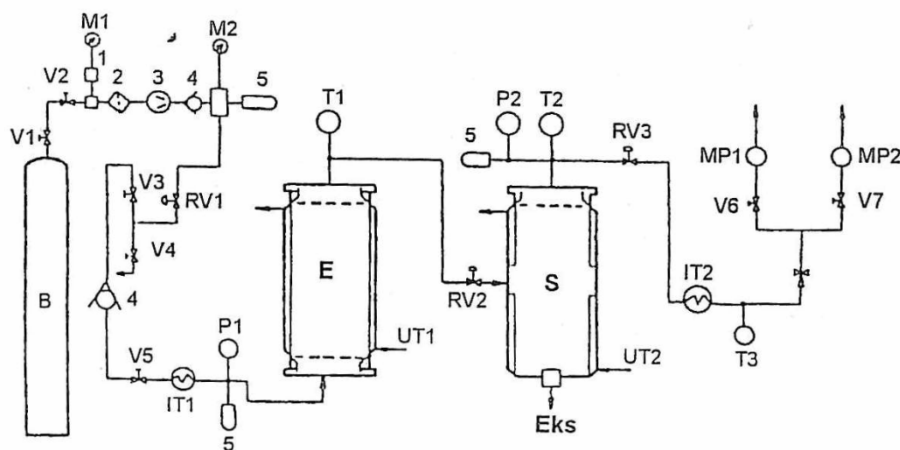
gde su: d - srednji prečnik čestica, m_i - maseni procenat i -te frakcije (%) a d_i - srednji prečnik i -te frakcije (mm). Srednji prečnik čestica usitnjenih uzoraka suvih pečuraka dat je u tabeli 7.

3.2. EKSTRAKCIJA ETANOLOM

Samleveni uzorci pečuraka ekstrahovani su 50% etanolom kao ekstragensom. Procedura ekstrakcije sastoji se u sledećem: 10 g samlevenog uzorka ekstrahovano je sa 100 ml ekstragensa na ultrazvučnom kupatilu na temperaturi od 45°C u period od 40 minuta. Nakon toga, izvršena je filtracija, po potrebi korekcija mase dodatkom ekstragensa i određena zapremina dobijenog tečnog ekstrakta je uparena na rotacionom vakuum uparivaču do suva. Dobijeni ekstrakti sušeni su na temperaturi od 60°C do konstantne mase. Za svaki uzorak samlevenih pečuraka postupak ekstrakcije je ponovljen tri puta. Prinos ekstrakcije dat je kao g suvog ekstrakta/100 g droge \pm S.D (standardna devijacija). Dobijeni suvi ekstrakti prenešteni su u staklene bočice, koje su zatvorene i čuvane u frižideru na temperaturi od 4°C do dalje analize.

3.3. EKSTRAKCIJA UGLJENDIOKSIDOM U SUPERKRITIČNOM STANJU

Superkritični ekstrakti odabranih vrsta pečuraka dobijeni su superkritičnom ekstrakcijom ugljendioksidom primenom uređaja čiji su osnovni delovi dati na slici 34 (Zeković, 1998). Masa uzorka u ekstraktoru za sve ispitivane vrste pečuraka je iznosila 60,0 g. Ekstrakcija *B. edulis*, *M. procera* i *A. mellea*, izvršena je na pritiscima 100, 200 i 300 bar i na temperaturi od 40°C, pri protoku ugljendioksida od 0,194 kg/h. Vreme ekstrakcije iznosilo je 4 h. Ekstrakcija ostalih uzoraka pečuraka izvršena je samo na pritisku od 300 bar pri istim ostalim parametrima ekstrakcije. Prinos ekstrakcije praćen je nakon 15, 30, 45, 60, 90, 120, 180 i 240 minuta.



Slika 34. Šema uređaja za ekstrakciju pod visokim pritiskom

- 1- merni konektor; 2 – filteri; 3 – kompresor sa dijafragmom; 4 – kontrolni ventil;
 5 – sigurnosni ventil; B – boca sa ugljendioksidom; V – ventil; M – manometer;
 RV – regulacioni ventil; IT – izmenjivač toplote; P – merač pritiska;
 E – ekstraktor (V = 200 ml); T – termometar; UT – ultratermostat;
 S – separator (V = 200 ml); Eks – ekstrakt; MP – merač protoka.

3.4. ODREĐIVANJE SADRŽAJA UKUPNIH FENOLA U EKSTRAKTIMA PEČURAKA

Sadržaj ukupnih fenola u etanolnim ekstraktima pečuraka određen je metodom po Folin-Ciocalteu (Singelton i Rosi, 1965). 0,1 ml uzorka (rastvora etanolnog ekstrakta poznate koncentracije) prenese se u epruvetu i doda 7,9 ml destilovane vode, 1,5 ml 20% Na₂CO₃ i 0,5 ml reagensa Folin-Ciocalteu. Kao slepa proba koristi se smeša u koju je umesto 0,1 ml uzorka dodato 0,1 ml destilovane vode. Nakon inkubacije od 1 h, na sobnoj temperaturi, meri se absorbanca ispitivane smeše na talasnoj dužini od 750 nm. Za svaki uzorak postupak je ponovljen tri puta. Ukupan sadržaj fenola u analiziranim uzorcima izražen je kao mg ekvivalenta galne kiseline po g suvog ekstrakta ± S.D (mg EGK/g ± S.D).

3.5. ODREĐIVANJE SADRŽAJA UKUPNIH FLAVONOIDA U EKSTRAKTIMA PEČURAKA

Sadržaj ukupnih flavonoida u etanolnim ekstraktima pečuraka određen je kolorimetrijskom metodom po Markham-u (1989). 1ml uzorka (rastvoru etanolnog ekstrakta poznate koncentracije) dodato je 4,0 ml destilovane vode i 0,3 ml 5% Na-nitrita. Kao slepa proba koristi se smeša u koju je umesto 1 ml uzorka dodato 1 ml destilovane vode. Smeša je inkubirana na sobnoj temperaturi 6 minuta. Nakon inkubacije u reakcionu smešu doda se 0,3 ml AlCl₃·6H₂O i 5 minuta kasnije još 2 ml 1M NaOH. Dobijena smeša se dopuni destilovanom vodom do ukupno 10 ml. Absorbanca uzorka se meri na talasnoj dužini od 510 nm. Za svaki uzorak postupak je ponovljen tri puta. Ukupan sadržaj flavonoida u analiziranim uzorcima izražen je kao mg ekvivalenta katehina po g suvog ekstrakta ± S.D. (mg KE/g ± S.D.).

3.6. HPLC/DAD I LC/MS ANALIZA EKSTRAKATA PEČURAKA

Priprema uzorka. Suvi ekstrakt ispitivane pečurake (200 mg) rastvori se u 10 ml 70% metanola na ultrazvučnom kupatilu. Nakon toga, rastvor su profiltrira kroz filter hartiju (50µm prečnika otvora pora) i određena zapremina (µl) se injektuje u HPLC/DAD ili LC/MS sistem.

HPLC/DAD analiza. HPLC analiza je izvršena pomoću uređaja HPLC Agilent 1200 sa RP Zorbax Eclipse Plus C18 kolonom (150 mm x 4,6 mm; 1,8 µm). Mobilna faza A je 0,2% mravlja kiselina (u vodi), a mobilna faza B acetonitril. Injektovana zapremina uzorka koncentracije 20mg/ml iznosi 1µl, uz gradijent program: od 0 do 20 min 5-16% B faza, od 20-28 min 16-40% B faza, od 28 do 32 min 40-70% B faza, 32-36 min 70-99% B faza, 36-45 min 99% B faza, 45-46 min 99-5%B. UV-VIS detekcija izvršena je na talasnoj dužini 230, 280 i 320 nm. Kvantitativna analiza je urađena na osnovu kalibracionih krivih dobijenih preko zavisnosti površine pika od koncentracije za standardnu komponentu. Kao standardna komponente korišćene su galna kiselina, adenzin i pistilarin. Sadržaj pojedinačnih fenolnih komponenta izražava se kao ekvivalent galne kiseline.

LC/MS analiza. LC/MS analiza je izvršena na uređaju Agilent MSD TOF koji je kuplovan sa Agilent 1200 HPLC-om. Korišćena je ista kolona i gradijent program kao i u slučaju HPLC/DAD analize. Analize mase molekula i fragmentiranih jona izvršena je na osnovu masenih spektara dobijeni upotrebom Agilent ESI-MSD TOF (time-of-flight) masenog spektrometra na pozitivnom i negativnom polarnom modu. Protok gasa (N_2) je $12 \text{ dm}^3/\text{min}$. Pritisak u nebulizatoru (raspršivaču) iznosio je 45 psig (3,103 bar). Temperatura gasa bila je 350°C . Za ESI analizu postavljeni su sledeći parametri: kapilarni napon od 4.000 V; fragmentor 140 V; Oct RF V 250 V, za pozitivan i negativan mod. Maseni opseg iznosio je od 100 do 2000 m/z .

3.7. KVANTITATIVNO ODREĐIVANJE MIKRO- I MAKRO-ELEMENATA EKSTRAKTA PEČURAKA

Priprema uzoraka (suvih ekstrakata pečuraka) urađena je digestijom određene mase uzorka (0,5 g) u mikrotalasnoj pećnici, sa dodatkom 7 ml koncentrovane azotne kiseline. Nakon digestije dobijena smeša dopunjena je ultra čistom vodom ($18\text{M}\Omega$) do 50 ml. Nakon ovako pripremljenog uzorka kvantitativno je određivan sadržaj mikro- i makro-elemenata na ICP/MS-u.

3.8. GC/MS ANALIZA SUPERKRITIČNIH EKSTRAKATA PEČURAKA

Priprema uzoraka za GC/MS analizu. Na 200 mg uzorka doda se 1 ml acetonitrila, smeša se rastvara 15 minuta na ultrazvučnom kupatilu, profiltrira kroz filter (50μ prečnika otvora pora) i $2 \mu\text{l}$ rastvora se injektuje.

GC/MS analiza. GC/MS analiza rađena je na uređaju Agilent 7890A GC koji je kuplovan sa kvadrupolnim masenim spektrometrom model Agilent 5975C. Primenjena je kapilarna HP-5MS kolona ($30 \text{ m} \times 0,25 \text{ mm}$; $0,25 \mu\text{m}$). Radni uslovi sistema su: temperatura inleta od 250°C , split odnos 20:1, gas nosač He sa konstantnim pritiskom od 21,956 psi (1,5138 bar). Temperaturni program je od 60 do 300°C ($3^\circ\text{C}/\text{min}$). Vreme analize je 80 minuta. Radni uslovi masenog spektrometra (MS) su: jonizacioni napon od 70 eV, jonska temperatura ("ion source") 230°C , sken opseg (m/z) od 35 do 550.

Identifikacija komponenata u ispitivanim uzorcima zasniva se na kompjuterskom poređenju sa Adams i NIST/EPA/NIH verzija 2.0d bibliotekom masenih spektara. Konstituenti ekstrakata su identifikovani na osnovu retencionih vremena koja su poređena sa retencionim vremenima datim u Adams biblioteci.

Priprema uzorka za GC/MS i GC/FID analizu metil estara masnih kiselina. Transesterifikacija uzoraka rađena je na sledeći način: 200 mg uzorka superkritičnog ekstrakta rastvoreno je u 2 ml 3% sumporne kiseline u metanolu. Vijale sa reakcionom smešom zatvorene su i zagrevane na vodenom kupatilu u periodu od 2 časa. Nakon hlađenja, reakciona smeša je neutralisana sa 2 ml rastvora NaHCO_3 , posle čega je dodato 2 ml CH_2Cl_2 . Organski sloj je osušen bezvodnim Na_2SO_4 , filtriran, a rastvarač otparen na vakuum uparivaču.

GC/MS analiza metil estara masnih kiselina. Za analizu metil estara masnih kiselina koristi se kapilarna DB-23 kolona (30 m x 0,25 mm; 0,25 μ m). Radni uslovi sistema u ovom slučaju su: temperatura inleta od 250 °C, split odnos 20:1, gas nosač He sa konstantnim pritiskom od 37,7 psi (2,599 bar). Temperaturni program je od 200 do 240 °C (5,6 °C/min). Na temperaturi od 240 °C zadržan je 15 minuta. Vreme analize iznosilo je 22,14 minuta. Radni uslovi masenog spektrometra bili su identični prethodno opisanom. U uređaj se injektuje 2 μ l pripremljenog uzorka.

GC/FID analiza metil estara masnih kiselina. Za GC/FID analizu metil estara korišćen je Hewlett-Packard hromatograf model HP 5890 Serija II sa FID-om i ista kolna kao i u slučaju GC/MS analize (DB-23). Radni uslovi su bili sledeći: temperatura inleta od 250 °C, split odnos 30:1, temperatura detektora 300 °C, gas nosač H₂ sa protokom od 1,0 ml/min. Temperaturni program od 150 do 240 °C (4 °C/min) i zadržan na temperaturi od 240 °C u vremenskom period od 10 minuta. Vreme analize iznosi 32,5 minuta. 1 μ l uzorka (rastvoren u CH₂Cl₂ (1:100 v/v)) je injektovan u uređaj. Procentualni sastav ispitivanih uzoraka izračunat je na osnovu metoda normalizacije GC/FID površine dobijenog pika.

3.9. ISPITIVANJE ANTIOKSIDATIVNOG DELOVANJA

3.9.1. DPPH METOD

Antioksidativna aktivnost etanolnih ekstrakata pečuraka ispitana je neutralizacijom slobodnih DPPH radikala primenom DPPH testa po Espin-u (2000). Suvi ekstrakt pečurke, dobijen primenom etanola kao ekstragensa, rastvori se u vodi do početne koncentracije od 1 mg/ml, i pomeša sa 95% metanolom i 90 μ M rastvorom DPPH[•] radikala (u metanolu) do različitih finalnih koncentracija (0,02; 0,05; 0,1 i 0,2 mg/ml). Kao kontrola koristi se smeša u koju je umesto uzorka (suvog ekstrakta) dodata destilovana voda. Kao slepa proba koristi se 95% metanol. Nakon 60 min inkubacije na sobnoj temperaturi izmeri se absorbance reakcione smeše na talasnoj dužini od 515 nm. Na osnovu izmerene absorbance ispitivanog uzorka i absorbance kontrole izračunata je RSC (%) vrednost. Za svaki uzorak i svaku koncentraciju postupak je ponovljen tri puta. Na osnovu dobijenih RSC vrednosti izračunate su IC₅₀ vrednosti izražene u mg/ml.

3.9.2. METODA REDUCING POWER

Reduktivna sposobnost ekstrakata pečuraka i vitamina C, kao standardne antioksidativne komponente, određen je prema metodi po Oyaizu (1986). Rastvori ekstrakata pečuraka različite koncentracije (0,2; 0,5 i 2 mg/ml) i rastvor vitamina C u vodi različitih koncentracija (0,01; 0,02; 0,05; 0,1; 0,2 i 0,5 mg/ml) pomešani su sa fosfatnim puferom (2,5 ml, 0,2 M, pH 6,6) i 2,5 ml 1% kalijumfericijanida [K₃Fe(CN)₆]. Dobijena smeša inkubirana je 20 minuta na temperaturi od 50 °C. Nakon inkubacije, 2,5 ml 10% trihlorsirćetne kiseline dodato je smeši i ona je centrifugirana 10 minuta na 3000 o/min. Dobijenom supernatantu (2,5 ml) dodata je bidestilovana voda (2,5 ml) i 0,1% FeCl₃ (0,5 ml). Absorbance uzorka izmerena je na talasnoj dužini od 700 nm. Za svaki uzorak i za svaku koncentraciju postupak je ponovljen tri puta.

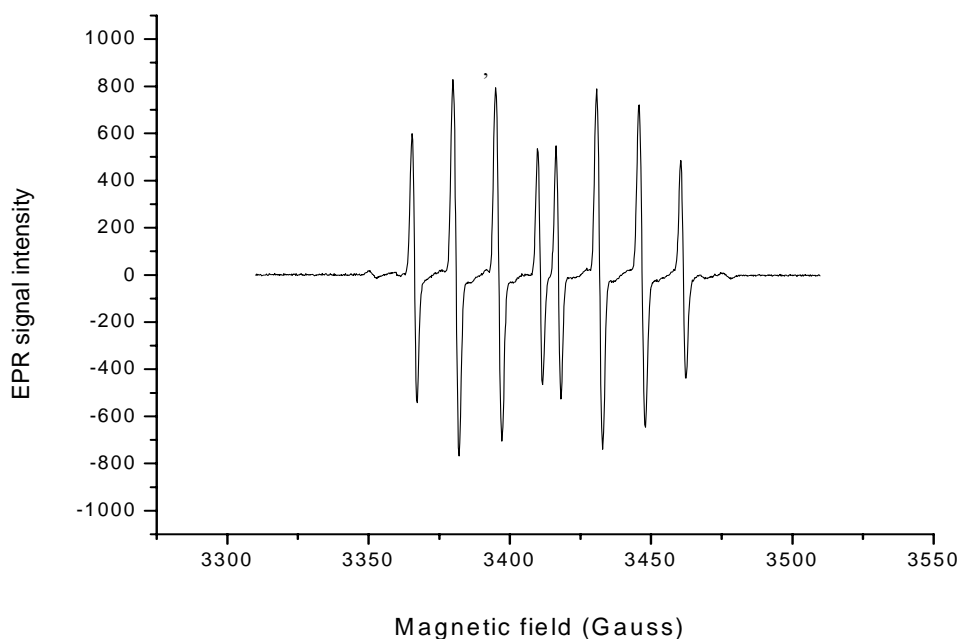
Reduktivna sposobnost ispitivanih ekstrakata izražena je preko EC_{50} vrednosti koja predstavlja koncentraciju ekstrakta pri kojoj se postiže apsorbanca od 0,5 na talasnoj dužini od 700 nm.

3.9.3. ODREĐIVANJE SKEVINDŽER AKTIVNOSTI HIDROKSIL I SUPEROKSID RADIKALA

3.9.3.1. ODREĐIVANJE RELATIVNE INHIBICIJE HIDROKSIL RADIKALA

Radi utvrđivanja skevindžer saktivnost $\cdot OH$ radikala etanolnih ekstrakata pečuraka postavljen je EPR *spin trapping* eksperiment. Skevindžer sposobnost $\cdot OH$ radikala ekstrakata pečuraka određena je pomoću Fento-ove reakcije kao generatorskog sistema ove radikalske vrste. Za izvođenje Fenton-ove reakcije korišćen je 0,5 mM H_2O_2 i 0,075 mM $FeSO_4$. Kao *spin trap* korišćen je DEPMPO. Finalna koncentracija DEPMPO korišćena u testu iznosila je 28 mM. DEPMPO sa $\cdot OH$ radikalom formira DEPMPO/OH adukt. Na slici 35 tačka označava DEPMPO/OH pik čiji je intenzitet meren. Finalna koncentracija ispitivanog ekstrakta bila je 0,2 mg/ml. Uzorak bez ekstrakta korišćen je kao kontrola. U svim eksperimentima korišćena je ultra čista voda (18 M Ω). Za svaki uzorak eksperiment je ponovljeni tri puta, a skvindžer aktivnost $\cdot OH$ radikala prikazana kao relativna inhibicija, $RI \pm S.D.$

EPR spektri su snimljeni na sobnoj temperaturi pomoću Varian E104-A EPR spektrometra sa sledećim podešavanjem: modulatorna amplituda, 2 G; modulatorna frekvencija, 100 kHz; mikrotalasna snaga, 10 mW; konstantno vreme, 0,032 s; centralno polje, 3.410 G; skan opseg, 200 G. Spektri su snimljeni uz pomoć EW softvera. Uzorci su uneti u gas-permeabilnu teflon kolonu (debljine zida 0,025 mm i sa unutrašnjim prečnikom kolone od 0,6 mm). Merenje je izvršeno pomoću kvarcne kapilare u koju je smeštena teflon kolona. Snimanje je započeto 2 minuta nakon početka reakcije, a vreme snimanja iznosilo je 4 minute.

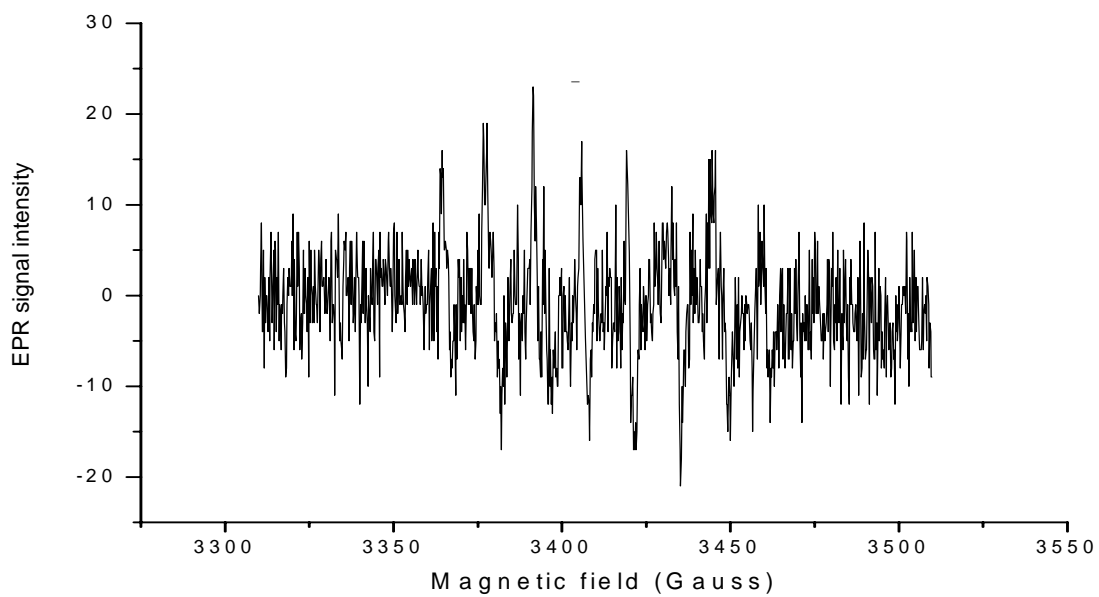


Slika 35. EPR signal DEPMPO adukta $\cdot\text{OH}$ radikala u Fenton-ovoj reakciji

3.9.3.2. ODREĐIVANJE RELATIVNE INHIBICIJE SUPEROKSID RADIKALA

Radi utvrđivanja skevindžer aktivnost $\cdot\text{O}_2^-$ radikala etanolnih ekstrakata pečuraka postavljen je EPR *spin trapping* eksperiment. Skevindžer aktivnost $\cdot\text{O}_2^-$ radikala ekstrakata pečuraka određena je pomoću hipoksantin/ksantin oksidaze (HX/XO) kao generatorskog sistema ove radikalske vrste. HX/XO sistem sastoji se od hipoksantina (1,6 mM) i ksantin oksidaze (1,6 IU/ml) koja je rastvorena u bidestilovanoj dejonizovanoj vodi (18 MΩ). Finalna koncentracija DEPMPO bila je 28 mM. DEPMPO reaguje sa $\cdot\text{O}_2^-$ nakon čega se formira DEPMPO/OOH adukt. Finalna koncentracija ispitivanih ekstrakata pečuraka bila je 0,2 mg/ml. Uzorak bez ekstrakta korišćen je kao kontrolni. Vreme inkubacije iznosilo je 2 minuta. Za svaki uzorak eksperiment je ponovljeni tri puta, a skvindžer aktivnost $\cdot\text{O}_2^-$ radikala prikazana kao relativna inhibicija, $\text{RI} \pm \text{S.D.}$

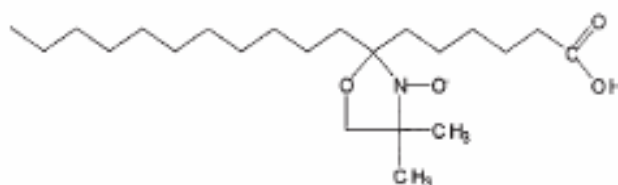
Podešavanje EPR-a bilo je identično je kao i u prethodnom eksperimentu. Slika 37 prikazuje EPR signal DEPMPO adukta dobijenog u HX/XO sistemu. Krug označava DEPMPO/OOH signal čija je amplituda merena. Može se primetiti i slab signal DEPMPO/OH adukta, ali to ne utiče na amplitude ili oblik centralnih linija DEPMPO/OOH signala.



Slika 36. EPR signal DEPMPPO adukta dobijen u HX/XO sistemu.

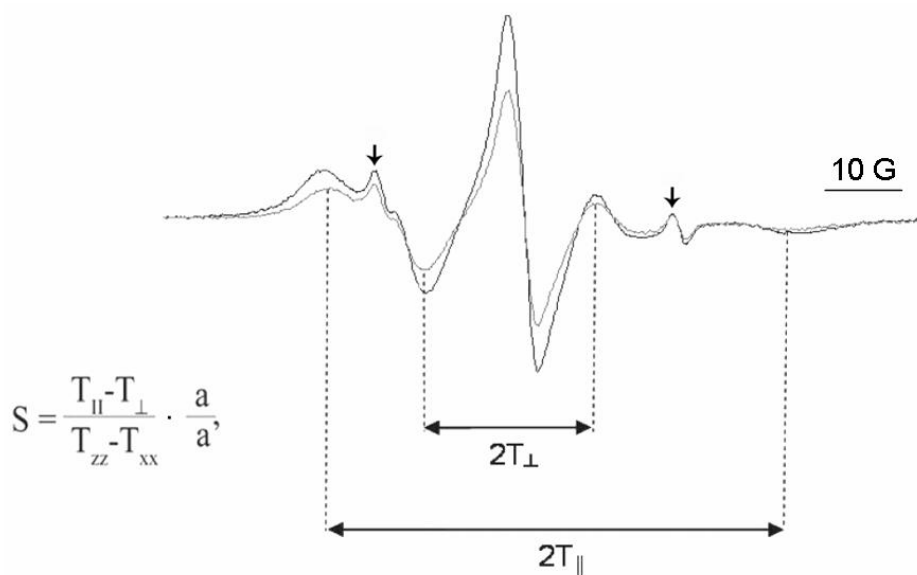
3.9.4. ISPITIVANJE UTICAJA EKSTRAKATA PEČURAKA NA PROCES LIPIDNE PEROKSIDACIJE

Sposobnost etanolnih ekstrakata pečuraka da spreče proces lipidne peroksidacije lipozoma ispitana je korišćenjem Fentonove reakcije kao generatorskog sistema $\cdot\text{OH}$ radikala. EPR *spin probing tehnika* i *membrane spin probe 7-DS* (slika 37) korišćeni su da bi omogućili promenu (smanjenje) fluidnosti membrane za koji se zna da koreliše da povećanom lipidnom peroksidacijom.



Slika 37. Struktura 7-DS

Na osnovu spektra 7-DS inkorporiranog u lipozome dobija se parameter S za koga je utvrđeno da je u recipročnoj zavisnosti sa fluidnošću membrane (Spasojević i saradnici, 2005).



Slika 38. EPR spektar lipozoma sa 7-DS

Na slici 38 prikazan je EPR spektar lipozoma sa 7-DS (crnom linijom označeni lipozomi tretirani OH[•] radikalima, sa sivom označeni netretirani lipozomi). S je parameter reda, $2T_{\parallel}$ - spoljašnje hiperfino razdvajanje, $2T_{\perp}$ - unutrašnje hiperfino razdvajanje, a - izotropna hiperfina kupling konstanta u kristalu [$a = 1/3(T_{xx} + T_{yy} + T_{zz})$]. a' - izotropna hiperfina kupling konstanta u membrani [$a' = 1/3(T_{\parallel} + 2T_{\perp})$]. T_{xx} , T_{yy} , T_{zz} su hiperfine konstante (za 7-DS; one su dobijene iz $T_{xx} = T_{yy} = 6.1$ G, $T_{zz} = 32.4$ G). Prethodna slika pokazuje i kako su $2T_{\parallel}$ i $2T_{\perp}$ netretiranog lipozoma merene. Vertikalne strelice potiču iz 7-DS rastvora.

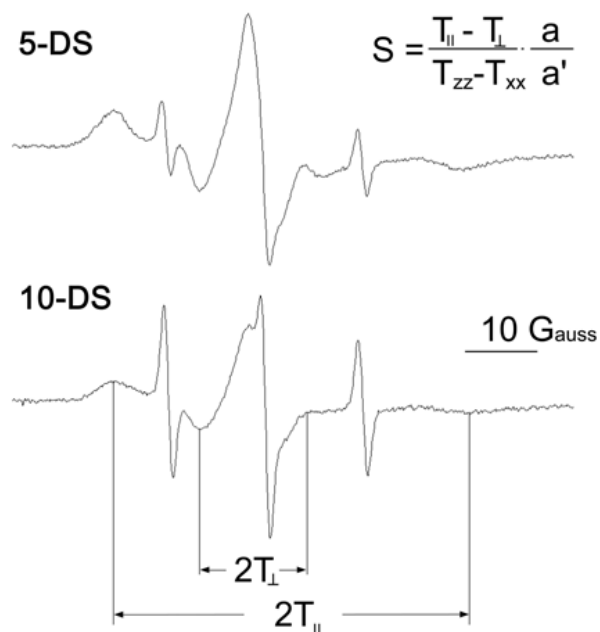
Za pripremu lipozoma korišćen je hloroformski rastvor L- α -fosfatidilholina koji je potpuno otparen pod vakuumom. Zatim je dodat fosfatni pufer (Na_2HPO_4 1,2 g/L, NaH_2PO_4 0,43 g/L, pH 7,4) da bi se dobila koncentracija od 125 mM lipida. Dobijena suspenzija je promešana na Vortex-u 5 min. Ekstrakti su rastvoreni u puferu do finalne koncentracije od 0,2 mg/mL (finalna koncentracija lipida bila je 100 mM). U kontrolni uzorak se umesto ekstrakta dodaje pufer u istoj zapremini. Uzorci se izlože dejstvu radikal generatorskog sistema, koji se sastoji od 0,5 mM H_2O_2 i 0,075 mM FeSO_4 , 20 minuta, nakon čega je dodata 10 puta veća zapremina fosfatnog pufera kako bi se zaustavila reakcija. Uzorci su centrifugirani 10 minuta na 10.000 o/min, a dobijeni supernatant je odbačen. Lipozomi su ponovo rastvoreni u puferu i u ovaj rastvor dodat je 7-DS (prethodno rastvoren u metanolu) nakon čega je smeša ponovo promešana na Vortex-u. Kontrolni uzorak tretiran je na isti način s tom razlikom što nije bio izložen radikal generatorskom sistemu. Korišćeni odnos *spin probe/membranski lipidi* iznosio je 1:200 (Suay i saradnici, 2000). Parametar S određen je iz spektralnih parametara koji su prikazani na slici 39. Za svaki uzorak eksperiment je ponovljen tri puta.

EPR spektri snimljeni su na sobnoj temperaturi pomoću Varian E104-A EPR spektrometra koji radi na X-traci (9,51GHz) sa sledećim podešavanjem: modulatorna amplituda, 2 G; modulatorna frekvencija, 100 kHz; mikrotalasna snaga, 10 mW; vremenska konstanta, 0,25 s; centar polja, 3390 G; scan opseg, 100 G; scan vreme, 8 minuta. Spektri su snimljeni pomoću EW softvera. Merenje je izvršeno pomoću kvarcne kapilare, a uzorci su smešteni u 10 cm dugačku gas-permeabilnu teflon kolonu, kao i u eksperimentu skevindžer aktivnosti hidrosil i superoksid radikala.

3.10. ISPITIVANJE UTICAJA SUPERKRITIČNIH EKSTRAKATA PEČURAKA NA FLUIDNOST MEMBRANE ERITROCITA

Uticaj superkritičnih ekstrakata pečuraka na fluidnost membrane eritrocita ispitan je na uzorku sveže krvi dobijene od dobrovoljnih davaoca primenom EPR metode. U cilju preciznijeg ispitivanja uticaja ekstrakta na fluidnost membrane eritrocita korišćene su dve *spin-probe*: 5-DS i 10-DS. Prva koristi da bi se prikupile informacije o fluidnosti membrane u blizini površine, dok se druga, 10-DS, koristi radi ispitivanja fluidnosti dubljih slojeva eritrocitne membrane. Sveža krv dobijena je od četiri zdrava dobrovoljna davaoca krvi, starosti između 30 i 35 godina. Krv je odmah po vađenju smeštena u specijalne kivete, u svaku po 3 ml, koje su sadržale 0,072 ml 7,5% K_3EDTA , kao antikoagulaciono sredstvo. Spinsko označavanje eritrocita, tačnije membrane eritrocita, izvršeno je prema ranijim istraživanjima (Tsuda i saradnici 2003; Živković i saradnici, 2008). Sveža krv isprana je tri puta sa izotoničnim fosfatnim puferskim rastvorom ($NaCl$ 8,8 g/L, Na_2HPO_4 1,2 g/L, NaH_2PO_4 0,43 g/L, pH je podešena do 7,4 dodatkom 1M HCl), a ovako pripremljen uzorak centrifugiran na 3500 o/min, 10 min, na 4°C. Hematokrit sveže krvi iznosi 40%, te je isti taj hematokrit (zapremina eritrocita u jedinici pune krvi) podešen u svim uzorcima pre procesa inkubacije. Ekstrakti su rastvoreni u metanolu, a ovaj rastvor razblažen puferom do koncentracije ekstrakta od 1 mg/ml, nakon čega su uzorci ostavljeni 2 sata da bi metanol otpario. Puferski rastvor ekstrakta dodat je eritrocitima do finalne koncentracije ekstrakta od 0,2 mg/ml. Svi uzorci su inkubirani 20 minuta na 37°C. Nakon inkubacije uzorci su centrifugirani na 3500 o/min, 10 min, na 4°C, supernatant je uklonjen i eritrociti rastvoreni u dva dela fosfatnog puferskog rastvora i isprani dva puta. Etanolni rastvor *spin-proba* 5-DS i 10-DS dodati su na zidove druge staklene kivete. Nakon što je sav etanol iz staklenih kiveta sa 5-DS i 10-DS otpario, u kivetu su dodati analizirani uzorci i pažljivo promućkani. DS je dodat eritrocitima u količini koja obezbeđuje optimalan *spin-label*/membranski lipidi odnos od oko 1:100. EPR spektri su snimljeni na Varian E104-A EPR spektrometru koji ima sledeća podešavanja: modulatorena amplituda, 2 G; modulatorena frekvencija, 100 kHz; mikrotalasna snaga, 10 mW; skan opseg, 100 G; skan vreme, 4 min; vremenska konstanta 0,5 s. U toku merenja temperatura je iznosila 20°C. Spektri su snimljeni i analizirani pomoću EW softvera. Parametar S se izračunava se prema jednačini datoj na slici 40. Ovaj parameter se koristi kao indikator membranske fluidnosti. Za svaki uzorak eksperiment je ponovljen tri puta. Rezultati su prikazani kao $S \pm S.D.$

Parametar S izračunava se kao što je prikazano na slici 39, gde je $2T_{II}$ je spoljašnje hiperfino razdvajanje, $2T_{\perp}$ je unutrašnje hiperfino razdvajanje; a je izotropna hiperfina kupling konstanta kristala [$a = 1/3(T_{xx} + T_{yy} + T_{zz})$]; a' je izotropna hiperfina kupling konstanta membrane [$a' = 1/3(T_{II} + 2T_{\perp})$]; T_{xx} , T_{yy} , T_{zz} su hiperfine konstante. Konstante za 5-DS su: $T_{xx} = T_{yy} = 6,1$ G i $T_{zz} = 32,4$ G; Konstante za 10-DS su: $T_{xx} = 6,26$ G $T_{yy} = 5,81$ G i $T_{zz} = 33,46$ G.



Slika 39. Karakteristični EPR spektri 5-DS i 10-DS membrane eritrocita

Isticanje kalijuma iz eritrocita koristi se kao indikator membranskog integriteta. Supernatanti dobijeni prema proceduri pripreme EPR uzoraka korišćeni su da bi se utvrdio nivo K^+ jona. Pufer (bez eritrocita) u koji su dodati ekstrakti do finalne koncentracije od 0,2 mg/ml korišćeni su kao kontrola, pošto i ekstrakti mogu da sadrže kalijum. Supernatant je razblažen 100 puta da bi se dobila koncentracija kalijuma koja je u opsegu detekcije plamenim fotometrom, nakon čega je ekstracelularni kalijum izmeren. Koncentracije K^+ određene su pomoću Jenway PFP7 plamenog fotometra. Plameni fotometar kalibrisan je pre merenja. Isticanje jona kalijuma mereno je na osnovu nivoa kalijuma u supernatantu eritrocita tretiranih ekstraktom i nivoa kalijuma u uzorcima bez eritrocita.

4. REZULTATI I DISKUSIJA

Ispitivanje različitih vrsta pečuraka u ovom radu obuhvata pripremu materijala za ekstrakciju, ekstrakciju sa dva ekstragensa (etanol i superkritični ugljendioksid), određivanje sadržaja određenih aktivnih komponenata ekstrakta (fenoli, flavonoidi, mikro- i makro-elementi, adenozin, masne kiseline, sterolna jedinjenja i dr.), kao i ispitivanje delovanja ekstrakata pečuraka, kao što su antioksidativno delovanje i delovanje na fluidnost membrane eritrocita.

4.1. SREDNJI PREČNIK ČESTICA USITNJENOG MATERIJALA

Srednji prečnik čestica usitnjenog materijala određen pomoću seta sita dat je u tabeli 7.

Tabela 7. Srednji prečnik čestica (d) usitnjenih pečuraka

Vrsta pečurke	Veličina čestica (mm)
<i>B. edulis</i>	0,283
<i>B. aurantiacus</i>	0,272
<i>C. fennica</i>	0,301
<i>C. pistillaris</i>	0,303
<i>A. mellea</i>	0,268
<i>A. tabascens</i>	0,282
<i>T. gibbosa</i>	0,608
<i>T. versicolor</i>	0,499
<i>D. confragosa</i>	0,487
<i>L. saccatum</i>	0,132
<i>L. perlatum</i>	0,167
<i>M. procera</i>	0,234

Srednji prečnik čestica usitnjenog materijala je relativno ujednačen i kreće se od 0,132 mm kod pečurke *L. saccatum* do 0,608 mm kod pečurke *T. gibbosa*. Na ovaj način su ispitivane pečurke pripremljene za operaciju ekstrakcije sa odgovarajućom usitnjenošću koja se preporučuje.

4.2. EKSTRAKCIJA ODABRANIH VRSTA PEČURAKA ETANOLOM

Etanol kao ekstragens, prema literaturnim podacima, korišćen je u ekstrakciji različitih vrsta pečuraka, pri čemu su dobijeni ekstrakti imali povoljne karakteristike u pogledu sastava i sadržaja farmakološki značajnih jedinjenja (Turkoglu i saradnici, 2007; Turkoglu i saradnici, 2007). Prednost etanola u odnosu na druge ekstragense je njegova netoksičnost i moguća dalja primena ovako dobijenih ekstrakata u farmaciji i prehrambenoj industriji. Prinos ekstrakcije nekih komponenata, kao što su antioksidanti, koji su uglavnom polarnog karaktera, povećava sa povećanjem polarnosti upotrebljenog ekstragensa. Povećanjem udela vode u upotrebljenom rastvarču povećava se i njegova polarnost, te se 50% etanol kao ekstragens može smatrati pogodnim za ekstrakciju jedinjenja ovog tipa.

Prinosi ekstrakcije odabranih vrsta pečuraka dobijenih primenom 50% etanola kao ekstragensa dati su u tabeli 8.

Tabela 8. Prinos ekstrakcije ostvaren primenom 50% etanola kao ekstragensa

Uzorak	Prinos (% , g/100 g)
<i>B. edulis</i>	39,09±0,17
<i>B. aurantiacus</i>	38,53±0,03
<i>C. fennica</i>	17,96±0,07
<i>C.pistillaris</i>	29,62±0,09
<i>A. mellea</i>	18,86±0,08
<i>A. tabascens</i>	23,96±0,10
<i>T. versicolor</i>	5,69 ±0,05
<i>T. gibbosa</i>	6,69 ±0,01
<i>D. confragosa</i>	8,43 ±0,02
<i>L. saccatum</i>	24,84 ±0,03
<i>L. perlatum</i>	24,37 ±0,11
<i>M.procera</i>	32,16 ±0,08

Ostvareni prinosi ekstrakcije kreću se od 5,69 do 39,09 g ekstrakta/100 g droge, odnosno % (m/m). Približno slični prinosi ekstrakcije dobijeni su kod obe vrste pečuraka genusa *Boletus*,

kao i kod obe vrste pečuraka genusa *Lycoperdon*. Nešto veća razlika u prinosu ekstrakcije uočena je kod pečuraka genusa *Clavaria*, gde je ostvaren prinos kod pečurke *C. pistillaris* (29,62%) značajno veći u odnosu na prinos ostvaren kod *C. fennica* (17,96%).

Najmanji prinosi ekstrakcije dobijeni su kod pečuraka familije *Polyporaceae*, *D. confragosa*, *T. gibbosa* i *T. versicolor* (8,43, 6,69 i 5,69%). Ovaj mali prinos ekstrakcije pečuraka familije *Polyporaceae* je očekivan, obzirom na njihovu specifičnu i drvenastu strukturu. Najveći prinos ekstrakcije ostvaren u odnosu na sve ispitivane pečurke je kod pečurke *B. edulis* (39,09%).

4.3. SADRŽAJ UKUPNIH FENOLA I FLAVONOIDA

Fenolna jedinjenja u odnosu na antioksidativno delovanje mogu da deluju kao redukujući agensi, antioksidansi donori vodonika, a imaju i osobine heliranja metala. Antioksidativno delovanje ovih komponenata potiče iz više elemenata njihove hemijske strukture. Rezultati prikazani u tabeli 9 pokazuju da se sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja u suvim ekstraktima ispitivanih pečuraka kreće od 13,78 do 72,48 mg EGK/g ekstrakta. Najmanji prinos ukupnih fenola određen je u ekstraktu pečurke *M. procera*.

Tabela 9. Sadržaj ukupnih fenola (TP), ukupnih flavonoida (TF) i TF/TP odnos u suvom ekstraktu pečuraka

Uzorak	Ukupni fenoli (TP) (mg EGK/g)	Ukupni flavonoidi (TF) (mg KE/g)	$\frac{TF}{TP} \times 100$ (%)
<i>B. edulis</i>	42,82±0,08	8,73±0,11	20,39
<i>B. aurantiacus</i>	36,43±0,09	17,62±0,05	48,37
<i>C. fennica</i>	42,27±0,03	23,70±0,06	52,30
<i>C. pistillaris</i>	72,48±0,07	36,51±0,09	50,37
<i>A. mellea</i>	26,89±0,02	16,18±0,08	60,17
<i>A. tabascens</i>	17,80±0,06	8,99±0,02	50,50
<i>T. versicolor</i>	22,43±0,03	3,36±0,04	14,98
<i>T. gibbosa</i>	25,10±0,02	2,41±0,01	9,60
<i>D. confragosa</i>	54,17±0,002	48,46±0,004	89,46
<i>L. saccatum</i>	36,88±0,06	2,88±0,009	7,81
<i>L. perlatum</i>	34,56±0,08	3,01±0,07	8,71
<i>M. procera</i>	13,78±0,04	1,87±0,05	13,57

Ako se uporede pripadnici istog genusa ekstrakt *B. edulis* sadrži nešto veće količine ukupnih fenolnih komponenata u poređenju sa ekstraktom *B. aurantiacus*. Isti je slučaj i sa *L. saccatum* u odnosu na *L. perlatum*, kao i *A. mellea* koji sadrži više ukupnih fenolnih jedinjenja u odnosu na ekstrakt *A. tabascens*. Značajna razlika u sadržaju ukupnih fenola ustanovljena je kod pripadnika genusa *Clavaria*, gde je u suvom ekstraktu pečurke *C. pistillaris* detektovana količina ukupnih fenolna veća za oko 30 mg EGK/g u odnosu na ekstrakt *C. fennica*. Kod drvenastih pečuraka familije *Polyporaceae* pečurka *D. confragosa* sadrži nešto više od oko dva puta veću količinu ukupnih fenolnih komponenata u odnosu na *T. versicolor* i *T. gibbosa*. Pečurka sa daleko najvećim sadržajem ukupnih fenolnih komponenata je ekstrakt pečurke *C. pistillaris* (72,48 mg EGK/g).

Sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja određen Folin-Ciocalteu metodom ne mora dati precizne podatke o količini ukupnih fenolnih jedinjenja u ekstraktima, zbog mogućeg prisustva interferirajućih jedinjenja, odnosno jedinjenja koja reaguju na isti način kao fenolna jedinjenja u ovoj reakciji (poput šećera, aromatičnih amina, vitamina C, organskih kiselina, Fe(II), itd.) (Singelton i saradnici, 1999).

Mau i saradnici (2002) su utvrdili da se ukupan sadržaj fenolnih komponenata u metanolnim ekstraktima nekoliko lekovitih vrsta pečuraka (*D. indusiata*, *G. frondosa*, *H. erinaceus* i *T. giganteum*) kreće od oko 7 do oko 16 mg/g, što je značajno manje u odnosu na neke ekstrakte ispitivane u ovom radu. Sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja u metanolnim ekstraktima nekoliko vrsta lekovitih i jestivih pečuraka (*A. bisporus*, *P. squamosus*, *P. ostreatus*, *L. nuda*, *R. delica*, itd.), određen primenom metode po Folin-Ciocalteu i sračunat na ekvivalent galne kiseline, iznosio je od oko 7 do oko 26 mg EGK/g. Primenom etanola kao ekstragensa dobijen je ekstrakt pečurke *Laetiporus sulphureus* sa visokim sadržajem ukupnih fenolna (63,8 mg/g), kao i ekstrakt pečurke *Morchella conica* sa sadržajem fenola od 41,93 mg/g (Turkoglu, 2007). Sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja određen u istraživanju Turkoglu i saradnika uporediv je sa ukupnim sadržajem fenolnih jedinjenja ispitivanih vrsta pečuraka u ovom radu.

Sadržaj ukupnih flavonoida (TF) u analiziranim suvim ekstraktima pečuraka kreće od 1,87 mg KE/g za ekstrakt *M. procera* do 48,46 mg KE/g za ekstrakt *D. confragosa* (tabela 9). Veliki sadržaj flavonoida detektovan je i u suvom ekstraktu pečurke *C. pistillaris* (136,51 mg KE/g), dok je sadržaj (oko 3 mg KE/g) ekstrakta određen za obe vrste genusa *Lycoperdon*, *L. saccatum* i *L. perlatum*, kao i za drvenaste pečurke *T. gibbosa* i *T. versicolor*.

U naučnoj literaturi mnogo je manje podataka o sadržaju ukupnih flavonoidnih jedinjenja u pečurkama i njihovim ekstraktima u odnosu na podatke o ukupnim fenolima. Podaci o sadržaju ovih jedinjenja u pečuraka uglavnom se tiču podatakla u vrstama koje nisu bile predmet istraživanja ovog rada. Među dostupnim literaturnim podacima je podatak za sadržaj ukupnih flavonoidnih jedinjenja u ekstraktu jestive pečurke *R. delica* od oko 8 mg/g sračunato na kvercetrin kao ekvivalent (Turkoglu i saradnici, 2007). Sličan sadržaj ukupnih flavonoidna određen je i za ekstrakt pečurke *Ramaria flava* (Gezer i saradnici, 2006). U oba slučaja za određivanje ukupnih flavonoida korišćen je $AlCl_3$. Sadržaj ukupnih flavonoidnih komponenata u metanolnim ekstraktima *Lactarius deterrimus*, *Suillus collitinus*, *B. edulis* i *Xerocomus chrysenteron*, o kome izveštavaju Sarikurkcun i saradnici (2008), određen istom

spektrofotometrijskom metodom, vrlo je mali i iznosi od 0,3 do 0,5 mg ekvivalenta kverceterina/g ekstrakta. Posmatrano u odnosu na suhu materiju poznat je i sadržaj flavonoida u najčešće korišćenim vrstama pečuraka (*A. bisporus*, *P. ostreatus* i *L. edodes*) za koje je utvrđeno da sadrže od 0,08 do 5 mg ukupnih flavonoida na 100 g suve materije (Mattila i saradnici, 2001). Poređenjem dobijenih rezultata sadržaja ukupnih flavonoida ispitivanih vrsta pečuraka u ovom radu može se zaključiti da je on značajno veći, kod nekih vrsta u odnosu na literaturno dostupne podatke.

Flavonoidi, zahvaljujući svojoj hemijskoj strukturi, spadaju u fenolna jedinjenja sa najizraženijim antioksidativnim delovanjem. Udeo ukupnih flavonoida u ukupnim fenolima mogao bi da ima uticaja na jačinu antioksidativnog delovanja pečurke ili odgovarajućeg ekstrakta. Vrlo visok udeo flavonoida u odnosu na ukupne fenole dobijen je u ekstraktu pečurke *D. confragosa* (89,46%). S druge strane, najmanji udeo flavonoida u ukupnim fenolima sadrže obe analizirane *Lycoperdon* vrste, gde je taj udeo oko 8%. Na osnovu ovih rezultata može se pretpostaviti da ispitivane pečurke mogu pokazati značajno antioksidativno delovanje u zavisnosti od ukupnog sadržaja fenolnih jedinjenja, odnosno flavonoida. Pečurke se potencijalnim antioksidativnim delovanjem su *B. edulis*, *C. pistillaris* i *D. confragosa*.

4.4. ANTIOKSIDATIVNO DELOVANJE

4.4.1. DPPH TEST

Kao prvi test u istraživanju antioksidativnog delovanja ekstrakata odabranih vrsta pečuraka korišćen je DPPH test. Većina naučnih istraživanja koja se bave izučavanjem antioksidativnog delovanja nekog prirodnog materijala, što se odnosi i na istraživanja u oblasti pečuraka, primenjuju upravo kao jednu od osnovnih i prvih metoda analize, kojima se utvrđuje postojanje antioksidativnog delovanja, DPPH test. Koristeći ovaj test Turkoglu i saradnici (2007) ispitivali su antioksidativno delovanje etanolnog ekstrakta pečurke *Leatiporus sulphureus*. Utvrđeno da ekstrakt ove pečurke pri koncentraciji od 0,2 mg/ml dostiže RSC vrednost od 26%, dok se IC₅₀ vrednost postiže pri koncentraciji od oko 0,4 mg/ml. Ista grupa naučnika proučavajući etanolni ekstrakt pečurke *R. delica* ustanovila je da ovaj ekstrakt IC₅₀ vrednost postiže pri koncentraciji od 0,207 mg/ml (Turkoglu i saradnici, 2007). Primenom DPPH metode u ispitivanju antioksidativnog delovanja metanolnog ekstrakta pečurke *B. edulis* sa područja Anatolije u Turskoj, utvrđeno je da se RSC vrednost od oko 47% postiže pri koncentraciji od 0,5 mg/ml. Pri istoj koncentraciji RSC vrednost metanolnog ekstrakta *L. deterrimus* mnogo je manja, i iznosi 11,50% (Sarikurcku i saradnici, 2008). Pri koncentraciji od 0,180 mg/ml metanolni ekstrakti pečuraka *L. nuda*, *P. squamosus* i *P. ostreatus*, dostižu RSC vrednost od 91,3%, 82,8 i 81,3% (Elmastas i saradnici, 2006). Koncentracija metanolnog ekstrakta pečurke *A. bisporus* potrebna da se inhibira 50% DPPH radikala vrlo je visoka, i iznosi oko 2 mg/ml (Elmastas i saradnici, 2006).

Primenom DPPH testa utvrđeni su parametri antioksidativnog delovanja poznatih antioksidativnih supstanci poput sintetičkog BHT (butilovani hidroksitoluen), zatim vitamina C i α -tokoferola. Pri finalnoj koncentraciji od 0,02 mg/ml BHT, često primenjivan sintetički

antioksidant, dostiže RSC vrednost od 94,52%. Pri istoj koncentraciji antioksidativna aktivnost α -tokoferola izražena preko RSC vrednosti iznosi 98,15% (Gezer i saradnici, 2006). Takođe, utvrđeno je da koncentracija vitamina C potrebna da se inhibira dejstvo 50% DPPH radikala, odnosno IC_{50} vrednost, iznosi 0,005 mg/ml (Song i saradnici, 2003).

Tabela 10. Radical scavenging capacity (RSC (%)) za finalnu koncentraciju ekstrakata pečuraka od 0,02 mg/ml

Ekstrakt pečurke	RSC (%)	IC_{50} (mg/ml)
<i>B. edulis</i>	54,69 \pm 2,0	0,0160 \pm 0,003
<i>B. aurantiacus</i>	45,35 \pm 0,4	0,0240 \pm 0,004
<i>C. fennica</i>	23,45 \pm 1,5	0,0320 \pm 0,002
<i>C. pistillaris</i>	96,32 \pm 1,8	0,0104 \pm 0,001
<i>A. mellea</i>	92,16 \pm 2,0	0,0108 \pm 0,002
<i>A. tabascens</i>	10,07 \pm 1,1	0,2828 \pm 0,004
<i>T. versicolor</i>	8,29 \pm 0,3	0,1390 \pm 0,005
<i>T. gibbosa</i>	8,27 \pm 0,09	0,055 \pm 0,003
<i>D. confragosa</i>	67,55 \pm 0,5	0,0150 \pm 0,007
<i>L. saccatum</i>	61,91 \pm 1,0	0,0161 \pm 0,001
<i>L. perlatum</i>	17,56 \pm 0,3	0,0420 \pm 0,003
<i>M. procera</i>	44,79 \pm 0,9	0,0310 \pm 0,003

Primenom DPPH testa određena je skevindžer aktivnost DPPH[•] radikala pri koncentraciji ispitivanih ekstrakta pečuraka od 0,02 mg/ml (tabela10). Pri ovoj koncentraciji ekstrakata najveću RSC vrednost, a time i najveću antioksidativnu aktivnost, od preko 90%, postižu ekstrakti *C. pistillaris* i *A. mellea*. RSC vrednosti ekstrakata ove dve vrste pečuraka gotovo su identične sa literaturnim podacima poznatih antioksidanata α -tokoferola i eksperimentalno određenim vrednostima sintetičkog antioksidanta BHT pri istoj ispitivanoj koncentraciji od 0,02 mg/ml. Kao najslabiji skevindžeri DPPH[•] radikala, sa RSC vrednošću od oko 8%, pokazali su se ekstrakti drvenastih pečuraka *T. versicolor* i *T. gibbos*. Najnižu IC_{50} vrednost, što implicira najveću antioksidativnu aktivnost, postiže etanolni ekstrakt pečurke *C. pistillaris* (0,0104 mg/ml). U odnosu na antioksidativnu aktivnost vitamina C, izraženu takođe preko IC_{50} vrednosti, od 0,005 mg/ml (Song i saradnici, 2003), može se zaključiti da je aktivnost ove pečurke oko dva puta manja, ali se ona i dalje može smatrati vrlo visokom antioksidativnom aktivnošću.

Oba ekstrakta genusa *Boletus* pokazala su dobro antioksidativno delovanje. Antioksidativno delovanje *B. edulis* ekstrakta već pri ispitivanoj koncentraciji prelazi 50%. Ovo je mnogo jače antioksidativno delovanje od antioksidativnog delovanja metanolnog ekstrakta *B. edulis* sa područja Anatolije (Sarikurku i saradnici, 2008). Antioksidativno delovanje *B. aurantiacus* nešto je slabije, o čemu svedoči i nešto veća IC₅₀ vrednost (0,024 mg/ml) u odnosu na IC₅₀ vrednost *B. edulisa* (0,0160 mg/ml).

Antioksidativno delovanje etanolnog ekstrakta *C. pistillaris* je veće (oko 3 puta) od antioksidativnog delovanja ekstrakta *C. fennica*. Zbog izuzetno male IC₅₀ vrednosti ekstrakta *C. pistillaris*, ova pečurka odnosno njen ekstrakt se možemo izdvojiti kao prirodno sredstvo visokog antioksidativnog delovanja.

I kod genusa *Armillaria* jedna od vrsta (*A. mellea*) pokazuje daleko jače antioksidativno delovanje, daleko veću RSC vrednost i daleko manju IC₅₀, u odnosu na ekstrakt *A. tabescens*, pa se može smatrati relativno jakim antioksidativnim proizvodom. Slično se može zaključiti i za pečurke genusa *Lycoperdon*.

Od tri ispitivane *Polyporaceae* vrste, *D. confragosa* već pri koncentraciji od 0,02 mg/ml postiže RSC vrednost veću od 50%, dok je ista vrednost za druge dve ispitivane vrste daleko manja, ispod 10%.

Jedina ispitivana vrsta genusa *Macrolepiota*, *M. procera*, pri ispitivanoj koncentraciji od 0,02 mg/ml postiže RSC vrednost od oko 45%.

Skevindžer aktivnost DPPH[•] radikala suvih ekstrakata pečuraka smanjuje se prema sledećem redosledu: *C. pistillaris* > *A. mellea* > *D. confragosa* > *L. saccatum* > *B. edulis* > *B. aurantiacus* > *M. procera* > *C. fennica* > *L. perlatum* > *A. tabescens* > *T. versicolor* > *T. gibbosa*.

Proizvod koji bi se na osnovu ovih preliminarnih testova, odnosno sadržaja ukupnih fenola i flavonoida, kao i inhibitornog delovanja na DPPH radikale, mogao izdvojiti kao potencijalni preparat izrazitog antioksidativnog delovanja je suvi ekstrakt *C. pistillaris*.

Poređenjem rezultata iz tabele br. 10 i saržaja ukupnih fenola i ukupnih flavonoida (tabela 9) može se zaključiti da fenoli i flavonoidi nisu jedini nosioci antioksidativnog delovanja ekstrakata pečuraka, već da je ovo delovanje uzrokovano postojanjem još nekih antioksidativnih komponenata.

Na osnovu dobijenih rezultata antioksidativnog delovanja primenom DPPH testa, kao i na osnovu sadržaja ukupnih fenola i flavonoida u ekstraktima, izvršen je odabir pečuraka sa najjačim delovanjem, iz svakog genus po jedan predstavnik, koji će u daljem radu biti ispitivani. To su ekstrakti pečuraka: *C. pistillaris*, *A. mellea*, *D. confragosa*, *L. saccatum*, *B. edulis* i *M. procera*.

4.4.2. REDUCING POWER

Reducing power (reduktivni kapacitet) neke komponente može da posluži kao značajan indikator njegove potencijalne antioksidativne aktivnosti (Meir i saradnici, 1995). Merenje reduktivne sposobnosti se zasniva na praćenju i ispitivanju transformacije $\text{Fe}^{3+} \rightarrow \text{Fe}^{2+}$ u prisustvu ekstrakata pečuraka primenom metodu po Oyaizu (1986). Veća apsorbancija ukazuje na veću reduktivnu sposobnost. U ovoj metodi, žuta boja test rastvora menja se u različite nijanse zelene ili plave, u zavisnosti od redukcionne moći svake prisutne komponente u ispitivanom uzorku. U prisustvu reduktanata (antioksidativnih komponenata) dolazi do redukcije Fe^{3+} fericijanidnog kompleksa u Fe^{2+} formu, a ova transformacija prati se na 700 nm merenjem formacije Perlovog prusijanskog plavog (Fereira i saradnici, 2007).

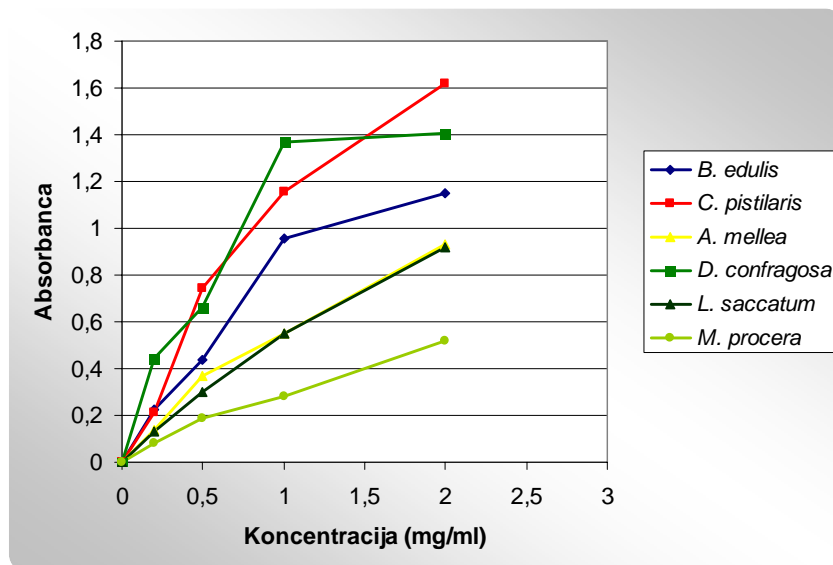
Mau i saradnici (2002) istraživali su reduktivnu sposobnost metanolnih ekstrakata pečuraka *G. frondosa*, *H. erinaceus* i *T. giganteum*, i utvrdili da reduktivna sposobnost ekstrakata ovih pečuraka pri koncentraciji od 9 mg/ml odgovara absorbancama od 1,18, 1,01 i 0,63. Sarikurcku i saradnici (2008) ispitivali su reduktivnu sposobnost metanolnih ekstrakata nekoliko vrsta pečuraka sa područja Anatolije u Turskoj (*S. collitinus*, *B. edulis*, *X. chrysenteron* i *L. deterrimus*). Ustanovljeno je da reduktivni kapacitet ovih pečuraka pri koncentraciji od 1 mg/ml odgovara absorbancama u opsegu od 0,144 do 0,284, dok je pri koncentraciji od 2 mg/ml opseg dobijenih apsorbanci nešto veći i iznosi od 0,284 do 0,574. Pri koncentraciji od 1 mg/ml apsorbancija ekstrakta *B. edulis* iznosi 0,263, a pri koncentraciji od 2 mg/ml vrednost je 0,481 (Sarikurcku i saradnici, 2008).

Reduktivna sposobnost ispitivanih suvih ekstrakata šest različitih vrsta pečuraka raste sa porastom koncentracije (tabela 11). Na maksimalnoj ispitivanoj koncentraciji od 2 mg/ml vrlo visoke apsorbance (preko 1) a time i visoku reduktivnu sposobnost, pokazuju ekstrakti pečuraka *B. edulis*, *C. pistillaris* i *D. confragosa*. Visoka reduktivna moć ove tri vrste može biti uslovljena značajnijim udelom komponenata koje su u stanju da stabilizuju radikale ili da završe radikalsku lančanu reakciju, odnosno velikim sadržajem ukupnih fenola ili velikim udelom flavonoidnih komponenata, kao u slučaju ekstrakata *C. pistillaris* i *D. confragosa* (tabela 9). Reduktivna sposobnost suvog ekstrakta *B. edulis* oko 4 puta je veća u odnosu na metanolni ekstrakt iste pečurke sa područja Anatolije (Sarikurcku i saradnici, 2008), što ukazuje na moguću važnost primenjenog ekstragensa, a možda i primenjene metode ekstrakcije. Najmanju reduktivnu sposobnost, na svim ispitivanim koncentracijama, pokazuje ekstrakt pečurke *M. procera*, što je i očekivano, obzirom na vrlo mali sadržaj TF (1,87 mg KE/g), odnosno TP (13,78 mg EGK/g).

Tabela 11. Reduktivna sposobnost ekstrakata pečuraka izražena preko absorbance za različite koncentracije

Ekstrakt	Absorbanca			
	Koncentracija (mg/ml)			
	0,2	0,5	1,0	2,0
<i>B. edulis</i>	0,223±0,004	0,439±0,004	0,957±0,007	1,151±0,004
<i>C. pistillaris</i>	0,212±0,002	0,745±0,002	1,156±0,007	1,620±0,010
<i>A. mellea</i>	0,135±0,004	0,369±0,004	0,552±0,002	0,933±0,009
<i>D. confragosa</i>	0,442±0,005	0,665±0,003	1,369±0,011	1,407±0,012
<i>L. saccatum</i>	0,133±0,002	0,299±0,003	0,553±0,004	0,919±0,007
<i>M. procera</i>	0,082±0,003	0,187±0,001	0,283±0,002	0,517±0,002

Reduktivna sposobnost suvih ekstrakata ispitivanih pečuraka prikazana je i na slici 40.

**Slika 40.** Reduktivna sposobnost suvih ekstrakata ispitivanih pečuraka u zavisnosti od koncentracije

Reduktivna sposobnost različitih uzoraka prirodnog materijala obično se poredi sa reduktivnom sposobnošću nekog poznatog antioksidansa, kao što su askorbinska kiselina, α -tokoferol ili sintetički antioksidanati BHT ili BHA (butilovani hidroksianizol). Reduktivna sposobnost askorbinske kiseline u zavisnosti od koncentracije prikazana je u tabeli 12.

Tabela 12. Reduktivna sposobnost askorbinske kiseline izražena preko absorbance na različitim koncentracijama

Askorbinska kiselina	0,01 mg/ml	0,05 mg/ml	0,1 mg/ml	0,2 mg/ml	0,5 mg/ml
Absorbanca	0,117±0,002	0,535±0,003	1,060±0,001	1,192±0,004	1,394±0,009

Reduktivni kapacitet nekog ekstrakta može se izraziti preko EC_{50} vrednosti parametra koji predstavlja koncentraciju (mg/ml) pri kojoj se postiže absorbanca od 0,5 i koji se dobija interpolacijom iz linearne regresione analize. Savoie i saradnici (2008) istraživali su reduktivni kapacitet metanolnih ekstrakata više različitih uzoraka pečurke *A. bisporus* i ustanovili da se EC_{50} vrednost ekstrakata ove pečurke kreće u opsegu od oko 1,5 do oko 3 mg/ml. Dobijene EC_{50} vrednosti obično se poredi sa EC_{50} vrednošću poznatog antioksidanta. EC_{50} vrednost za askorbinsku kiselinu, kao i EC_{50} vrednosti suvih ekstrakata ispitivanih pečuraka, dati su u tabeli 13. Najmanju EC_{50} vrednost, a time i najveći reduktivni kapacitet, postižu ekstrakti *D. confragosa* i *C. pistillaris* (0,278 i 0,362 mg/ml). EC_{50} askorbinske kiseline mnogo je veća od EC_{50} vrednosti ekstrakata ovih pečuraka. Poređenjem reduktivnih kapaciteta ispitivanih ekstrakata sa ranijim istraživanjima (Sarikureku, 2008; Mau, 2002), može se zaključiti da ispitivani ekstrakti u ovom radu imaju visoku reduktivnu sposobnost.

Tabela 13. EC_{50} vrednost suvih ekstrakata ispitivanih pečuraka

Uzorak	EC_{50} (mg/ml)
<i>B. edulis</i>	0,559
<i>C. pistillaris</i>	0,362
<i>A. mellea</i>	0,858
<i>D. confragosa</i>	0,278
<i>L. saccatum</i>	0,896
<i>M. procera</i>	1,927
Askorbinska kiselina	0,047

Reduktivna sposobnost ekstrakata pečuraka, na osnovu dobijenih EC₅₀ vrednosti, opada u sledećem nizu: *D. confragosa* > *C. pistillaris* > *B. edulis* > *A. mellea* > *L. saccatum* > *M. procera*. Reduktivna sposobnost svih ispitivanih ekstrakata mnogo je manja u odnosu na reduktivnu sposobnost askorbinske kiseline.

Na osnovu rezultata ovog ispitivanja, kao ekstrakt sa najvećom reduktivnom sposobnošću može se izdvojiti ekstrakt *D. confragosa*.

4.4.3. ANTIOKSIDATIVNO DELOVANJE EKSTRAKATA PEČURAKA NA HIDROKSIL I SUPEROKSID RADIKALE

EPR metoda je široko prihvaćena, vrlo osetljiva i precizna metoda na kojoj su se bazirala ispitivanja antioksidativnog delovanja mnogih prirodnih proizvoda (Gođevac i saradnici, 2008; Spasojević i saradnici, 2008). EPR spektroskopija omogućava prikupljanje niza informacija o antioksidativnom kapacitetu ispitivanog materijala u odnosu na fiziološki značajne reaktivne vrste kao što su superoksid radikal, hidroksil radikal i H₂O₂ (Spasojević i saradnici, 2008). Ukoliko se poredi sa ostalim metodama, npr. spektrofotometrijskim, EPR spektroskopija je u odnosu na njih daleko osetljivija i brža metoda za određivanje antioksidativnog delovanja.

Superoksid i hidroksil radikali se ne mogu direktno detektovati zbog njihove reaktivnosti, odnosno kratkog vremena postojanja. Zbog toga, radi određivanja antioksidativnog delovanja neke komponente na ove reaktivne radikale, u sistem je potrebno uvesti posebnu komponentu koja se naziva *spin-trap*. *Spin-trap* reaguje sa slobodnim radikalima, pri čemu se formira stabilna paramagnetna vrsta *spin-adukt*, koji se može detektovati primenom EPR spektroskopije. Uvođenjem antioksidativne komponente u ovaj sistem dolazi do smanjenja produkcije *spin-adukta*, što se ispoljava kao smanjenje EPR signala. U ovom istraživanju kao jedan od najefikasnijih *spin-trapova* korišćen je DEPMPO.

Vrlo je malo podataka o skevindžer aktivnosti $\cdot\text{OH}$ i $\cdot\text{O}_2^-$ radikala ekstrakata pečuraka. Ispitivanjem delovanja ekstrakata na ove dve vrste radikala bavili su se Nakajima i saradnici (2007). Oni su ispitivali antioksidativno delovanje vodenih ekstrakata tri vrste pečuraka (*G. lucidum*, *Phellinus linteus* i *A. blazei*) pri čemu je utvrđeno da ove vrste pečuraka inhibiraju 50% superoksid radikala pri koncentraciji ekstrakta od oko 2 mg/ml, a za inhibiciju 50% hidroksil radikala potrebne su nešto veće koncentracije, u opsegu od oko 2 do oko 11 mg/ml.

U tabeli 14 date su skevindžer aktivnosti $\cdot\text{O}_2^-$ radikala pri finalnoj koncentraciji ispitivanog ekstrakta od 0,2 mg/ml. Svi analizirani suvi ekstrakti pečuraka pokazuju skevindžer aktivnost ovog radikala, ali je ta aktivnost različitog intenziteta i kreće se u opsegu od vrlo male aktivnosti (*D. confragosa*), od oko 6%, do značajne aktivnosti, od oko 64% (*B. edulis*). Nešto niža, ali i dalje značajna je aktivnost ekstrakta pečurke *A. mellea*. Skevindžer aktivnost manju od 50%, pokazala su tri suva ekstrakta (*C. pistillaris*, *L. saccatum* i *M. procera*). Na ispitivanoj koncentraciji RI standardne antioksidativne komponente askorbinske kiseline bila je 85±5%.

Proizvod koji bi se na osnovu delovanja na superoksid radikal mogao izdvojiti kao potencijalni preparat izrazitog antioksidativnog delovanja je suvi ekstrakt *B. edulis* čija je RI vrednost uporediva sa vrednošću standardne antioksidativne komponente askorbinske kiseline.

Tabela 14. Antioksidativno delovanje suvih ekstrakata pečuraka na $\cdot\text{OH}$ i $\cdot\text{O}_2^-$ radikale pri koncentraciji ekstrakta od 0,2 mg/ml.

Ekstrakt pečurke	RI (%) $\cdot\text{O}_2^-$ radikala	RI (%) $\cdot\text{OH}$ radikala
<i>B. edulis</i>	64±2	82±3
<i>C. pistillaris</i>	36±5	82±3
<i>A. mellea</i>	57±3	85±4
<i>L. saccatum</i>	40±5	73±4
<i>D. confragosa</i>	6±1	56±2
<i>M. procera</i>	35±3	0

U tabeli 14 prikazane su skevindžer aktivnosti $\cdot\text{OH}$ radikala ispitivanih suvih ekstrakata pečuraka. Ovaj radikal se smatra jednom od najopasnijih i najreaktivnijih radikalskih vrsta, pa je i njegova inhibicija, odnosno deaktivacija, vrlo značajna. Skevindžer aktivnost hidrosil radikala postoji u gotovo svim ispitivanim ekstraktima pečuraka, ali je ona, kao i u slučaju superoksid radikala, različitog intenziteta. Ekstrakti *B. edulis*, *C. pistillaris* i *A. mellea* pokazuju sličnu skevindžer aktivnost ovog radikala, veću od 80%. Ekstrakti pečuraka *L. saccatum* i *D. confragosa* pokazuju nešto slabiju skevindžer aktivnost u odnosu na prethodna tri ekstrakta, ali je njihova aktivnost takođe značajna, i iznosi 73% i 56%. Kao jedini neefikasan skevindžer $\cdot\text{OH}$ radikala pokazao se ekstrakt pečurke *M. procera*, koji poseduje čak i prooksidativno delovanje. Na ispitivanoj koncentraciji RI standardne antioksidativne komponente askorbinske kiseline bila je 100±3%.

Koncentracija pri kojoj neki od ispitivanih ekstrakta neutrališu 50% radikalskih vrsta, superoksid ili hidrosil radikala, mnogo je manja od koncentracija pri kojoj su to pokazivali vodeni ekstrakti pečuraka *G. lucidum*, *A. blazei* i *P. linteus* (Nakajima i saradnici, 2007), što može da govori o značaju primenjenog ekstragensa i, eventualno, tehnike ekstrakcije.

Suvi ekstrakti ispitivanih vrsta pečuraka, osim *M. procera*, mogu se smatrati potencijalno korisnim ekstraktima za tretman patofizioloških procesa izazvanih hidrosil radikalima, jer pri koncentraciji od 0,2 mg/ml, koja se može smatrati niskom koncentracijom, inhibiraju delovanje više od 50% radikala.

4.4.4. LIPIDNA PEROKSIDACIJA

Slobodni radikali mogu da indukuju lipidnu peroksidaciju koja može dovesti do narušavanja integriteta membrane. Lipidna peroksidacija je povezana sa smanjenjem fluidnosti membrane (Rosen i saradnici, 1983). Poznato je da promena u fluidnosti membrane utiče na osobine i funkcionisanje membrane ćelije, na rast ćelije, transdukciju signala, permeabilnost membrane, transportni sistem, receptorske funkcije ili aktivnost enzima (Cooper, 1977; Hitzemann i saradnici, 1986; Parks i saradnici, 2000; Zicha i saradnici, 1999).

U tabeli 15 su dati dobijeni rezultati za parametar S: čistog lipozoma, lipozoma izloženog Fentonovom sistemu, lipozoma pomešanog sa ekstraktom pečuraka i lipozoma pomešanog sa ekstraktom pečuraka i izloženog Fenton-ovom sistemu. Merenja parametra S čistog lipozoma i lipozoma izloženog Fenton-ovom sistemu urađena su da bi se utvrdio stepen smanjenja fluidnosti membrane (koji je recipročan parametru S) izazvan Fenton-ovim sistemom. Parametar S netretiranog lipozoma u kombinaciji sa ekstraktom potreban je da bi se ustanovilo postoje li komponente u ekstraktu pečuraka koje izazivaju promenu fluidnosti membrane i koje mogu da utiču na mehanizam zaštite od peroksidacije. U tretiranim uzorcima Fenton-ova reakcija je primenjena kao generatorski sistem radikala.

Tabela 15. Parametar S lipozoma i lipozoma u kombinaciji sa ekstraktom pečuraka izmeren primenom EPR i spin probe 7-DS

	Uzorak	S ± S.D.
Kontrola	Netretirani lipozomi	0,588 ± 0,003
	Tretirani lipozomi	0,617 ± 0,003
<i>M. procera</i>	Netretirani lipozomi/ekstrakt	0,544 ± 0,003
	Tretirani lipozomi/ekstrakt	0,571 ± 0,006
<i>A. mellea</i>	Netretirani lipozomi/ekstrakt	0,608 ± 0,007
	Tretirani lipozomi/ekstrakt	0,594 ± 0,007
<i>B. edulis</i>	Netretirani lipozomi/ekstrakt	0,591 ± 0,006
	Tretirani lipozomi/ekstrakt	0,592 ± 0,001
<i>C. pistillaris</i>	Netretirani lipozomi/ekstrakt	0,614 ± 0,002
	Tretirani lipozomi/ekstrakt	0,619 ± 0,004
<i>D. confragosa</i>	Netretirani lipozomi/ekstrakt	0,597 ± 0,002
	Tretirani lipozomi/ekstrakt	0,604 ± 0,007
<i>L. saccatum</i>	Netretirani lipozomi/ekstrakt	0,592 ± 0,007
	Tretirani lipozomi/ekstrakt	0,594 ± 0,003

Iz rezultata datih u tabeli 15 može se zaključiti da nekoliko ispitivanih ekstrakata pečuraka mogu imati protektivnu ulogu u procesu lipidne peroksidacije. Kod uzoraka koji nemaju protektivno delovanje dolazi do povećanja parametra S, odnosno do smanjenja fluidnosti membrane lipozoma koji su izloženi Fenton-ovom sistemu. O povećanju fluidnosti membrane treba voditi računa ukoliko se razmišlja o primeni ispitivanog prirodnog izvora kao leka, jer se smatra da promene u fluidnosti membrane utiču značajno na osobine ćelija (Halliwell i Gitteridge, 1999).

Ekstrakt pečurke *A. mellea* menja fluidnost membrane lipozoma, ali kada se sistem lipozom/ekstrakt izloži dejstvu Fenton-ovog generatorskog sistema dolazi do povećanja fluidnosti, vrednost parametra S se smanjuje, što ukazuje na protektivno delovanje ovog ekstrakta. Ekstrakt pečurke *B. edulis* ima preventivnu ulogu u procesu lipidne peroksidacije, jer je vrednost parametra S značajno manja u odnosu na vrednost parametra S sistema izloženog Fenton-ovom sistemu. Sam ekstrakt pečurke *B. edulis* značajno ne utiče na promenu fluidnosti membrane eritrocita. Ekstrakt *C. pistilaris* nema protektivnu ulogu u procesu lipidne peroksidacije obzirom da je u oba slučaja vrednost parametra S značajno povećana u odnosu na kontrolni uzorak, što svedoči o smanjenu fluidnosti membrane. Uloga ekstrakta pečuraka u protektivnom delovanju u odnosu na proces lipidne peroksidacije, posmatrajući vrednosti parametra S, je značajna i u slučaju etanolnog ekstrakta pečurke *L. saccatum*. Ekstrakt *D. confragosa* nema izraženu protektivnu ulogu u ovom procesu.

Ukoliko se posmatraju ROS, superoksid radikal je slab po reaktivnosti i smatra se da ne može izazvati proces lipidne peroksidacije. Obzirom na svoju reaktivnost osnovnim uzročnikom procesa lipidne peroksidacije smatra se OH[·] radikal, mada uzročnici ovog procesa mogu biti i još neke reaktivne vrste poput hidroperoksilnog radikala. Poređenjem sposobnosti ispitivanih suvih ekstrakata pečuraka da inhibiraju dejstvo osnovnog izazivača lipidne peroksidacije, odnosno hidroksil radikala, i poređenjem parametra S kao osnovnog parametra u praćenju promene membranske fluidnosti u toku procesa lipidne peroksidacije, može se izvesti konačan zaključak da značajno zaštitno delovanje u odnosu na proces lipidne peroksidacije mogu imati etanolni ekstrakti *A. mellea*, *B. edulis* i *L. saccatum*.

4.5. MIKRO- I MAKRO-ELEMENTI U PEČURKAMA

Nekoliko naučnih istraživanja bavili su se pitanjem sadržaja mikro- i makro-elemenata u različitim vrstama pečuraka (Cocchi i saradnici, 2006; Gencelep i saradnici, 2009; Matilla i saradnici, 2001; Vetter, 2003). Pečurke, jestive i nejestive, sadrže čitav spektar minerala i mikro-elemenata. Tri najčešće korišćene vrste pečuraka *P. ostreatus*, *L. edodes* i *A. bisporus* sadrže od 27 do 47 mg/g K, 0,2 do 2 mg/g Mg i 47 do 92 µg/g Zn sračunato na suhu materiju (Vetter, 2003). U eksperimentalnom istraživanju sadržaja mikro- i makro-elemenata 30 vrsta pečuraka sa područja Turske dobijene su vrednosti sadržaja Na od 0,03 do 4,85 mg/g suve materije. Prema ovom istraživanju sadržaj K je visok i iznosi od 12,6 do 29,1 mg/g suve materije. Relativno je visok i sadržaj Mg, od 0,09 mg do 4,54 mg/g suve materije. Sadržaj Ca varira od oko 0,17 do 8,80 mg/g suve materije (Gencelep i saradnici, 2009). Istraživanjem pečuraka genusa *Boletus* utvrđeno je da je sadržaj Se od 30 do 90 mg/100 g sveže materije, mnogo veći odnosu na ostale vrste pečuraka (Cocchi i saradnici, 2006). U tabeli 16 su dati rezultati sadržaja mikro- i makro-elemenata u suvim ekstraktima pečuraka, ispitivanih u ovom radu.

U svim analiziranim ekstraktima od makro-elemenata najviše je prisutan kalijum, od oko 22 mg/g kod *D. confragosa* do oko 70 mg/g kod ekstrakta *C. pistillaris*, zatim sledi magnezijum, osim kod ekstrakta *L. saccatum*, natrijum, pa kalcijum. Sadržaj Mg se kreće od 0,788 mg/g u ekstraktu *M. procera* do 3,735 mg/g u ekstraktu *D. confragosa*. Sadržaj natrijuma najmanji je u ekstraktu *B. edulis* (0,462 mg/g). Značajno manji sadržaj natrijuma u odnosu na sadržaj kalijuma veoma je bitan sa nutricionističkog aspekta upotrebe ispitivanog materijala. Zanimljivo je da je sadržaj kalcijuma višestruko veći u ekstraktu *D. confragosa* nego u ekstraktima ostalih ispitivanih pečuraka, što se najverovatnije može tumačiti njegovom specifičnom drvenastom strukturom u odnosu na ostale ispitivane vrste pečuraka.

Što se tiče mikro-elemenata koji su ispitivani u ekstraktima pečuraka veoma značajni podaci dobijeni su za ekstrakt pečurke *B. edulis* za koji je utvrđeno da sadrži najviše cinka (89,00 µg/g) kao i daleko više selena (62,76 µg/g) u odnosu na ekstrakte svih ostalih vrsta. Najveći sadržaj selena u odnosu na ostale ispitivane vrste pečuraka u skladu je sa ranije rađenim naučnim istraživanjima kojima je utvrđeno da upravo pečurke ovog genusa sadrže najveće količine ovog mikro-elementa (Cocchi i saradnici, 2006).

Obzirom na nizak sadržaj natrijuma u odnosu na sadržaj kalijuma, zatim visok sadržaj cinka i daleko veći sadržaj esencijalnog selena u odnosu na ekstrakte drugih pečuraka, ekstrakt *B. edulis* se može preporučiti za dalju upotrebu u vidu jedne od aktivnih komponenata određenog dijetetskog suplemenata koji bi imao pozitivan uticaj na humani organizam. Ova preporuka je u skladu sa naučnim istraživanjem suplemenata na bazi selena u kome je utvrđeno da suplementi na bazi selena povećavaju antioksidativnu aktivnost prilikom intenzivnog i akutnog vežbanja (kada dolazi do intenzivnijeg stvaranja slobodno radikalskih vrsta), i time sprečavaju procesa lipidne peroksidacije (Akil i saradnici, 2010).

Sadržaj selena u ekstraktu *B. edulis*, pored relativno visokog sadržaja fenolnih komponenata u ovom ekstraktu, mogao bi biti odgovoran i za njegovo protektivno delovanje u procesu lipidne peroksidacije.

Tabela 16. Sadržaj mikro- i makro-elemenata u suvim ekstraktima pečuraka

Sadržaj po g ekstrakta	<i>Boletus edulis</i>	<i>Lycoperdon saccatum</i>	<i>Armilaria mellea</i>	<i>Clavaria pistillaris</i>	<i>Daedaleopsis confragosa</i>	<i>Macrolepiota procera</i>
Cink (Zn) (µg)	89,990 ±0,01	46,890 ±0,04	50,390 ±0,02	28,890 ±0,008	32,640 ±0,02	18,540 ±0,01
Gvožđe (Fe) (µg)	22,480 ±0,04	91,460 ±0,04	97,450 ±0,04	10,910 ±0,02	18,860 ±0,01	55,480 ±0,009
Selen (Se) (µg)	62,76 ±0,02	0,458 ±0,02	2,359 ±0,05	3,051 ±0,05	0,217 ±0,009	0,882 ±0,04
Magnezijum (Mg) (mg)	1,218 ±0,04	1,135 ±0,04	1,489 ±0,03	1,644 ±0,01	3,735 ±0,02	0,788 ±0,04
Natrijum (Na) (mg)	0,462 ±0,01	1,183 ±0,01	0,750 ±0,01	0,962 ±0,03	0,715 ±0,02	0,629 ±0,02
Kalijum (K) (mg)	51,751 ±0,02	53,762 ±0,03	54,807 ±0,04	73,487 ±0,04	22,671 ±0,009	52,731 ±0,03
Kalcijum (Ca) (mg)	0,114 ±0,009	0,224 ±0,01	0,548 ±0,02	0,225 ±0,01	3,251 ±0,01	0,179 ±0,008

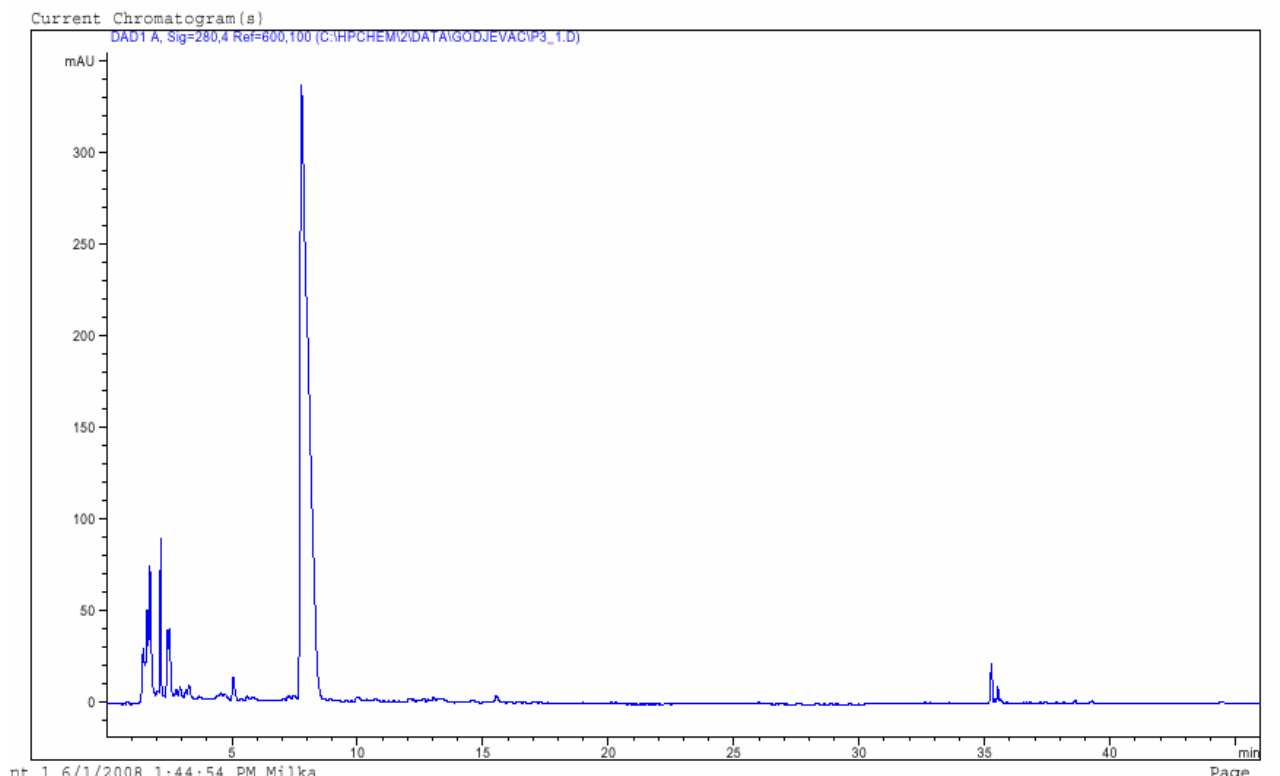
4.6. PISTILARIN, VARIEGETIČNA KISELINE I DRUGE KOMPONENTE U EKSTRAKTIMA PEČURAKA

Primenom LC/UV/MS analize u suvim ekstraktima pečuraka identifikovana su pojedina retka i specifična jedinjenja, poput antioksidativnog polifenolnog jedinjenja variegetične kiseline, retkog jedinjenja pistilarina i nekoliko jedinjenja strukture derivata triterpena. U tabeli 18 dati su podaci koji odgovaraju LC/UV/MS analizi jedinjenja detektovanih u ekstraktima pečuraka.

Tabela 18. LC/UV/MS analiza specifičnih jedinjenja u ekstraktima pečuraka *C. pistillaris*, *B. edulis* i *D. confragosa*

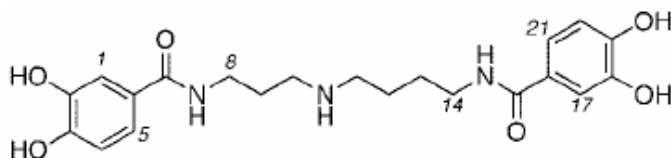
t_R (min)	Detektovana jonska vrsta	Molekulska masa	Molekulska formula	UV_{max} (nm)	Komponenta
2,2	M+H	267,0967	$C_{10}H_{13}N_5O_4$	198; 216; 260	Adenozin
8,1	M-H, 2M-H	417,1907	$C_{21}H_{27}N_3O_6$	198; 216;258;292	Pistilarin
20,1	M-H	372,0483	$C_{18}H_{12}O_9$	198; 214sh; 260; 384	Variegetična kiselina
30,6	M-H, 2M-H	524,3531	$C_{33}H_{48}O_5$	-	Slika br. 44 (A)
33,7	M-H, 2M-H	526,2771	$C_{33}H_{50}O_5$	-	Slika br. 44 (B)

Odgovarajući HPLC hromatogram za ekstrakt *C. pistillaris* dat je na slici 41, a za sve ostale pojedinačne suve ekstrakte pečuraka u Prilogu. U ekstraktu pečurke *C. pistillaris* identifikovano je specifično jedinjenje pistilarin, fungalni metabolit. Pistilarin (slika 42) spada u grupu jedinjenja siderfora i to kateholnih siderfora. Ova nisko molekularna jedinjenja, naročito kateholnog tipa, imaju sposobnost heliranja jona gvožđa i u ovom smislu smatraju se visoko efikasnim (Chanine i saradnici, 2001; Steglich i saradnici, 1984), ali su veoma retka (Capon i saradnici, 2007). Obzirom na veliki broj hidroksilnih grupa i nezasićenih veza jasno je da bi ovo jedinjenje moglo da poseduje određene i značajne antioksidativne karakteristike. U poslednjih dvadesetak godina ulažu se značajni naponi na sintetisanja veštačkog helatora gvožđa po tipu siderfora. Neka od jedinjenja ovog tipa smatraju se efikasnim i u lečenju malarije (Hinder i Liu, 1997). U tabeli 19 dat je sadržaj pistilarina u suvom ekstraktu pečurke *C. pistillaris* (27,87 mg/g).



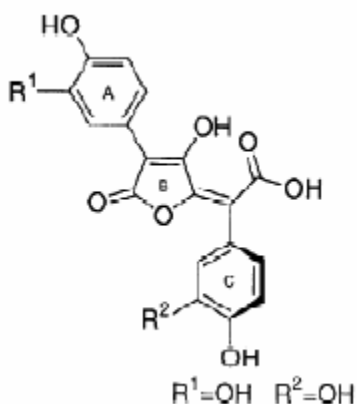
Slika 41. HPLC/DAD hromatogram za suvi ekstrakta *C. pistillaris*

Prisustvo pistilarina, pored visokog sadržaja fenolnih jedinjenja i prisustva cinka i selena, moglo bi se smatrati odgovornim za značajno antioksidativno delovanje ekstrakta *C. pistillaris*. Pistilarin u drugim etanolnim ekstraktima nije detektovan.



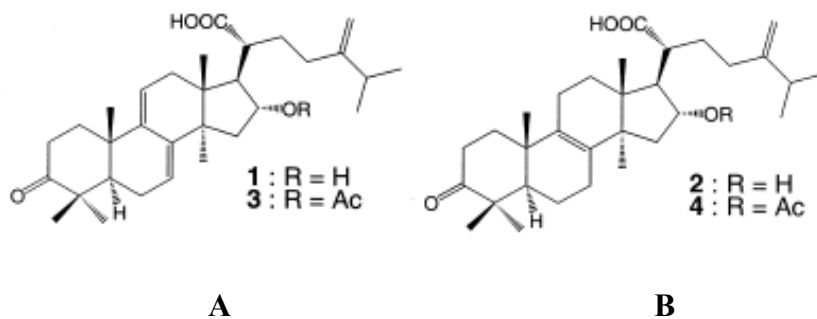
Slika 42. Pistilarin

U suvom ekstraktu pečurke *B. edulis* identifikovana je karakteristična polifenolna komponenta - variegetična kiselina (slika 43), koja, na osnovu urađenih analiza, nije prisutna u ostalim pečurkama. Variegetična kiselina identifikovana je i u ekstraktu pečurke *Suillus bovinus* (*L. Fr.*) *O. Kuntze*. Ona predstavlja narandžasti pigment (3,3',4,4'-tetrahidroksi pulvinsku kiselinu) i utvrđeno je da poseduje jako antioksidativno delovanje (Kasuga i saradnici, 1995). U tabeli 19 dat je sadržaj variegetične kiseline u suvom ekstraktu pečurke *B. edulis* (1,36 mg/g).



Slika 43. Variegetična kiselina

U suvom ekstraktu pečurke *D. confragosa* detektovano je prisustvo dva derivata triterpena, jedinjenje A i jedinjenje B (slika 44). Upravo ova jedinjenja su 2000. godine detektovali Rosecke i Konig (2000) i to u ekstraktu pečurke *D. confragosa*, kao i u još jednom pripadniku iste vrste *Daedaleopsis quarcina*. U mnogim naučnim istraživanjima triterpeni koji vode poreklo iz pečuraka smatraju se farmakološki odgovornim komponentama za antikancerogeno, antiinflamatorno, vazorelaksaciono, antistresno, antioksidativno i druga delovanja (Abudureyimu i saradnici, 2001; Wang i saradnici, 1998; Wang i saradnici, 2002).



Slika 44. Strukturna formula jedinjenja A i jedinjenja B

4.7. ADENOZIN U EKSTRAKTIMA PEČURAKA

U suvim ekstraktima ispitivanih pečuraka primenom LC/UV/MS analize identifikovan je adenzin, jedinjenje potencijalno farmakološki značajno u terapiji nekih kardioloških stanja. U tabeli 18 dati su podaci koji odgovaraju LC/UV/MS analzi adenozina. Hromatogrami za svaki pojedinačni ekstrakt su dati u Prilogu.

Podataka o sadržaju adenozina u pečurkama, osim u vrsti *Cordyceps*, ima vrlo malo. Ispitivanjem sadržaja adenozina u različito dobijenim uzorcima pečurke *Cordyceps* utvrđeno je da se sadržaj nukleozida u uzorcima dobijenim kultivacijom kreće od 0,5 do 3,2 mg/g suve materije, dok je u uzorcima koji su sakupljeni u prirodni taj sadržaj značajno manji, i kreće se u intervalu od 0,02 do 0,5 mg/g (Li i saradnici, 2001). Slične podatke dobili su Fan i saradnici (2006) koji su utvrdili da sadržaj adenozina u *Cordycepsu* koji se razvijao u prirodnim uslovima iznosi oko 0,2 mg/g, dok je sadržaj u kultivisanom uzorku veći i do nekoliko puta, i iznosi od oko 2 do oko 6 mg/g. Sadržaj adenozina u *C. militaris* kreće se u opsegu od oko 0,2 do oko 2 mg/g.

Adenzin je identifikovan u svim ispitivanim suvim ekstraktima pečuraka, osim u ekstraktu pečurke *M. procera*. Primenom HPLC/DAD analize izvršena je njegova kvantifikacija u ispitivanim uzorcima (tabela 19).

Tabela 19. Kvantitativna HPLC/DAD analiza suvih ekstrakata pečuraka

Ekstrakt	Adenzin (mg/g)	Varijegetična kiselina (mg/g)	Pistilarin (mg/g)
<i>A. Mellea</i>	1,90±0,07	n.i. *	n.i. *
<i>B. Edulis</i>	2,58±0,10	1,36±0,05	n.i. *
<i>C. pistillaris</i>	2,80±0,11	n.i. *	27,87±1,00
<i>D. confragosa</i>	1,13±0,05	n.i. *	n.i. *
<i>L. saccatum</i>	4,58±0,18	n.i. *	n.i. *
<i>M. procera</i>	n.i. *	n.i. *	n.i. *

*n.i.- nije identifikovan

Sadržaj adenzina u suvim ekstraktima ispitivanih vrsta pečuraka kreće se od oko 1 mg/g do oko 4,5 mg/g. Najmanji sadržaj adenzina određen je u ekstraktu pečurke *D. confragosa* (1,13 mg/g), dok je sadržaj od preko 2 mg/g ekstrakta određen u ekstraktima *B. edulis* i *C. pistilaris*. Najveći sadržaj adenzina, i do nekoliko puta veći u odnosu na ekstrakte drugih ispitivanih pečuraka, određen je u suvom ekstraktu pečurke *L. saccatum*. Iz ovog razloga pečurka, odnosno ekstrakt pečurke *L. saccatum*, se mogu preporučiti u smislu njihovog korišćenja zbog prisustva adenzina u obliku određenog dijetetskog suplemenata ili nekog drugog farmaceutskog oblika.

4.8. EKSTRAKCIJA ODABRANIH VRSTA PEČURAKA UGLJENDIOKSIDOM U SUPERKRITIČNOM STANJU

Podataka o superkritičnoj ekstrakciji pečuraka ugljendioksidom kao ekstragensom vrlo je malo. Superkritičnom ekstrakcijom pečuraka vrste *Agricus* bavili su se Abdullah i saradnici (1994). Ekstrakcija je rađena sa 120 mg osušene, samlevene droge, na temperaturi od 50°C i vrlo kratkim vremenom ekstrakcije (11,4 min.). Podaci o primenjenom pritisku ekstrakcije nisu dostupni. Ovako dobijeni ekstrakti sastojali su se uglavnom od masnih kiselina. Takođe, utvrđeno je da je primenjen proces uporediv sa klasičnim procesom ekstrakcije organskim rastvaračima.

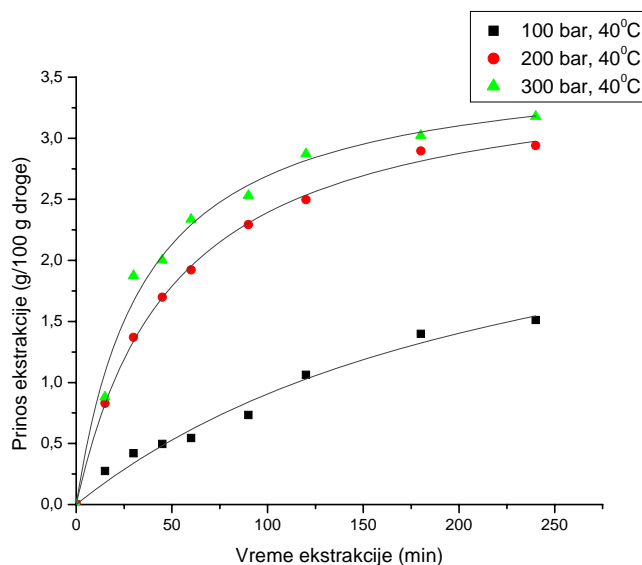
U cilju određivanja radnih parametara, vremena i pritiska ekstrakcije, ekstrakcija pečuraka *B. edulis*, *M. procera* i *A. mellea* ispitivana je na pritiscima 100, 200 i 300 bara, za vreme ekstrakcije do 4 h, a prinos ekstrakcije određivan je nakon 15, 30, 45, 60, 90, 120 180 i 240 min. Da bi se analizirale ekstrahovane lipidne komponente pečuraka potrebno je zaštititi integritet labilnih lipida i sprečiti njihovu termičku razgradnju u toku ekstrakcije (Suqin i saradnici, 2010). Iz ovog razloga, temperatura od 40°C odabrana je kao pogodna radna temperatura na kojoj ne može doći do razgradnje termolabilnih komponenata ispitivanih pečuraka.

Pri postavljenim radnim uslovima, odnosno temperaturi od 40°C i pritiscima od 100, 200 i 300 bara zapreminska masa ugljendioksida iznosi 0,568 g/ml, 0,831 g/ml i 0,929 g/ml.

Tabela 20. Prinos superkritične ekstrakcije *M. procera*

Vreme ekstrakcije (min)	Prinos ekstrakcije (g/100 g droge, %)		
	Pritisak (bar)		
	100	200	300
15	0,276	0,830	0,880
30	0,421	1,369	1,875
45	0,497	1,699	2,003
60	0,544	1,922	2,337
90	0,733	2,293	2,532
120	1,062	2,494	2,872
180	1,399	2,897	3,023
240	1,511	2,941	3,179

Rezultati superkritične ekstrakcije pečurke *M. procera* dati su u tabeli 20 i prikazani na slici 45. Prinos ekstrakcije ove pečurke raste sa porastom vremena na sva tri primenjena pritiska. Na gotovo svim ispitivanim pritiscima ovaj rast je veoma intenzivan u periodu do oko 120 min.

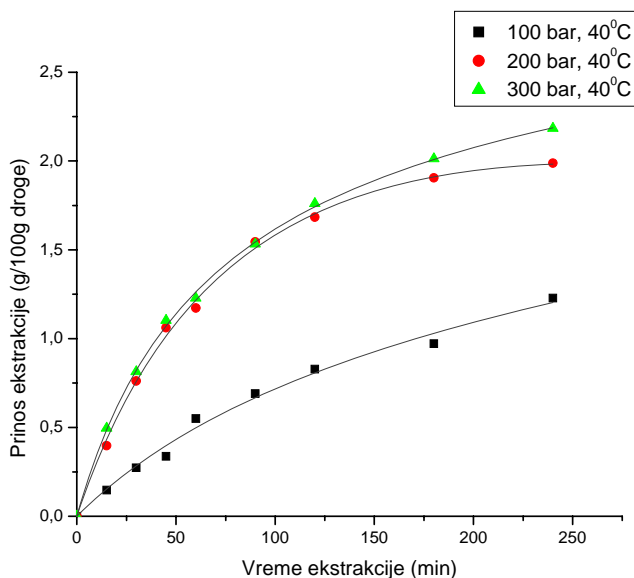
**Slika 45.** Kinetika superkritične ekstrakcije *M. procera* na pritiscima 100, 200 i 300 bar i temperaturi 40°C

Uticaj pritiska, koji se smatra jednim od dominantnih faktora u procesu superkritične ekstrakcije, veoma je izražen. Najveći prinos ekstrakcije se postiže primenom pritiska od 300 bar (3,179 %), nešto manji pri ekstrakcije na 200 bar (2,941 %), a najmanji prinos je dobijen pri ekstrakciji na 100 bar (1,511 %), nakon istog vremena ekstrakcije od 4 sata.

Rezultati superkritične ekstrakcije pečurke *B. edulis*, na ispitivanim pritiscima i temperaturi od 40°C i dati su u tabeli 21 i grafički prikazani na slici 46. Kao i u prethodnom slučaju, najveći prinos ekstrakcije postiže se nakon 4 h na pritisku od 300 bara (2,813 %).

Tabela 21. Prinos superkritične ekstrakcije *B. edulis*

Vreme ekstrakcije (min)	Prinos ekstrakcije (g/100 g droge, %)		
	Pritisak (bar)		
	100	200	300
15	0,148	0,397	0,496
30	0,273	0,762	0,813
45	0,337	1,061	1,102
60	0,550	1,172	1,228
90	0,690	1,545	1,533
120	0,829	1,684	1,760
180	0,972	1,905	2,013
240	1,228	1,988	2,183



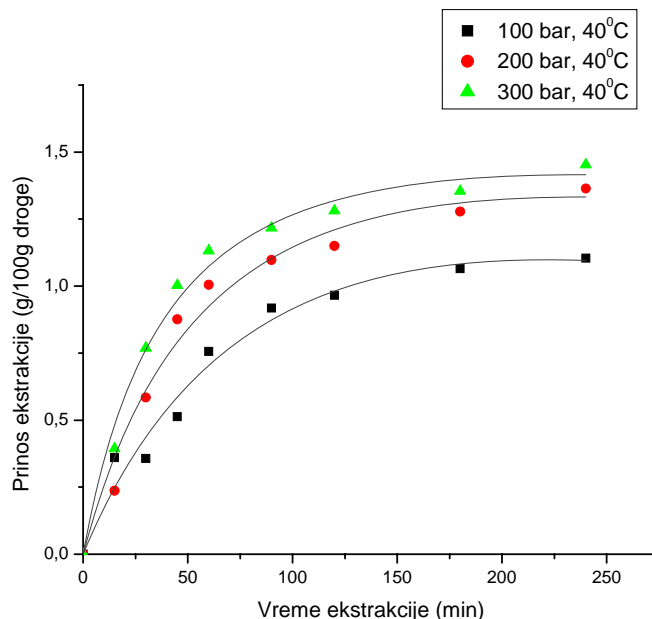
Slika 46. Kinetika superkritične ekstrakcije *B. edulis* na pritiscima 100, 200 i 300 bar i temperaturi 40°C

Tabela 22. Prinos superkritične ekstrakcije *A. mellea*

Vreme ekstrakcije (min)	Prinos ekstrakcije (g/100 g droge, %)		
	Pritisak (bar)		
	100	200	300
15	0,036	0,237	0,394
30	0,357	0,585	0,769
45	0,513	0,876	1,003
60	0,757	1,005	1,132
90	0,918	1,098	1,217
120	0,966	1,150	1,281
180	1,065	1,278	1,305
240	1,104	1,364	1,453

Rezultati superkritične ekstrakcije pečurke *A. mellea* dati su u tabeli 22 i prikazani na slici 47. Kao i u prethodna dva slučaja najveći prinos ekstrakcije (1,453 g/100 g droge) postiže se nakon 4 h ekstrakcije primenom pritiska od 300 bar. Razlika u prinosu ekstrakcije, kao i u prethodna dva

slučaja, na pritisku od 100 i na pritisku od 300 bar je vrlo izražena. Takođe, do vremena od oko 120 minuta dolazi do naglog porasta prinosa.



Slika 47. Kinetika superkritične ekstrakcije *A. mellea* na pritiscima 100, 200 i 300 bar i temperaturi 40°C

Analizom uticaja vremena i pritiska u prethodna tri slučaja, definisan su uslovi za superkritičnu ekstrakciju ostalih uzoraka pečuraka: vreme ekstrakcije od 4 h, pritisak ekstrakcije od 300 bar, temperatura 40°C i protok od 0,193 kg/h. Smatra se da nakon 4 sata ekstrakcije u svim ispitanim slučajevima ne dolazi više do značajnog povećanja prinosa ekstrakcije. Ekstrakcijom na ovim uslovima dobijeni su ekstrakti ostalih pečuraka, a prinos ekstrakcije za svaku vrstu dat je u tabeli 23. Najveći prinos ekstrakcije ostvaren je kod pečurke *C. pistillaris* (3,218 %), a nešto niži kod *M. procera* (3,179 %), Najmanji prinos ekstrakcije primenom superkritičnog ugljendioksida dobijen je kod suve pečurke *A. mellea* (1,453 %).

Prinos ekstrakcije pečuraka superkritičnim ugljendioksidom raste sa povećanjem pritiska ekstrakcije. Nakon vremena od oko 120 minuta prinos ekstrakcije se ne menja značajno. Prinosi se kreću u intervalu od 1,453 % (*A. mellea*) do 3,218 % (*C. pistillaris*).

Tabela 23. Prinos superkritične ekstrakcije pečuraka na pritisku 300 bar i temperaturi 40°C

Pečurka	Prinos ekstrakcije (g/100 g droge, %)
<i>B. edulis</i>	2,183
<i>L. saccatum</i>	1,682
<i>C. pistillaris</i>	3,218
<i>D. confragosa</i>	1,634
<i>M. procera</i>	3,179
<i>A. mellea</i>	1,453

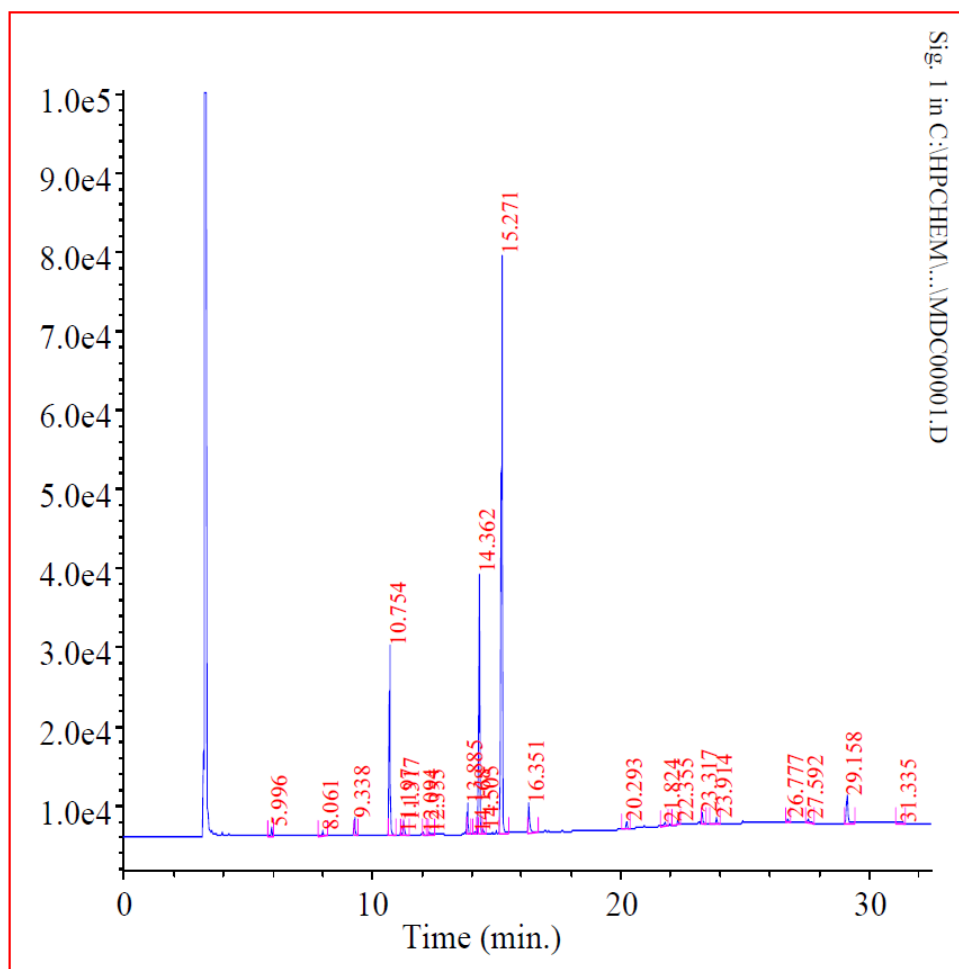
4.9. SASTAV MASNIH KISELINA SUPERKRITIČNIH EKSTRAKATA ISPITIVANIH PEČURAKA

Masne kiseline u pečurkama ekstrahuju se primenom, najčešće, sokslet metode i hloroforma, petroletra, smeše hloroforma i metanola kao ekstragensa (Barros i saradnici, 2007; Ribeiro i saradnici, 2009; Yilmaz i saradnici, 2006). Pečurke ispitivane u ovom radu ekstrahovane su primenom ugljendioksida u superkritičnom stanju, koji se može smatrati, zbog svojih karakteristika, veoma pogodnim ekstragensom za ekstrakciju lipofilnih komponenata, a način ekstrakcije efikasnim postupkom za ekstrakciju jedinjenja ovog tipa.

Baros i saradnici (2007) odredili su profil i sadržaj masnih kiselina nekoliko vrsta pečuraka (*A. arvensis*, *L. deliciosus*, *L. giganteus*, *S. imbricatus* i *T. protentosum*). Utvrđeno je da su najzastupljenije masne kiseline u analiziranim uzorcima pečuraka bile oleinska (C18:1 n-9), linoleinska (C18:2 n-6) i zasićena palmitinska kiselina (C16:0). Naučna istraživanja skorijeg datuma izveštavaju o prisustvu visoko nezasićenih masnih kiselina u pečurkama. Neke od njih imaju i do 5 nezasićenih veza (Ribeiro i saradnici, 2009). Suquin i saradnici (2010) istraživali su sastav masnih kiselina pečurke *A. bisporus*. Ukupan sadržaj zasićenih masnih kiselina u *A. bisporus* iznosi od 22,1 do 26,5%. Palimitinska kiselina (16:0) je najprisutnija sa udelom od 14%, zatim stearinska (18:0) sa udelom od oko 4%. Detektovane su i masne kiseline sa dužim lancima (26:0), dok zasićene masne kiseline sa lancima manjim od 10 C atoma nisu pronađene, što je u skladu sa ranijim naučnim istraživanjima. Dominantna nezasićena masna kiselina u *A. bisporus* je linoleinska kiselina (18:2n-6), koja je prisutna u udelu od 67 do 76%. U tragovima su detektovane još neke nezasićene masne kiseline poput dihomo- γ -linolenske, dokosadienonske, arahidonske, α -linolenske, eikosatrienske (C20:3n-3), eikosatetraenske i drugih. Oleinska kiselina je prisutna u *A. bisporus* u udelu od 1,5% (Suqin i saradnici, 2010). Još neki naučnici su se bavili analizom sastava masnih kiselina nekoliko različitih vrsta pečuraka. Analizom profila masnih kiselina utvrđeno je da je oleinska kiselina prisutna u udelu od 18 do 79%, linoleinska od 11 do 79%, a palmitinska i stearinska u manjem udelu (0,4 do 24% odnosno 0,2 do 16%). Sadržaj zasićenih masnih kiselina bio je najveći u slučaju pečurke *A. rubescens* (47%) i *S. bellini* (48%), zbog visokog sadržaja palmitinske kiseline, dok su nezasićene masne kiseline bile

dominantnije u odnosu na zasićene u svim ostalim analiziranim uzorcima. Sadržaj nezasićenih masnih kiselina sa više nezasićenih veza varirao od 12 do 79%, a sadržaj masnih kiselina sa jednom nezasićenom vezom od 18 do 79% (Ribeiro i saradnici, 2009).

U cilju definisanja sastava masnih kiselina u superkritičnim ekstraktima pečuraka urađene su GC/MS i GC/FID analize. Osnovne komponente detektovane GC/MS analizom bile su slobodne karboksilne kiseline (uglavnom oleinska i linoleinska), kao i jedinjenja nekih drugih klasa (aldehidi, alkoholi, steriodi, aromatične komponente). Nakon transesterifikacije metil estri karboksilnih kiselina detektovani GC/MS analizom i kvantifikovani primenom GC/FID analize. Na slici 48 prikazan je GC/MS hromatogram superkritičnog ekstrakta pečurke *D. confragosa*.



Slika 48. GC/MS hromatogram za superkritični ekstrakt pečurke *D. confragosa*

U tabeli 24 dati su rezultati o sadržaju dominantnih masnih kiselina u superkritičnim ekstraktima pečurke *B. edulis* koji su dobijeni primenom ugljendioksida na pritiscima 100, 200 i 300 bar, i temperaturi od 40°C.

Tabela 24. Sastav i sadržaj (%) masnih kiselina u superkritičnim ekstraktima *B.edulis*

t_R (min)	Masne kiseline	Superkritični ekstrakti		
		100 bar	200 bar	300 bar
10,76	Palmitinska kiselina (C16:0)	10,90%	11,78%	11,34%
13,89	Stearinska kiselina (C18:0)	2,63%	2,49%	2,79%
14,36	Oleinska kiselina (18:1 c9)	32,91%	33,34%	36,58%
14,54	18:1 izomer	1,26%	1,51%	1,45%
15,24	Linoleinska kiselina (C 18:2)	42,61%	44,58%	45,14%

Iz podataka datih u tabeli 24 se vidi da postoji uticaj pritiska na ekstrakciju nekih masnih kiselina, poput oleinske i linoleinske, sadržaj se povećava sa povećanjem pritiska, ali taj uticaj nije u velikoj meri izražen. Na osnovu rezultata datih u prethodnoj tabeli jasno je da je u svim ekstraktima *B. edulis* dominantna kiselina linoleinska, koja je u ekstraktima prisutna u udelu od oko 42 do oko 45%. Sadržaj ove kiseline veći je od sadržaja koji su u ovoj vrsti pečuraka detektovali Yilmaz i saradnici (2006) i koji je 33,6%. Udeo oleinske kiseline, od oko 32 do oko 36% je uporediv sa sadržajem (30,2%) o kome izveštavaju Yilmaz i saradnici (2006). Od zasićenih masnih kiselina najprisutnija je palmitinska masna kiselina. U dobijenim ekstraktima pečurke *B. edulis* detektovane su još neke masne kiseline ali u značajno manjem udelu (manjem od 1%), kao što su: laurinska, miristinska, palmitooleinska i oleinska. U superkritičnim ekstraktima *B. edulis* nisu detektovane masne kiseline sa dugim lancima, kao ni masne kiseline sa nizom manjim od C10.

Tabela 25. Sastav masnih kiselina superkritičnih ekstrakata pečuraka

t_R (min)	Masne kiseline	<i>Boletus edulis</i>	<i>Lycoperdon saccatum</i>	<i>Clavaria pistillaris</i>	<i>Macrolepiota procera</i>	<i>Daedaleopsis confragosa</i>	<i>Armilaria mellea</i>
9,36	Pentadekanoinska (C 15:0)	n.d. *	1,55	2,31	0,30	1,32	0,73
10,76	Palmitinska (C 16:0)	11,34	9,57	15,28	23,81	13,10	13,32
11,33	Palmitooleinska (C 16:1 9c)	0,82	0,40	0,87	0,94	1,32	4,54
13,89	Stearinska (C 18:0)	2,79	6,16	1,72	3,64	2,15	3,10
14,36	Oleinska (C 18:1 c9)	36,58	6,64	42,37	9,96	18,64	31,24
14,54	(C 18:1) izomer	1,45	1,22	n.d. *	3,59	0,57	2,80
15,24	Linoleinska kiselina (C 18:2)	45,14	67,69	33,44	46,88	50,04	39,44
16,00	α -linoleinska (C 18:3 c6c9c12)	n.d. *	n.d. *	n.d. *	n.d. *	3,37	n.d. *
20,29	Beheninska (C 22:0)	n.d. *	0,36	n.d. *	n.d. *	0,56	1,07

* n.d. – nije detektovano

U ekstraktu pečurke *L. saccatum* dominantna masna kiselina je linoleinska, sa udelom od oko 67%. Ovo je ujedno najveći sadržaj ove kiseline detektovan u analiziranim superkritičnim ekstraktima ispitivanih vrsta pečuraka. Ovako visok sadržaj linoleinske kiseline dobijen je i u ispitivanju profila masnih kiselina pečurke *A. bisporus* (Suqin i saradnici, 2010). U udelu manjem od 1% prisutne su zasićene masne kiseline laurinska, miristinska, margarinska i beheninska, kao i nezasićena masna kiselina palmitooleinska.

U superkritičnom ekstraktu *C. pistillaris* najveći udeo ima oleinska kiselina (42,37%), što je i daleko najveći sadržaj ove kiseline detektovan u odnosu na ostale ispitivane superkritične ekstrakte pečuraka. U visokom udelu u ovom ekstraktu prisutna je i linoleinska (33%), kao i zasićena palmitinska kiselina (15%), a masne kiseline koje su detektovane u udelu manjem od 1% su zasićene miristinska, margarinska, arahidonska, lignocerinska, kao i nezasićene, palmitooleinska i *trans* oblici C16:1 11t i C18:1 t9 kiseline.

U ekstraktu pečurke *M. procera* detektovan je, u odnosu na ostale ispitivane ekstrakte, najveći sadržaj zasićene palmitinske kiseline, oko 23%. Kao i u većini ostalih ekstrakata, i u ovom ekstraktu je u velikoj meri prisutna linoleinska kiselina. Masne kiseline koje su u ovom ekstraktu detektovane u udelu manjem od 1% su miristooleinska, lignocerinska i palmitooleinska.

U superkritičnom ekstraktu pečurke *D. confragosa* dominantna je linoleinska masna kiselina (oko 50%). U ekstraktu u udelu manjem od 1% detektovana su i sledeća jedinjenja: laurinska, miristinska, beheninska, lignocerinska, kerotinska, zatim *trans* oblici C 16:1 11t i C 18:1 t9, C 18:1 izomer i 2-hidroksil oktadekanoik metil ester. Ekstrakt ove pečurke zanimljiv je i po tome što je u njemu detektovano više zasićenih masnih kiselina sa C nizom dužim od C 20, kao što su: beheninska (C22:0), lignocerinska (C24:0), kerotinska (C26:0).

Najveći udeo nezasićene palmitooleinske kiseline, u odnosu na ostale ekstrakte, detektovan je u superkritičnom ekstrakt *A. mellea* (oko 4,5%). Yilmaz i saradnici (2006) takođe su proučavali profil masnih kiselina ove pečurke. Prema njihovom istraživanju sadržaj palmitooleinske kiseline je nešto veći (10,3%), dok je sadržaj oleinske višestruko niži u odnosu na sadržaj u analiziranom superkritičnom ekstraktu ove pečurke (4,55%). Kiseline koje su prisutne u udelu manjem od 1% su: C12:0, C14:0, C15:0, C17:0, C20:0, C24:0 i nezasićeni *trans* olik C18:1 t9.

Na osnovu podataka datih u tabeli 24 i tabeli 25 može se zaključiti da u superkritični ekstrakti ispitivanih vrsta pečuraka bogati nezasićenim masnim kiselinama i to oleinskom (6,64% do 42,37%) i linoleinskom (33,44% do 67,69%). Dominantna zasićena masna kiselina u analiziranim pečurkama je palmitinska kiselina sa udelom od 9,57% do 23,81%.

4.10. STEROLNA JEDINJENJA PRISUTNA U SUPERKRITIČNIM EKSTRAKTIMA PEČURAKA

Za neke komponente pečuraka koje imaju steroidnu strukturu se smatra da poseduju, između ostalih, antidijabetičko i antiarterosklerozno delovanje, da smanjuju nivo holesterola, kao i da su značajne u prevenciji raka debelog creva (Piironen i saradnici, 2000). Neke od komponenata steroidne strukture prisutne u pečurkama, kao što su ergosta-4,6,8 (14), 22-tetraen-3-on poseduju antialdosteroničke osobine koje se mogu iskoristiti u terapiji oslabljanog srčanog mišića. Utvrđeno je da isto jedinjenje poseduje i antiinflamatorne karakteristike, pa se može koristiti u terapiji nekih zapaljenskih procesa. Korisne osobine, poput antimikrobnog delovanja, dokazane su i za još jedno jedinjenje steroidne strukture izolovano iz pečuraka, 5 α -ergosta-7,22-dien-3 β -ol (Lindequist i saradnici, 2005). Dominantno jedinjenje steroidne strukture u pečurkama je ergosterol (Matilla i saradnici, 2002).

U tabeli 26 su dat je sastav sterola dobijen GC/MS analizom superkritičnih ekstrakata ispitivanih pečuraka.

Tabela 26. Sastav sterola u superkritičnim ekstraktima pečuraka

t_R (min)	Komponenta	Površina pika (%)					
		<i>Daedaleopsis confragosa</i>	<i>Lycoperdon saccatum</i>	<i>Clavaria pistilaris</i>	<i>Boletus edulis</i>	<i>Armillaria mellea</i>	<i>Macrolepiota procera</i>
79,528	Ergosterol	6,234	1,707	0,442	0,184	1,602	0,539
79,763	7,22- Ergostadienol	n.d.*	2,162	0,544	n.d.*	n.d.*	n.d.*
80,793	7,22- Ergostadienon	4,335	3,580	n.d.*	n.d.*	n.d.*	0,290
81,002	Derivat ergosterola	3,101	n.d.*	n.d.*	n.d.*	n.d.*	n.d.*
81,126	Fungisterol	3,209	n.d.*	n.d.*	n.d.*	0,364	n.d.*
81,788	Kalinasterol	1,564	n.d.*	n.d.*	n.d.*	n.d.*	0,406
83,267	Ergosta-4,6,8 (14), 22- tetraen-3-on	n.d.*	n.d.*	0,202	n.d.*	0,168	n.d.*

*n.d. – nije detektovano

U svim analiziranim ekstraktima pečuraka dobijenim primenom ugljendioksida u superkritičnom stanju kao ekstragensa, detektovan je ergosterol. On je dominantno jedinjenje sterolne strukture u ekstraktima *D. confragosa*, *M. procera*, *A. mellea* i *B. edulis*. Najviše ga ima u ekstraktu

drvenaste *Polyporaceae* pečurke, *D. confragosa*. Obzirom da *D. confragosa* upravo i pripada genusu iz koga potiče većina lekovitih pečuraka, najveći sadržaj jedinjenja sterolne strukture je i očekivan. Pored u ekstraktu dominantnog ergosterola, detektovani su i 7,22-ergostadienon, fungisterol, kalinasterol, kao i jedan derivat ergosterola.

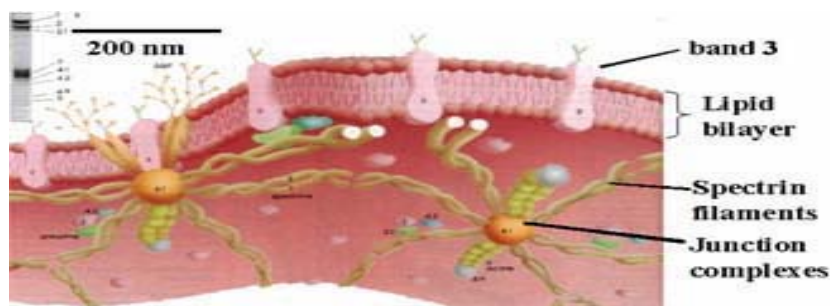
U superkritičnom ekstraktu pečurke *L. saccatum* dominantno jedinjenje sterolne strukture je, za razliku od prethodnih naučnih istraživanja (Matilla i saradnici, 2002), 7,22-ergostadienon, zatim 7,22-ergostadienol, pa tek onda ergosterol. Ostala jedinjenja sterolne strukture u ovom ekstraktu nisu prisutna.

Slično kao u slučaju ekstrakta *L. saccatum*, u superkritičnom ekstraktu *C. pistilaris* dominantno jedinjenje sterolne strukture je 7,22-ergostadienon. U ovom ekstraktu identifikovano je i jedinjenje koje poseduju antialdosteroničke osobine ergosta-4,6,8 (14), 22-tetraen-3-on. Upravo ovo jedinjenje identifikovano je i u superkritičnom ekstraktu pečurke *A. mellea*, ali u nešto manjem udelu. Najmanje sterolnih komponenata detektovano je u superkritičnom ekstraktu pečurke *B. edulis*, svega jedno, ergosterol.

Obzirom na spektar i sadržaj sterolnih jedinjenja za dalju analizu i eventualnu upotrebu mogao bi se preporučiti ekstrakt pečurke *D. confragosa*.

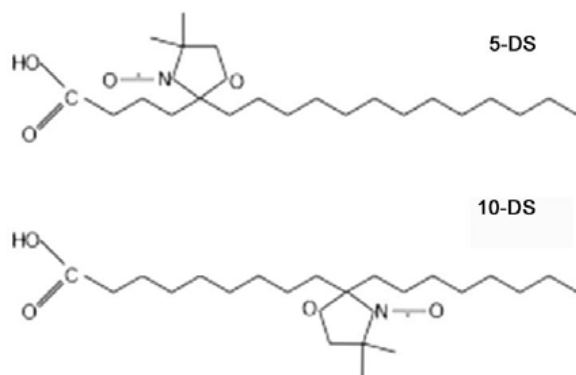
4.11. UTICAJ EKSTRAKTA PEČURAKA NA FLUIDNOST MEMBRANE ERITROCITA

Sposobnost ekstrakata pečuraka dobijenih primenom superkritične ekstrakcije sa CO₂ da menjaju fluidnost membrane eritrocita (slika 49) ispitana je *in vivo* eksperimentom na membranama eritrocita sveže krvi zdravih donora. Smatra se da je abnormalnost membrane ćelija etiološki faktor u razvoju hipertenzije (Canessa i saradnici, 1980; Dominiczak i saradnici, 1991). Fluidnost membrane je fizičko-hemijska karakteristika biomembrana i značajan je faktor u modifikovanju reološkog ponašanja eritrocita, odnosno sposobnosti ćelije da elastično menja oblik prilikom prolaska kroz uzak sud i da pri tome ostane potpuno funkcionalna (Zicha i saradnici, 1999). Utvrđeno je da je fluidnost membrane eritrocita značajno manja kod eksperimentalnih pacova sa hipertenzijom, kao i kod pacijenata sa hipertenzijom, u odnosu na slučajeve bez hipertenzije (Tsuda i saradnici, 1999), pa se smatra da smanjenje fluidnosti membrane eritrocita doprinosi patofiziologiji hipertenzije, kao i drugih kardiovaskularnih bolesti.



Slika 49. Struktura membrane eritrocita

Primenom EPR *spin probe* doksil-stearata (DS) određen je parametar S koji se, kao što je ranije pokazano, dovodi u vezu za fluidnosti membrane. Da bi se preciznije odredio uticaj superkritičnih ekstrakata pečuraka na ćelijske membrane, odnosno u ovom slučaju na membranu eritrocita, korišćene su dve *spin-probe*: 5-doksil stearat (5-DS) i 10-doksil stearat (10-DS) (slika 50). Prvi je korišćen radi prikupljanja informacija o fluidnosti pri površini membrane, dok je drugi korišćen da bi se utvrdilo da li je modifikovana fluidnost dublje u membrani ćelije eritrocita. Primenom EPR tehnike dobijen je S parametar uređenosti (order parameter), koji je recipročan fluidnosti membrane eritrocita (tabela 27).



Slika 50. Strukture 5-DS i 10-DS

Tabela 27. Efekat ekstrakata pečuraka na parameter S, odnosno fluidnost membrane eritrocita

Uzorak	5-DS (S)	Statistička značajnost	10-DS (S)	Statistička značajnost
Kontrola	0,733±0,001	-	0,702±0,004	-
<i>A. Mellea</i>	0,705±0,005	p=0,047	0,669±0,005	p=0,037
<i>B.edulis</i>	0,731±0,003	n.s.*	0,659±0,12	n.s.*
<i>C. pistilaris</i>	0,708±0,001	p=0,049	0,718±0,007	p=0,048
<i>D.confragosa</i>	0,727±0,002	p=0,016	0,696±0,001	n.s.*
<i>L. saccatum</i>	0,731±0,004	n.s.*	0,712±0,004	n.s.*
<i>M. procera</i>	0,718±0,003	p=0,007	0,687±0,003	p=0,006

* Statistički značajna razlika između kontrole i tretiranog uzorka uzeta je za $p < 0,05$, n.s. se odnosi na razliku kontrole i tretiranog uzorka koja nije značajna.

Komponente ili mešavina koja je u stanju da modifikuje fluidnost membrane preko određenih granica može da utiče i na integritet ćelije. Iz tog razloga ispitan je uticaj ekstrakata na integritet

membrane, merenjem isticanja jona kalijuma, za koji je poznato da predstavlja vrlo osetljiv indikator poremećaja ćelijskog integriteta (Gambhir i Agarwal, 1990).

S vrednosti dobijene sa 5-DS su veće od vrednosti dobijenih sa 10-DS, pošto je nitroksidna struktura 10-DS sa nesparenim elektronom pozicionirana dublje u membrani i karakteriše se povećanjem mobilnosti (Radaković i saradnici, 2006). Superkritični ekstrakt pečurke *A. mellea* značajno povećava fluidnost membrane eritorocita i to u oba ispitivana sloja ($p < 0,05$). Isti je slučaj sa superkritičnim ekstraktom pečurke *M. procera*.

Superkritični ekstrakt pečurke *D. confragosa*, kao i ekstrakt pečurke *C. pistilaris*, povećavaju fluidnost membrane eritrocita u površinskom sloju membrane. Na dublji sloj membrane eritrocita ekstrakt *D. confragosa* nema uticaja, dok ekstrakt *C. pistilaris*, obzirom na povećanje parametra S u odnosu na kontrolni uzorak, smanjuje fluidnost. Ekstrakti pečuraka *B. edulis* i *L. saccatum* ne utiču na povećanje, odnosno promenu fluidnosti ispitivane membrane eritrocita.

Rezultati dobijeni plamenom spektrometrijom pokazuju da ni jedan od ekstrakta ne utiče značajno na isticanje jona kalijuma (rezultati nisu prikazani u ovom radu), tako da integritet membrane eritrocita njihovim dodatkom ostaje neporemećen.

Iz dobijenih rezultata se može zaključiti da superkritični ekstrakti *A. mellea* i *M. procera*, odnosno pečurke, indukuju statistički signifikantno povećanje membranske fluidnosti i to u oba ispitivan sloja membrane, pa se iz tog razloga mogu koristiti kao deo antihiperzitivne ishrane. Ovo povećanje fluidnosti u oba sloja doprinosi i boljim reološkim karakteristikama, kao i osobinama koje kao nosači kiseonika ove strukture treba da poseduju.

5. ZAKLJUČCI

1. Odabrane vrste pečuraka ekstrahovane su primenom etanola kao ekstragensa. Velika prednost etanola u odnosu na druge ekstragense je njegoa netoksičnost i moguća dalja primena ovako dobijenih ekstrakata za direktnu humanu upotrebu. Ostvareni prinosi ekstrakcije kreću se od 5,56 do 39,09 g suvog ekstrakta/100 g droge. Najmanji prinos ekstrakcije ostvaren je kod pečuraka familije *Polyporaceae*. Najveći prinos ekstrakcije ostvaren je kod pečurke *B. edulis*, 39,09% (m/m).

2. Sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja u suvim ekstraktima ispitivanih pečuraka kreće od 13 do 70 mg EGK/g ekstrakta. Ekstrakt pečurke sa najvećim sadržajem ukupnih fenolnih komponenata je ekstrakt pečurke *C. pistillaris* (72,48 mg EGK/g). Najmanji prinos ukupnih fenola određen je u ekstraktu pečurke *M. procera* (13,78 mg GAE/g).

Sadržaj ukupnih flavonoida u analiziranim etanolnim ekstraktima pečuraka kreće se u opsegu od 1,87 g KE/g za ekstrakt *M. procera* do 48,46 g KE/g za ekstrakta *D. confragosa*. Pored pečurke *D. confragosa* visok sadržaj flavonoida detektovan je i u ekstraktu pečurke *C. pistillaris*. Mali sadržaj flavonoida od oko 3 mg KE/g ekstrakta određen je u obe vrste genusa *Lycoperdon*, *L. saccatum* i *L. perlatum*, kao i u ekstraktima drvenastih pečuraka *T. gibbosa* i *T. versicolor*.

Vrlo visok udeo flavonoida u odnosu na ukupne fenole dobijen je za pečurku *D. confragosa* (89,46%).

3. Primenom DPPH testa određena je skevindžer aktivnost DPPH` radikala pri koncentraciji ekstrakta pečuraka od 0,02 mg/ml. Pri ovoj koncentraciji ekstrakata najveću RSC vrednost, a time i najveću antioksidativnu aktivnost, od preko 90%, postižu ekstrakti *C. pistillaris* i *A. mellea*. Kao najslabiji skevindžeri DPPH` radikala, sa RSC vrednošću od oko 8%, pokazali su se ekstrakti drvenastih pečuraka *T. versicolor* i *T. gibbos*. Najnižu IC₅₀ vrednost, što ukazuje na najveću antioksidativnu aktivnost, postiže ekstrakt pečurke *C. pistillaris*, 0,0104 mg/ml.

Proizvod koji bi se na osnovu rezultata preliminarnih testova, odnosno sadržaja ukupnih fenola, ukupnih flavonoida i inhibitornog delovanja na DPPH radikale, mogla preporučiti kao antioksidant za dalju upotrebu je ekstrakt *C. pistillaris*.

4. Reduktivna sposobnost ispitivanih ekstrakata pečuraka raste sa porastom koncentracije. Primenom ovog testa utvrđeno je da ekstrakti *B. edulis*, *C. pistillaris* i *D. confragosa* pokazuju visoku reduktivna moć, što može biti uslovljeno visokim sadržajem ukupnih fenola ili visokim udelom flavonoidnih komponenata, kao u slučaju ekstrakta *D. confragosa*.

5. Svi analizirani ekstrakti pečuraka pokazuju skevindžer aktivnost superoksid radikala, ali je ta aktivnost različitog intenziteta i kreće se u opsegu od vrlo male aktivnosti, od oko 6%, do značajne aktivnosti, od oko 64%. Najveću skevindžer aktivnost ovog radikala pokazuje ekstrakt *B. edulis*, 64 %. Nešto niža, ali i dalje značajna aktivnost je aktivnost ekstrakta pečurke *A. mellea*. Najniža aktivnost od svega oko 6% određena je za etanolni ekstrakt drvenaste pečurke *D.*

confragosa. Kao antioksidativnu komponentu u odnosu na superoksida radikal, za upotrebu mogao bi se preporučiti ekstrakt *B. edulis*.

Skevindžer aktivnost hidroksil radikala postoji u gotovo svim ispitivanim ekstraktima pečuraka, ali je ona, kao i u slučaju superoksid radikala, različitog intenziteta. Ekstrakti *B. edulis*, *C. pistilaris* i *A. mellea* pokazuju sličnu i visoku skevindžer aktivnost ovog radikala, oko 80%. Ekstrakti pečuraka *L. saccatum* i *D. confragosa* pokazuju nešto slabiju skevindžer aktivnost, u odnosu na prethodna tri ekstrakta, ali je ta aktivnost takođe značajna i iznosi, 73% i 56%, respektivno. Kao jedini neefikasan skevindžer $\cdot\text{OH}$ radikala pokazao se ekstrakt pečurke *M. procera*. Ekstrakti svih ispitivanih vrsta pečuraka, sem *M. procera*, mogu se smatrati potencijalno korisnim ekstraktima za tretman patofizioloških procesa izazvanih hidroksil radikalima.

6. Poređenjem sposobnosti ispitivanih ekstrakata pečuraka da inhibiraju dejstvo osnovnog izazivača lipidne peroksidacije, odnosno hidroksil radikala, i poređenjem parametra S kao osnovnog parametra u praćenju promene membranske fluidnosti u toku procesa lipidne peroksidacije, može se izvesti zaključak da značajno zaštitno delovanje u odnosu na proces lipidne peroksidacije mogu imati etanolni ekstrakti pečuraka *A. mellea*, *B. edulis* i *L. saccatum*.

7. U svim analiziranim ekstraktima pečuraka najviše prisutan makro-element je kalijum, od oko 22 mg/g kod *D. confragosa* do oko 70 mg/g kod ekstrakta *C. pistilaris*, zatim sledi magnezijum, natrijum, pa kalcijum. Sadržaj Mg kreće se od 0,788 mg/g u ekstraktu *M. procera* do 3,735 mg/g u ekstraktu *D. confragosa*.

Što se tiče mikro-elemenata koji su ispitivani ekstraktima pečuraka najbitniji podaci tiču se ekstrakta pečurke *B. edulis* za koji je utvrđeno da sadrži najviše cinka, 89,00 $\mu\text{g/g}$, kao i daleko više selena (62,76 $\mu\text{g/g}$ ekstrakta) u odnosu na ekstrakte svih ostalih vrsta.

8. Primenom LC/UV/MS analize u suvom ekstraktu pečurke *C. pistilaris* identifikovano je specifično jedinjenje pistilarin, fungalni metabolit. Obzirom na veliki broj hidroksilnih grupa i nezasićenih veza jasno je da bi ovo jedinjenja moglo da poseduje određene i značajne antioksidativne karakteristike. Prisustvo pistilarina, pored visokog sadržaja fenolnih jedinjenja i prisustva cinka i selena, moglo bi se smatrati odgovornim za značajno antioksidativno delovanje ekstrakta *C. pistilaris*.

U suvom ekstraktu pečurke *B. edulis* identifikovana je karakteristična polifenolna komponenta variegatična kiselina, koja poseduje jako antioksidativno delovanje koje sigurno doprinosi ukupno određenom značajnom antioksidativnom delovanju ekstrakta pečurke *B. edulis*.

U suvom ekstraktu pečurke *D. confragosa* detektovano je prisustvo nekoliko komponenata derivata triterpena. Triterpeni detektovani u ovom ekstraktu mogu da doprinesu jačem antioksidativnom delovanju.

9. Primenom LC/UV/MS i HPLC/DAD analize u ekstraktima pečuraka identifikovan je adenzin, jedinjenje potencijalno farmakološki značajno u terapiji nekih kardioloških stanja.

Sadržaj adenzina u ekstraktima ispitivanih vrsta pečuraka kreće se u opsegu od oko 1,13 mg/g do oko 4,58 mg/g. Najveći sadržaj adenzina, i do nekoliko puta veći u odnosu na druge ispitivane ekstrakte, određen je u ekstraktu pečurke *L. saccatum*.

10. Ekstrakcija pečuraka *B. edulis*, *M. procera* i *A. mellea* ugljendioksidom u superkritičnom stanju rađena je na pritiscima od 100, 200 i 300 bar, temperaturi od 40°C i vremenu ekstrakcije od 4 h. Najveći prinos ekstrakcije primenom ovog ekstragensa na pritisku od 300 bar ostvaren je kod pečurke *C. pistillaris*, 3,218%, a najmanji kod *A. mellea*, 1,453%.

11. Može se zaključiti da su superkritični ekstrakti ispitivanih vrsta pečuraka bogati nezasićenim masnim kiselinama. U ispitivanim ekstraktima dominantna je linoleinska kiselina i njen udeo kreće se u opsegu od 33,44 do 67,69%. Sadržaj olinske kiseline je od 9,96% do 42,37%. Daleko najveći sadržaj linoleinske kiseline (oko 67%) detektovan je ekstraktu pečurke *L. saccatum*. U superkritičnom ekstraktu *C. pistillaris* dominantna masna kiselina bila je oleinska kiselina (42,37%). Ovo je ujedno i najveći sadržaj ove kiseline detektovan u odnosu na ostale ispitivane superkritične ekstrakte. Najveći udeo palmitooleinske kiseline u odnosu na ostale ekstrakte, određen je u superkritičnom ekstrakt *A. mellea*, oko 4,5%.

12. U svim analiziranim superkritičnim ekstraktima pečuraka detektovan je ergosterol. On je dominantno jedinjenje sterolne strukture u ekstraktima *D. confragosa*, *M. procera*, *A. mellea* i *B. edulis*. Najviše ga ima u ekstraktu drvenaste *Polyporaceae* pečurke, *D. confragosa*. U ekstraktu *D. confragosa* pored dominantnog ergosterola, detektovani su i 7,22-ergostadienon, fungisterol, kalinasterol, kao i jedan derivat ergosterola. Kao i u slučaju ekstrakta *L. saccatum*, u superkritičnom ekstraktu *C. pistillaris* dominantno jedinjenje sterolne strukture je 7,22-ergostadienon. U ovom ekstraktu identifikovano je i jedinjenje koje poseduju antialdosteroničke osobine ergosta-4,6,8 (14), 22-tetraen-3-on. Obzirom na spektar sterolnih jedinjenja, kao i njihov udeo u analiziranim ekstraktima, za dalju analizu i eventualnu upotrebu mogao bi se preporučiti ekstrakt pečurke *D. confragosa*.

13. Superkritični ekstrakt pečurke *A. mellea* značajno povećava fluidnost membrane eritrocita i to u oba ispitivana sloja ($p < 0,05$). Isti je slučaj sa superkritičnim ekstraktom pečurke *M. procera*. Superkritični ekstrakt pečurke *D. confragosa*, kao i ekstrakt pečurke *C. Pistillaris*, povećavaju fluidnost membrane eritrocita u površinskom sloju membrane. Na dublji sloj membrane eritrocita ekstrakt *D. confragosa* nema uticaja, dok ekstrakt *C. pistillaris*, obzirom na povećanje parametra S u odnosu na kontrolni uzorak, smanjuje fluidnost. Ekstrakti pečuraka *B. edulis* i *L. saccatum* ne utiču na povećanje, odnosno promenu fluidnosti membrane eritrocita.

Može zaključiti da superkritični ekstrakti, odnosno pečurke *A. mellea* i *M. procera*, indukuju statistički signifikantno povećanje membranske fluidnosti i to u oba ispitivana sloja membrane, pa se iz tog razloga mogu koristiti kao deo antihipertenzivne ishrane.

14. Na osnovu analize antioksidativnog delovanja pečuraka, može se zaključiti da u pogledu ovog delovanja najbolje karakteristike pokazuje ekstrakt pečurke *C. pisillaris*, ali su veoma povoljne karakteristike i ekstrakta *B. edulis*, pa bi se ova dva ekstrakta mogla koristiti kao nosioci antioksidativnog delovanja u farmaceutskom proizvodu, odnosno dijetetskom

suplementu na bazi pečuraka. Kao komponenta sa najvećim sadržajem esencijalnog cinka i selena može se preporučiti ekstrakt pečurke *B. edulis*, a u pogledu adenozina ekstrakt pečurke *L. saccatum*. Pečurke *A. mellea* i *M. procera* pozitivno deluju na fluidnost membrane eritrocita, pa bi se one mogle uključiti kao korisne namirnice u antihipertenzivnu ishranu.

6. LITERATURA:

- Abdullah M. I., Young J. C., Games D. J., 1994. Supercritical fluid extraction of carboxylic and fatty acids from *Agaricus* spp. Mushrooms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42, 718-722.
- Abudureyimu Y., Abuduaini A., Hamulati W., 2001. Studies on scavenge of hydroxyl radical and protection of DNA damage by 5 different Uigur medicinal herbs. *Chiniese Traditional Herbal Drugs*, 32, 236-238.
- Akil M., Gurbuz U., Bicer M., Sivrikaya A., Mogulkoc R., Batalaci A. K., 2010. Effect of Selenium Supplementation on Lipid Peroxidation, Antioxidant Enzymes, and Lactate Levels in Rats Immediately After Acute Swimming Exercise. *Biological Trace Elemnts Research*, DOI: 10.1007/s12011-010-8785-z
- Alberts A. W., Chen J., Kuron V., Hunt J., 1980. Mevinolin, a highly potent competitive inhibitor of hydroxymethylglutaryl-co-enzyme A reuctase and cholesterol-lowering agent. *Proceedings of the National Academy of Science*, 77, 3957-3961.
- Alissa E. M., Bahijri S. M., Ferns G. A., 2003. The controversy surrounding selenium and cardiovascular diseases: a review of the evidence. *Medicinal Science Monitor*, 9, RA9-18.
- Ascherio A., Rimm E. B., Hernana M. A., Giovannucci E. L., Kawachi I., Stampfer M. J., Willett W. C., 1998. Intake of Potassium, Magnesium, Calcium, and Fiber and Risk of Stroke Among US Men. *Circulation*, 98, 1198-1204
- Bannister J., Bannister W., Rotilio G., 1987. Aspects of the structure, function, and applications of superoxide dismutase. *CRC Critical Reviews in Biochemistry*, 22, 111-180.
- Barasi M., 1997. *Human nutrition: a Health Perspective*. Arnold, London
- Barros L., Baptista P., Correia D. M., Casal S., Oliveira B., Ferreira I., 2007. Fatty acid and sugar composition, and nutritional value of five edible mushroom from Northeast Portugal. *Food Chemistry*, 105, 140-145.
- Barter P. J., Rye K. A., 1996. High density lipoproteins and coronary hearth diseases. *Atherosclerosis*, 112-121.
- Beelman R. B. and Roys D. J., 2006. Selenium enriched of *Pleurotus cornucopiae* (Pulet) Rolland and *Grifola frondosa* (Dicks:Fr) S. F. Gray mushrooms. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 8, 77-84.
- Bernas E., Jaworska G., Lisiewska Z., 2006. Edible mushrooms as a source of valuable nutritive constituents. *Acta Scientica Polonica, Technolgica Alimentaria*, 5, 5-20.

- Bobek P., Ginter E., Jurcovicova M., Ozdin L. and Mekinova D., 1991. Cholesterol lowering effect of the mushroom *Pleurotus ostreatus* in hereditary hypercholesterolemic rats. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 35, 191-195.
- Bohn J. A. and BeMiller J. N., 1995. 1-3-B-D glucans as biological response modifiers: review of structure-functional activity relationships. *Carbohydrate Polymers*, 28, 3-14.
- Bor M., Cevik C., Uslu I., Guncel F., Duzgun E., 1999. Selenium levels and glutathione peroxidase activities in patients with acute myocardial infarction. *Acta Cardiologica*, 54, 271-276.
- Božac R., 1984. Najpoznatije gljive naših krajeva. Mladost, Zagreb.
- Božin B., 2004. Antimikrobna i Antioksidativna aktivnost etarskih ulja vrsta familije Laminaceae. Magistarska teza. Univerzitet u Novom Sadu, Prirodno-Matematički fakultet.
- Brandt, C.R. and F. Piraino, 2000. Mushroom antivirals. *Recent Research and Development in Antimicrobial agents and Chemotherapy*, 4, 11-26.
- Breene W., 1990. Nutritional and medicinal value of speciality mushrooms. *Journal of Food Production*, 53, 883-894.
- Brenneisen P., Steinbrenner H., Sies H., 2005. Selenium, oxidative stress, and health aspects. *Molecular Aspects of Medicine*, 26, 256-267.
- Brigelius Flohe R., 1999. Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases. *Free Radical Biology and Medicine*, 27, 9-10.
- Brown J. P. A., 1980. A review of the genetic affects of naturally occurring flavonoids, anthroquinones and related compounds. *Mutation Research*, 75, 243-277.
- Burtis C. A., Ashwood E. R., 1996. *Tietz Fundamentals of Clinical chemistry*, 4th edition W. B. Saunders Company, Philadelphia.
- Cadenas E., Davies J. A. K., 2000. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress and aging. *Free Radical Biology and Medicine*, 29, 222-230.
- Canessa M., Adragna N., Solomon H. S., Connolly T. M., Tosteson D. C., 1980. Increased sodium-lithium countertransport in red cells of patients with essential hypertension. *New England Journal of Medicine*, 302, 772-776.
- Capon R. J., Stewart M., Ratnayake R., 2007. Citromycetins and bilains A-C: New aromatic polyketides and diketopiperazines from *Australina* marine-derived and terrestrial *Penicillium* spp. *Journal of Natural Products*, 70, 1746-1752.

- Capon R. J. Stewart, Ratnajaker M. R., Lacey, Gill E. J. H., 2007. Citromycetins and bilains A-C: New aromatic polyketides and diketopiperazines from Australian marine-derived and terrestrial *Penicillium* spp. *Journal of Natural Products*, 70, 1746-1752
- Carver J. D., 1994. Dietary nucleotides: cellular immune, intestinal and hepatic system effects. *Journal of Nutrition*, 124, 144-148.
- Chang S. T., 2006. The world mushroom industry: Trends and technological development. *Int. J. Med. Mush.*, 8, 297-314.
- Chang S. T., 1991. Cultivated mushrooms, in: *Handbook of Applied Mycology*, Vol 3., 221-240, Marcel Dekker, New York.
- Chang S. T., 1999. World production of cultivated edible and medicinal mushrooms in 1997 with emphasis on *Letinula edodes* (Berk.) Sing. In *China International Journal of Medicinal Mushrooms*, 1, 291-300.
- Chanine J. M. E. H., Bauer A. M., Baraldo K., Lion C., Ramiandrasoa F., Kunesch G., 2001. Kinetics and Thermodynamics of Complex formation between Fe^{III} and Two Synthetic Chelators of Diactecholspermidine Family. *European Journal of Inorganic Chemistry*, 2287-2296.
- Cheeseman K.H. and Slater T.F., 1993. An introduction to free radical biochemistry. *British Medical Bulletin*, 49, 481-493.
- Chey F. Y, Wong J. Y., Lee J. S., 2008. Nutritional Quality and Antioxidant Activity of Selected Edible Wild Mushrooms. *Food Science and Technology*, 14, 375-384.
- Cheung L. M., Cheung P. C. K., 2005. Mushroom extracts with antioxidant activity against lipid peroxidation. *Food Chemistry*, 89, 403-409.
- Cheung L. M., Cheung P. C. K., Ooi V.E.C., 2003. Antioxidant activity and total phenolics of edible mushroom extracts. *Food Chemistry*, 81, 249-255.
- Cocchi L., Vescovi L., Petrini L.E., 2006. Heavy metals in edible mushrooms in Italy. *Food Chemistry*, 98, 277-284.
- Combet E., Henderson J., Eastwood D. C., Burton K. S., 2006. Eight carbon volatiles in mushrooms and fungi: properties, analysis, and biosynthesis. *Mycoscience*, 47, 317-326.
- Combs G. F., Clark L. C., Turnbull B. W., 2001. An analysis of cancer prevention by selenium. *BioFactors*, 14, 153-159.

- Cooper R. A., 1977. Abnormalities of cell-membrane fluidity in the pathogenesis of disease. *New England Journal of Medicine*, 297, 371–377.
- Cuzzocrea S., Riley D. P., Caputi A. P., Salvemini D., 2001. Antioxidant therapy: a new pharmacological approach in shock, inflammation and ischemia/reperfusion injury. *Pharmacology Reviews*, 53, 135-139.
- Damjanović B., 2005. Ispitivanje ekstrakcije ploda morača (*Foeniculum vulgare* Mill.) natkritičnim ugljendioksidom. Doktorska disertacija. Tehnološki fakultet Novi Sad.
- Delcaille J. R., 1978. Economics of cultivated mushrooms. In *The biology and Cultivation of Edible Mushrooms*, by Editors Chang S. T. and Hayes H. A., Academic Press, Inc. New York, 726-793.
- Dimitros B., 2006. Sources of natural phenolic antioxidants. *Trends in Food Science and Technology*, 17, 505-512.
- Dominiczak A. F., 1991, et al. Lipid bilayer in genetic hypertension. *Hypertension*, 18, 728–757.
- Dröge W., 2002. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev*, 82, 47-95.
- DSFS. www.gov.dietary supplement fact sheet
- Elmastas M., Isidlak O., Turkeklu I., Temur N., 2007. Determination of antioxidant activity and antioxidant compounds in wild edible mushrooms. *Food Composition and Analysis*, 3, 337-345.
- El-Aty A. M., Choi JH, Ko MW, Khay S., Goudah A., Shin H.C., Kim J.S., Chang B.J., Lee C.H., Shim J.H., 2009. Approaches for application of sub and supercritical fluid extraction for quantification of orbifloxacin from plasma and milk: Application to disposition kinetics. *Analytica Chimica Acta*, 631, 108-115.
- El-Mekkawy S., Mesehly M. R., Nakamura N. Tezuka Y., Hattori M., Kakiuchi N., Sgimotohno K., Kawatha T., Otake T., *Phytochemistry*, 1998, 49, 1651-1657.
- Elmfada I., Fritzsche D., 1999. Great tables of mineral constituents, Reserve carbohydrates in fungi. In: *The filamentous fungi*. Eds. Muza Warszawa, Poland\Blumenthal H. J.
- Espin J. C., Wichers H. J. J., 1999. Slow-Binding Inhibition of Mushroom (*Agricus bisporus*) Tyrosinase Isoforms by Tropolone. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 2638–2644.
- Espin J. C., Soler-Rivas C., Wichers H. J., 2000. Characterization of total free radical scavenger capacity of vegetable oils and oil fractions using 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 48, 648-656.
- Fan H., Li S.P., Xiang J. J., Lai C. M., Yang F. Q., Gao J. L., Wang Y. T., 2006. Qualitative and quantitative determination of nucleosides, bases and their analogues in natural and cultured Cordyceps

- by pressurized liquid extraction and high performance liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry (HPLC-ESI-MS/MS). *Analytica Chimica Acta*, 567, 218-228.
- Ferreira I., 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 Chemistry*, 4, 1511-1516.
- Ferreira I., Vaz J., Vasconcelos H., Martins A., 2010. Compounds from Wild Mushrooms with Antitumor potential. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 5, 424-436.
- Florczak J., Karmanska A., Wedisz A., 2004. Comparison of the chemical content of selected wild growing mushrooms. *Bromatology and Chemical Toxicology*, 28, 17-23.
- Fraga C. G., Oteiza P. I., 2002. Iron toxicity and antioxidant nutrients. *Toxicology*, 180, 23-32.
- Gambhir K.K., Agarwal V.R.J., 1990. Potassium efflux: a simple method to determine intactness of erythrocytes. *Journal of the National Medical Association*, 92, 565-570.
- Gao J. J., Min B. S., Ahn E. M., Nakamura N., Lee H. K., Hattori M., 2002. New triterpene aldehydes, lucialdehydes A-C, from *Ganoderma lucidum* and their cytotoxicity against murine and human tumor cells. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 50, 837-840.
- Gencelep H., Uzun Y., Tuncurk Y., Demirel K., 2009. Determination of mineral contents of wild-grow edible mushrooms. *Food chemistry*, 113, 1033-1036.
- Gezer K., Duru M.E., Kivrak I., Turkoglu A., Mercan N., Turkoglu H., Gulcan S., 2006. Free-radical scavenging capacity and antimicrobial activity of wild edible mushrooms from Turkey. *African Journal of Biotechnology*, 5, 1924-1928.
- Gođevac D., Vujisić L., Mojović M., Ignjatović A., Spasojević I., Vajs V., 2008. Evaluation of antioxidant capacity of *Allium ursinum* L. volatile oil and its effect on membrane fluidity. *Food Chemistry*, 107, 1692-1700.
- Greer F. R., Marshall S., 1989. Bone mineral content serum vitamin D metabolite concentration and UV-B light exposure in infants fed human milk with and without vitamin D2 supplements. *Journal of Pediatrics*, 114, 204-212.
- Gunde Cimerman N., 1999. Medicinal value of the genus *Pleurotus* (Fr) P. Karst (*Agricales* S. R., *Basidiomycetes*). *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 1, 69-80.
- Gunde Cimerman N. and Cimerman A., 1995. *Pleurotus* fruiting-bodies contain the inhibitor of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A reductase-lovastatin. *Experimental Mycology*, 19, 1-6.

- Halliwell B., Gutteridge J.M., 1999. Free Radicals in Biology and Medicine. Oxford: Oxford University Press.
- Halliwell B., Gutteridge M.C., 1990. The antioxidants of human extracellular fluids, Archives of Biochemistry and Biophysics, 280, 1-8
- Halliwell B., 1994. Free radicals and antioxidants: a personal view, Nutrition Reviews, 52, 253-264.
- Hawksworth D. L., 1991. The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance and conservation. Mycological Research, 95, 641-655.
- Herrera B., Alvarez A.M., Sanchez A. 2001. Reactive oxygen species (ROS) mediate the mitochondrial-dependent apoptosis induced hepatocytes, FASEB Journal, 15, 74.
- Herrmann K., 1989. Occurrence and content of hydroxycinnamic and hydroxybenzoic acid compounds in foods. Critical Review in Food Science Nutrition, 28, 315-347.
- Hertog M. G. I., Feskens E. J. M., Hollman P. C. H., Katan M. B., Kromhout D., 1993. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart diseases. The Zutphen elderly study. Lancet, 342, 1007-1011.
- Hinder R. C., Liu Z., 1997. Journal Pharmacy and Pharmacology, 49, 59.
- Hitzemann R.J., Hirschowitz J., Garver D.L., 1986. On the physical properties of red cell ghost membranes in the affective disorders and psychoses. Journal of Affective Disorders, 10, 227-232.
- Ho E., Ames B. N., 2002. Low intracellular zinc induces oxidative DNA damage, disrupts p53, NFkappa B, and API DNA binding, and affects DNA repair in rat glioma cell line. PNAS, 99, 16770-16775.
- Hobbs C., 1995. Medicinal Mushroom: An exploitation of Tradition, Healing and Culture. Botanica Press, Santa Cruz.
- Huang B. H., Yung K. H. and Chang S. T., 1985. The sterol composition of *Volvariella volvacea* and other edible mushrooms. Mycologia, 77, 959-963.
- Ikekawa T., Nakanishi M., Uehara N., Chihara G. and Fukuoka F., 1968. Antitumor action of some Basidiomycetes, especially *Phellinus linteus*. GANN, 59, 155-157.
- Ikekawa T., Uehara N., Maeda Y., Nakanishi M. and Fukuoka F. 1969. Antitumor activity of aqueous extracts of edible mushrooms. Cancer Research, 29, 734-735.
- Ilzuka H., 1997. Production of *Lentinus edodes* mycelia extract (LEM). Food Reviews International, 13, 343-348.

- Institute of Medicine, 1999. Food Nutrition Board. Dietary Reference Intakes: Calcium, Phosphorus, Magnesium, Vitamin D. National Academy Press, Washington DC.
- Isanga J., Zhang G. N., 2007. Biologically active components and nutraceuticals in peanuts and related products: review. *Food Reviews International*, 23, 123-140.
- Jasinghe V. J. and Perer C. O., 2005. Distribution of ergosterol in different tissues of mushrooms and its effect on the conversion of ergosterol to vitamin D₂ by UV irradiation. *Food chemistry*, 92, 541-546.
- Johnson F., Giulivi C., 2005. Superoxide dismutase and their impact upon human health. *Molecular Aspects of Medicine*, 26, 340-352.
- Jong S. C., Birmingham J. M., 1993. Mushrooms a source of natural flavor and aroma compounds. In S. T. Chang, J. A. Buswell and S. W. Chiu (Eds). *Mushroom Biology and mushroom products, proceeding of the first international conference* (pp 345-365). The Chinese University of Hong Kong.
- Jong S. C., Birmingham J. M., Pai S. H., 1991. Immunomodulatory substances of fungal origin. *Journal of Immunology and Immunopharmacology*, 3, 115-122.
- Kalac P., Svoboda L., 2000. A review of trace elements concentration in edible mushrooms. *Food chemistry*, 69, 273-281.
- Karkocha I., Moldecki H., 1965. Studies of nutritive values of some Polish mushrooms. *Rocz. PZH* 16, 71-76.
- Kasuga A., Aoyagi Y., Sugahara T., 1995. Antioxidant Activity of Fungus *Suillus bovinus* (L: Fr.) O. Kuntze. *Journal of Food Science* Volume 5, 1113-1115.
- Kavishree S., Hemavathy J., Lokesh B. R., Shashirekha M. N., Rajarathnam S., 2008. Fat and fatty acids in Indian edible mushrooms. *Food Chemistry*, 106, 597-602.
- Kiho T., Morimoto H., Sakushima M., Usui S. and Ukai S., 1995. Polysaccharides in fungi, XXXV Antidiabetic activity of an acidic polysaccharide from the fruiting bodies of *Tremella aurantia*. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 18, 1627-1629.
- Kim M. Y., Seguin P., Ahn J. K., Kim J. J., Chun S. C., Kim E. H., Seo S. H., Kavy E. Y., Kim S. L., Park Y. J., Ro H. M., Chung I. M., 2008. Phenolic Concentration and Antioxidant Activities of edible and Medicinal Mushrooms in Korea. *Journal of agricultural and Food Chemistry*, 56, 7625-7627.
- Kim O. H., Yung B. K., Hur N. I., Das S., Yun Y. W., Choi Y. S., Song C. H., 2001. Hypoglycemic effect of mycelia produced from submerged culture of *Phellinus linteus* (Berk. Et Curt) Teng (A phyllopharomycetideae) in streptozotonic-induced diabetic rats. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 3, 21-26.

- Klotz L. O., Kroncke K. D., Buchczyk D. P., Sies H., 2003. Role of copper, zinc, selenium and tellurium in the cellular defense against oxidative and nitrosative stress. *Journal of Nutrition*, 133, 1448s-1451s.
- Knekt P., Marniemi J., Teppo L., Heliövaara M., Aromaa A., 1998. Is low selenium status a risk factor for lung cancer. *American Journal of Epidemiology*, 148, 975-982.
- Ko Y. T., Lin Y. L., 2003. 1,3 B- glucan quantification by a fluorescence microassay and analysis of its distribution in foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 3313-3318.
- Kobrin S. M., Goldfarb S., 1990. Magnesium Deficiency. *Semin Nephrol*, 10, 525-535.
- Kurashiga S., Akuzawa Y., Eudo F., 1997. Effects of *Lentinus edodes*, *Grifola frondosa* and *Pleurotus ostreatus* administration on cancer outbreaks and activities of macrophages and lymphocytes in mice treated with carcinogen N-butyl-N-butanolinitroso-amine. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, 19, 175-183.
- Li L., Tsao R., Yang R., Kramer J. K.G. and Hernandez M., 2007. Fatty acid profiles, tocopherol contents, and antioxidant activities of heartnut (*Juglans ailanthifolia* Var. cordiformis) and Persian walnut (*Juglans regia* L.), *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 55, 1164–1169.
- Leonardth W., Kurktschiev T., Meissner D., Lattke P., Abletshauer C., Weidinger G., Jaross W., Hanefeld M., 1997. Effects of fluvastatin therapy on lipids, antioxidants, oxidation of low density lipoproteins and trace metals. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 53, 65-9.
- Lepojević Ž., 2000. Praktikum hemije i tehnologije farmaceutskih proizvoda. Univerzitet u Novom Sadu, Zmaj, Novi Sad.
- Li S. P., Li P., Dong T. T. X., Tsim K. W. K., 2001. Determination of nucleosides in natural *Cordyceps sinensis* and cultured *Cordyceps* mycelia by capilar electrophoresis. *Electrophoresis*, 22, 144-150.
- Lindequist U., Nidermeyer T., Julich W. D., 2005. The pharmacological Potential of Mushrooms. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, 2, 285-299.
- Liu F., Ooi V. E. C., Chang S. T., 1997. Free radical scavenging activities of mushrooms polysaccharide extracts. *Life Sciences*, 64, 1005-1011.
- Lo K. M., Cheung P. C. K., 2005. Antioxidant activity of extract from fruiting bodies of *Agrocybe aegerita* var. alba. *Food Chemistry*, 89, 533-539.
- Manzi P., Aguzzi A., Pizzoferrato A., 2001. Nutritional value of mushroom widely consumed in Italy. *Food Chemistry*, 73, 321-325.

- Markham K. R., 1989. *Methods in Plant Biochemistry*, J.B. Harborne and P.M. Dey, Academic Press London: pp. 193-237.
- Marentis R., 2001. Processing pharmaceuticals with supercritical fluids. 4th Brazilian Meeting on Supercritical Fluids EBFS 2001. tn-17.
- Mattila P., Konoko K., Eurola M., Pihlava J.M, Astola J., Vahteristo L., Hietaniemi V., Kumpulainen J., Valtonen M., Piironen V., 2001. Contents of vitamins, mineral elements, and some phenolic compounds in cultivated mushrooms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 2343-2348.
- Mattila P., Lampi P., Ronkainen A. R., Toivo J., Piironen V., 2002. Sterol and vitamin D2 contents in some wild and cultivated mushrooms. *Food Chemistry*, 76, 293-298.
- Mau J. H., Hwang S. J., 1997. Effect of γ -radiation of flavor compounds of fresh mushrooms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 1849-1852.
- Mau J. L., Lin H. C., Cong S. F., 2002. Antioxidant properties of several speciality mushrooms. *Food Research International*, 35, 519-526.
- McCall R. M., Frei B., 1999. Can antioxidant Vitamins Materially Reduce Oxidative Damage in humans? *Free Radical Biology Medicinal*, 26, 1034-1053.
- Meir J., Kanner B., Akiri B., Hadas S. P., 1995. Determination and involvement of aqueous reducing compounds in oxidative defence systems of various senescing leaves. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43, 1813-1815.
- Middleton E., Kandaswami C., 1992. Effects of flavonoids and inflammatory functions. *Biochemical Pharmacology*, 43, 1167-1179.
- Miles P. G. and Chang S. T., 1997. *Mushroom biology: concise basics and current development*. World scientific, Singapore.
- Mizuno T., 1996. A development of antitumor polysaccharides from mushroom fungi. *Food Ingredient Journal (Japan)*, 167, 69-85.
- Mizuno T., Sakai T., and Chihara G., 1995. Health food and medicinal usage of mushrooms. *Food Review International*, 11, 69-81.
- Nakajima Y., Sato Y., Konishi T., 2007. Antioxidant Small Phenolic Ingredients in *Inonotus obliquus* (person) *Pilah Chaga*. *Chemical Pharmaceutical Bulletin*, 55, 1222-1226.
- Nanba H., 1997. MAitake D fraction: healing and preventive potential for cancer. *Journal Orthomolecular Medicine*, 12, 43-49.

- Neve J., 1996. Selenium as a risk factor for cardiovascular diseases. *Journal of Cardiovascular Risk*, 3, 42-47.
- Nunoshiba T., Obata F., Boss A. C., Oikawa S., Mori T., Kawanishi S., Amamoto K., 1999. *The Journal of Biological Chemistry*, 274, 34832-34837.
- Oteiza P., Clegg M., Keen C., 2001. Short-term zinc deficiency effects nuclear factor-kappaB nuclear binding activity in rat tests. *Journal of Nutrition*, 131, 21-26.
- Oteiza P., Clegg M., Zago M., Keen C., 2000. Zinc deficiency induces oxidative stress and AP-1 activation in 3T3 cells. *Free Radical Biology Medicine*, 28, 1091-1099.
- Oteiza P., Mackenzie G., 2005. Zinc, oxidant-triggered cell signaling and human health. *Molecular Aspect of Medicine*, 26, 245-255.
- Oyaizu M., 1986. Studies on product of browning reaction prepared from glucose amine, *Japanese Journal of Nutrition*, 44, 307-315.
- Parks J. S., Huggins K. W., Gebre A. K., Burleson E. R., 2000. Phosphatidylcholine fluidity and structure affect lecithin: cholesterol acyltransferase activity. *The Journal of Lipid Research*, 41, 546-553;
- Pasquali I., Bettini R., Giordano F., 2008. Supercritical fluid technologies: An innovative approach for manipulating the solid-state of pharmaceuticals. *Advance Drug Delivery Reviews*, 60, 399-410.
- Piironen V., Lindsay D. G., Miettinen T. J., Toivo J., Lampi A. M., 2000. Plant sterols: biosynthesis, biological function and their importance to human nutrition. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80, 939-966.
- Piletić M.V., Milić B. Lj., Djilas S. M., 1992. *Organska hemija II deo*, Prometej, Novi Sad.
- Pilz S., Dobing H., Fischer J. E., Wellnitz B., Seelhotst U., Boehm B. O., Marz W., 2008. Low vitamin D levels predict stroke in patients referred to coronary angiography. *Stroke*, 39, 2611-2613.
- Primiano T., Sutter R. T., Kensler W. T., 1997. Redox Regulation of Genes that Protect Against Carcinogenesis. *Comp. Biochem. Physiol.*, 118, 487-497.
- Radaković S, Spasojević I., Bačić G., 2006. Can changes of erythrocyte membrane rheology account for cardiotoxicity of cytostatic drugs? A cisplatin study. *Proceedings of the 8th International Conference on Fundamental and Applied Aspects of Physical Chemistry*, Belgrade, 341-343.
- Reshetnikov S. V., Wasser S. P., Tan K.K., 2001. Higher Basidiomycetes as a source of antitumor and immunostimulating polysaccharides (Review). *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 3, 361-394.

- Ribeiro J. A., 1995. Purinergic inhibition of neurotransmitter release in the central nervous system. *Pharmacology and Toxicology*, 77, 299-305.
- Ribeiro B., Guedes de Pinho P., Andrade P. b., Baptista P., Valentano P., 2009. Fatty acid composition of wild edible mushrooms species: A comparative study. *Microchemical Journal*, 93, 29-35.
- Rice Evans C., Miller N., Paganga G., 1995. Structure-antioxidant activity, relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*, 7, 933-956.
- Rodwell V. W., Nordstrom J. L., Mitschelen J. J., 1976. Regulation of HMG-CoA reductase. *Advances in Lipid Research*, 14, 1-74.
- Rosecke J., König W., 2000. Constituents of the fungi *Daedaleopsis quarcina* and *Daedaleopsis confragosa* var. *tricolor*. *Phytochemistry*, 54, 757-762.
- Rosen G. M., Barber M. J., Rauckman E. J., 1983. Disruption of erythrocyte membranal organization by superoxide. *The Journal of Biological Chemistry*, 258, 2225-2228.
- Rossi M., McLaughlin J. K., Lagiou P., Bosetti C., Talamini R., Lipworth L., Giacosa A., Montella M., Franceschi S., Negri E., Vecchia C. L., 2009. Vitamin D intake and breast cancer risk: a case-control study in Italy. *Annals of Oncology*, 20, 374-378.
- Rudawska M., Laski T., 2005. Macro and micro content in fruiting bodies of wild mushrooms from Norecka forest in west-central Poland. *Food Chemistry*, 92, 499-504.
- Russo M. W., Murray S. C., Wurzelmann J. L., Woosley J. T., Sandler R. S., 1997. Plasma selenium levels and the risk of colorectal adenomas. *Cancer*, 28, 125-129.
- Samorini G., 2001. New data on the ethnomycology of psychoactive mushrooms. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 3, 257-278.
- Sarafian T. A., Bredesen D. E., 1994. Is apoptosis mediated by reactive oxygen species. *Free Radical Biology Medicine*, 21, 1-8
- Sarikurkcü C., Tepe B., Yamac M., 2008. Evaluation of the antioxidant activity of four edible mushrooms from Central Anatolia, Eskishir Turkey: *Lactarius deterrimus*, *Suillus collitinus*, *Boletus edulis*, *Xerocomus chrysenteron*. *Bioresource technology*, 99, 6651-6655.
- Saris N. E., Mervaala E., Karppanen H., Khawaja J. A., Lewenstam A., 2000. Magnesium: an update on physiological, clinical, and analytical aspects. *Clinica Chimica Acta*, 294, 1-26.
- Savoie J. M., Minvielle N., Largeteau M. L., 2008. Radical-scavenging properties of extracts from white button mushroom, *Agaricus bisporus*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 88, 970-975.

- Sawai M., Adachi Y., Kanai M., Matsui S., Yadomae T., 2002. Extraction of conformationally stable (1-6)-branched (1-3)-B-glucans from premixed edible mushrooms powders by cold-alkaline solution. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 1, 9-29.
- Shahidi F., Wanasundara P. K. J., 1992. Phenolic antioxidants. *Critical Reviews on Food Science and Nutrition*, 32, 67-103.
- Shamberger R. J., 1985. The genotoxicity of selenium. *Mutation Research*, 154, 29-48.
- Shimada K., Fujikawa K., Yahara K. and Nakamura T., 1992. Antioxidative properties of xanthan on the autoxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 40, 945-948.
- Sies H., 1985. Oxidative stress: Introductory remarks. In: Sies H. (Ed), *Oxidative Stress*. Academic press, San Diego, New York, London, 1-8.
- Sies H., 1991. Oxidative stress: from basic research to clinical application. *American Journal of Medicine*, 91, 31s-38s.
- Sies H., 1993. Strategies of antioxidant defense. *European Journal of Biochemistry*, 215, 213-219.
- Singleton, V. L., Orthofer R., Lamuela-Raventos R. M., 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, 299, 152-178.
- Singleton VL, Rossi J. A., 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16, 144-158.
- Slominski A., Semka I., Zjawiony J., Wortsman J., Gandy M. N., Li J., Zbytek B., Li W., Tuckey R. C., 2005. Enzymatic metabolism of ergosterol by cytochrome P450sc to biologically active 17 alpha, 24-dihydroxyergosterol. *Chemistry and Biology*, 12, 931-939.
- Smith J. E., Rowan N. and Sullivan R., 2002. Medicinal mushrooms; their therapeutic properties and current medical usage with special emphasis on cancer treatments, *Cancer Research UK*, University of Strathclyde.
- Song Y. S., Kim S. H., Sa J. H., Jin C., Lim C. J., Park E. H., 2003. Anti-angiogenic, antioxidant and xanthine oxidase inhibition activities of the mushroom *Phellinus linteus*. *Journal of Ethnopharmacology*, 88, 113-116.
- Spasojević I., Maksimović V., Bačić G., 2005. 5-Fluorouracil effects on erythrocytes in relation to its cardiotoxicity: Membrane structure and functioning, *Journal of Chemical Information and Modeling*, 25, 1680-1685.

- Spasojević I., Mojović M., Blagojević D., Spasić S. D., Joned D. R., Nikolić-Kokić A, Spasić M. B., 2008. Relevance of the capacity of phosphorylated fructose to scavenge the hydroxyl radical. *Carbohydrate Research*, 344, 80-4.
- Štefan L., Tepšić T., Zavidović T., Urukalo M., Tota D., Dmitrović R., 2007. Lipid peroxidation – causes and consequences. *Medicina*, 43, 84-93.
- Steglich W., Steffan B., Stroech K., Wolf M., 1984. Pistillarin, a characteristic metabolite of *Calvariadelphus pistilaris* and several *Ramaria species*. *Z. Naturforschung*, 39C, 10-12.
- Suay I., Arenal F., 2000. Screening of Basidiomycetes for antimicrobial activities. *Antonie van Leeuwenhoek*, 78, 129-139.
- Suay I., Arenal F., Asenio F. J., Basilio A., Cabello M. A., Diez M. T., Garcia J. B., Gonzalez del Val A., Gorrochategui J., Hernandez P., Pelaez F., Vicente M. F., 2000. Basidiomycetes for antimicrobial activities. *Antonie van Leeuwenhoek*, 78, 129-139.
- Sun M. T., Xiao J. T., Zhang S. Q., Liu Y. J., Li S. T., 1984. Therapeutic effect of some foods on hyperlipidemia in man. *Acta Nutrition Sinica*, 6, 127-133.
- Suqin Shao, Hernandez M., Kramer J., Rinker D., Tsao R., 2010. Ergosterol Profiles, Fatty Acid Composition, and Antioxidant Activities of Button Mushrooms as Affected by Tissue Part and Development Stage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 11616-11625.
- Susuki S., Ohshima S., 1974. Influence of shitake *Letinula edodes* on human serum cholesterol. *Annual Report of National Institute of Nutrition*, 25, 89-94.
- Taguchi T., Furue H., 1985. End point result of randomized controlled study on the treatment of gastrointestinal cancer with combination of Lentinan and chemotherapeutic agents. *Excerpta Medica*, 151-165.
- Tasić N., Radak Dj., Cvetković Z., Petrović B., Ilijevski N., Djordjević-Debić G., 2004. Uloga i značaj oligoelemenata u patogenezi arteroskleroze. *Vojnosanitetski pregled*, 61, 667-673.
- Thompson A. B., Bohling T., Heires A., Linder J., Rennard S. I., 1991. Lower respiratory tract iron burden is increased in association with cigarette smoking. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 117, 493-499.
- Tsuda K, Kinoshita Y., Nisho I., Masuyama Y, 1999. Adrenomedullin and membrane fluidity of erythrocytes in mild essential hypertension. *Journal of Hypertension*, 17, 201–210.

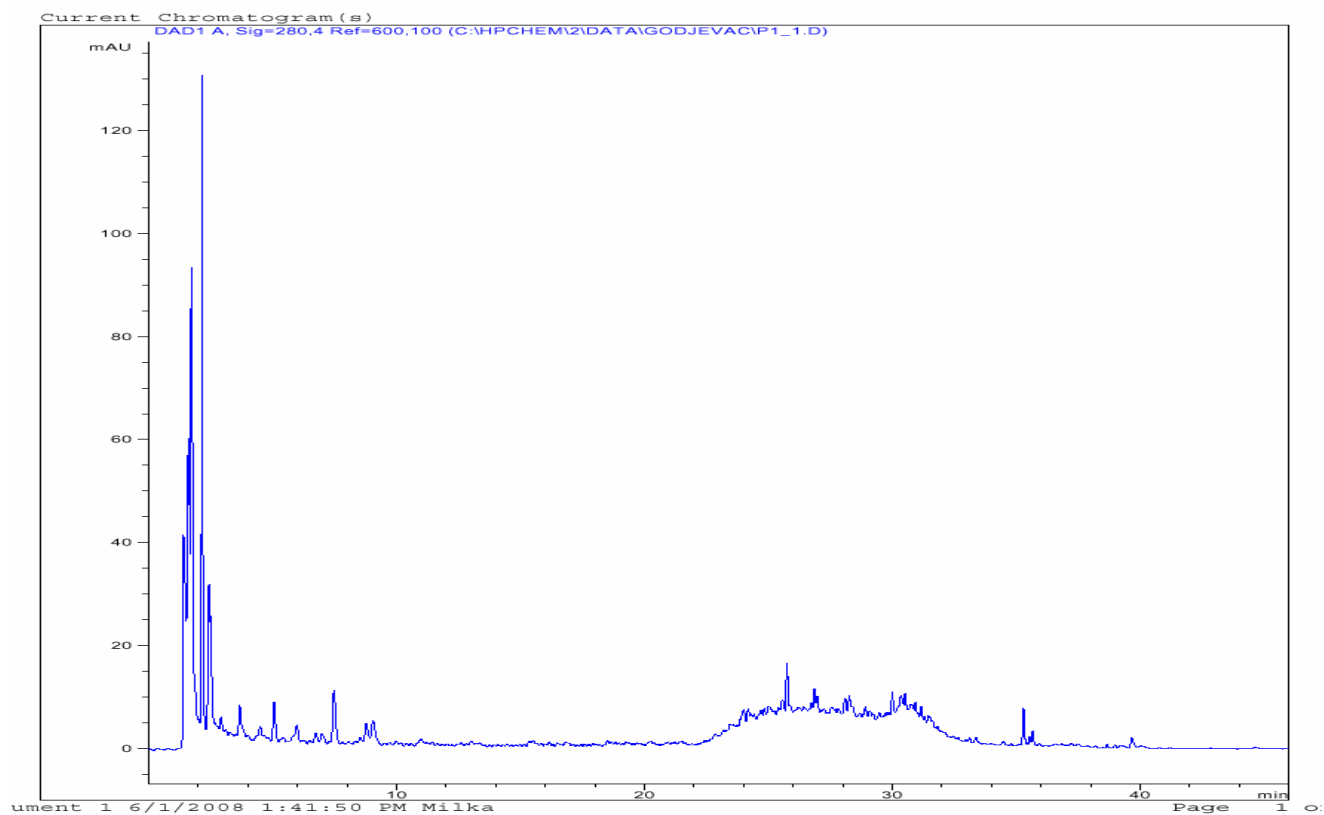
- Tsuda K, Iwahashi H., Minotogawa Y., Nishio I., Kido R., Masuyama Y., 1987. Electron spin resonance studies of erythrocytes from spontaneously hypertensive rats and humans with essential hypertension. *Hypertension*, 9,19–24.
- Tsuda K., Kinoshita-Shimamoto Y., Mabuchi Y., Nishio I., 2003. Hormone Replacement Therapy Improves Membrane Fluidity of Erythrocytes in Postmenopausal Women: An Electron Pramagnetic Resonance Investigation. *American Journal of Hypertension*, 16, 502-507.
- Turkoglu A., Duru M. E., Mercan N., 2007. Antioxidant and antimicrobial Activity of *Russula delica* Fr: An Edible Wild Mushroom. *Euroasian Journal of Analytical Chemistry*, 1, 54-67.
- Turkoglu A., Duru M. E., Mercan N., Kivrak I., Gezer K., 2007. Antioxidant and antimicrobial activities of *Laetiporus sulphureus* (Bill.) Murrill. *Food Chemistry*, 101, 267-273.
- Uauy R., Stringel G., Thomas R., Quan R., 1990. Effect of dietary nucleosides on growth and maturation of the developing gut in the rat. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 10, 615.
- UN APCAEM. Training Manual on Mushroom Cultivation Technology, United Nation Economic and Social Commission for Asia and the Pacific, Asian and Pacific Centre for Agricultural Engineering and Machinery (APCAEM), China International Science and Technology Convention Centre, Beijing, China
- Uzelac B., 2010. *Gljive Srbije i Zapadnog Balkana*, BGV Logik.
- Valentao P., Lopes G., Valente M., Barbosa P., Andrade P. B., Silva B. M., 2005. Quantification of nine organic acids in wild mushrooms. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 53, 3626-3630.
- Vidović S., Zeković Z., Mujić I., Lepojević Ž., Tumbas V., Mujić A, 2010. Antioxidant properties of selected *Boletus* mushrooms. *Food biophysic*, 5, 49-58.
- Vidović S., Mujić I., Zeković Z., Lepojević Ž., Milošević S., Jokić S. Extraction of fatty acids from *Boletus edulis* by subcritical and supercritical carbon dioxide. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. DOI: 0.1007/s11746-011-1772-5.
- Vetter J., 2003. Data on sodium content of common edible mushrooms. *Food Chemistry*, 81, 589-593.
- Voet D., Voet J. G., 2004. *Biochemistry*, 3rd Edition Wiely and Sons, Hoboken, N. J.
- Wang L., Folsom A. R., Eckfeldt J. H., 2003. Plasma fatty acid composition and incidence of coronary hearth diseases in middle aged adults: Atherosclerosis Risk in Communities (ARCI) Study. *Nutrition Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 13, 256-266.

- Wang S. P., Hsu M. L., Hsu H. C., Tzeng S. S., Lee S. S., Shiao M. S., Ho C. R., 1997. The antitumor effect of *Ganoderma lucidum* is mediated by cytokines released from activated macrophages and T-lymphocytes. *International Journal of Cancer*, 70, 669-705.
- Wang Y., Yu J.L., Mi K.R.M., 2002. Study on beneficial effects of *Fomes officinalis* Ames (FOA) in Xinjiang. *J Xinjiang Agricultural University*, 25, 40–41.
- Wasser S. P. and Weis A. L., 1999. Medicinal properties of substances occurring in higher Basidiomycetes mushrooms: current perspective (Review). *International Journal of Medicinal Mushroom*, 1, 31-62.
- Wermer A. R. and Beelman R. B., 2002. Growing high-selenium edible and medicinal button mushrooms (*Agricus bisporus* (J. Lge) Imbach) as ingredients for functional foods or dietary supplements. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 4, 167-171.
- Wilard T., 1990. *Reishi Mushroom: Herb of Spiritual Potency and Medical Wonder*. Sylvan Press. Washington
- Williams R. J., Spencer J. P., Rice-Evans C., 2004. Flavonoids: antioxidants or signalling molecules?. *Free Radical Biology & Medicine*, 36, 838–49.
- Yamamoto Y., 1997. Immunopotentiating activity of the water-soluble lignin rich fractions prepared from LEM, the extract of the solid culture medium of *Lentinus edodes* mycelia. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 61, 1909-1912.
- Yen G. C., Hung C. Y., 2000. Effects of alkaline and heat treatment on antioxidative activity and total phenolics of extracts from Hsian-tsao. *Food Research International*, 33, 487-492.
- Yilmaz N., Solmaz M., Turkeklu I., Elmastas M., 2006. Fatty acid composition in some wild edible mushrooms growing in the middle Black Sea region in Turkey. *Food Chemistry*, 99, 168-174.
- Yin D. H., Tang X. M., 1995. Progress of cultivation research of *Cordyceps sinensis*. *Chinese Journal of Chinese Materia Medica*, 20, 707.
- Yue D. C., Feng X. Z., Liu H. Y., Bao T. T., 1995. in: Song Z. Y. (Ed), *Advance Study for Traditional Chinese Herbal Medicine*, VOL.1, Beijing, Medicinal University and China Peking Union Medical University Press, Beijing, 91-113.
- Zago M., Oteiza P., 2001. The antioxidant properties of zinc: Interactions with iron and antioxidants. *Free Radical Biology Medicine*, 31, 266-274.
- Zeković Z., 1998. Ekstrakcija timijana (*Thymus vulgaris* L.) superkričnim ugljendioksidom. Doktorska disertacija. Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet.

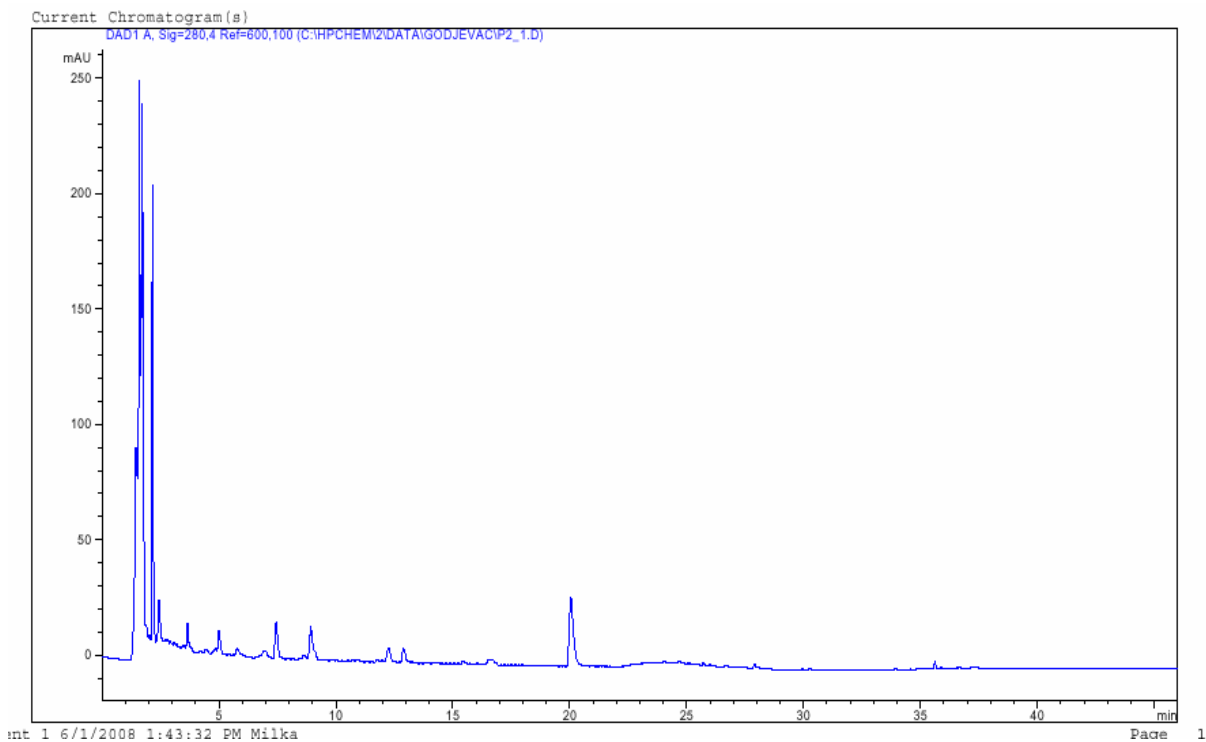
- Zhao L., Zhao G., Du M., Zhao Z., Xiao L., Hu X., 2008. Effect of selenium on increase free radical scavenging activities of polysaccharide extracts from a Se-enriched mushroom species of Genus *Ganoderma*. *European Food Research and Technology*, 226, 499-505.
- Zhuang C., Mizuno T., 1999. Biological response from *Grifola frondosa* (Dick:Fr) S. F. Gray-Maitake (Aphyllorphomycetideae). *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 1, 317-324.
- Zicha J., Kunes J., Devynck M. A., 1999. Abnormalities of membrane function and lipid metabolism in hypertension. *American Journal on Hypertension*, 12, 315–331.
- Živković J., Mujić I., Zeković Z., Vidović S., Mujić A., 2008. Capacity of extracts of sweet chestnut concerning to remove lipid peroxidation. *Journal of Central European Agriculture*, 2, 353-362,
- Živković, 2009. Farmakološki aktivne supstance kestena (*Castanea sativa* Mill.). Doktorska disertacija, Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet.
- Zjawiony J. K., 2004. Biologically Active Compounds from Aphyllorphorales (Polypore) Fungi. *Journal of Natural Products*, 67, 300-310.
- Zolotarev Y. A., Dadayan A. K., Borisov Y. A., Myasoedov N. F., 2005. Isotope Effects in the UV Spectra of [³H] Tryptophan. *Doklady Physical Chemistry*, 400, 15-18

7. PRILOG

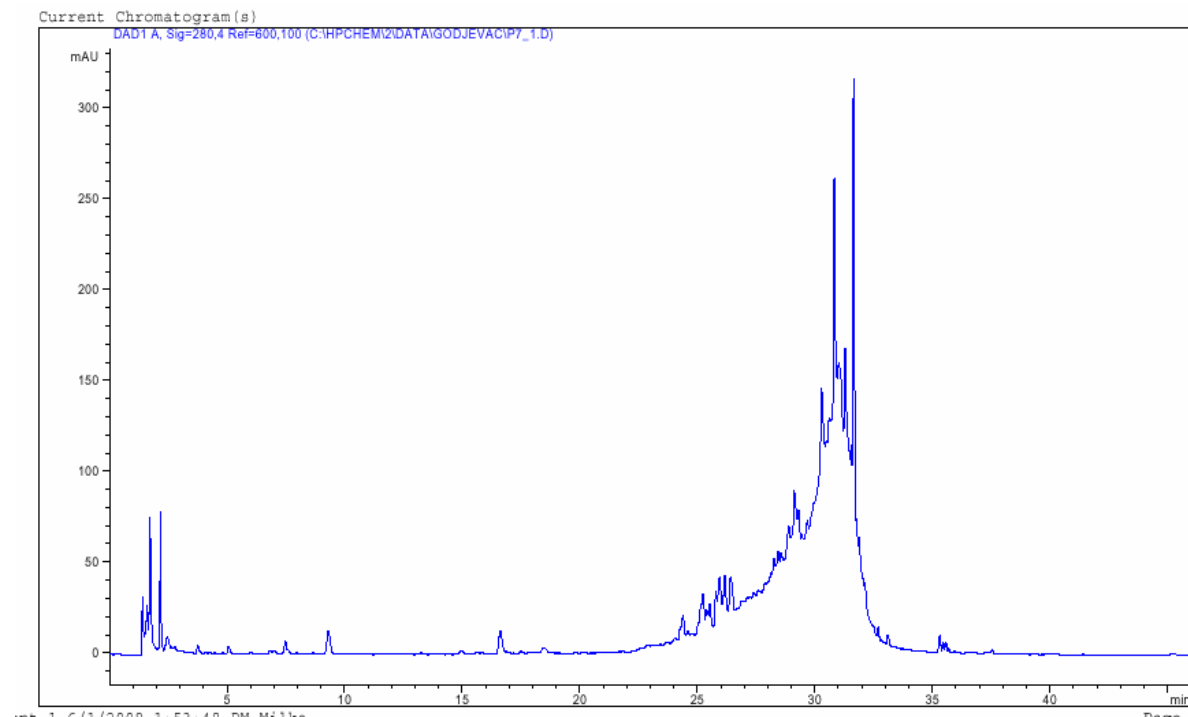
7.1. HPLC/DAD HROMATOGRAMI EKSTRAKATA PEČURAKA



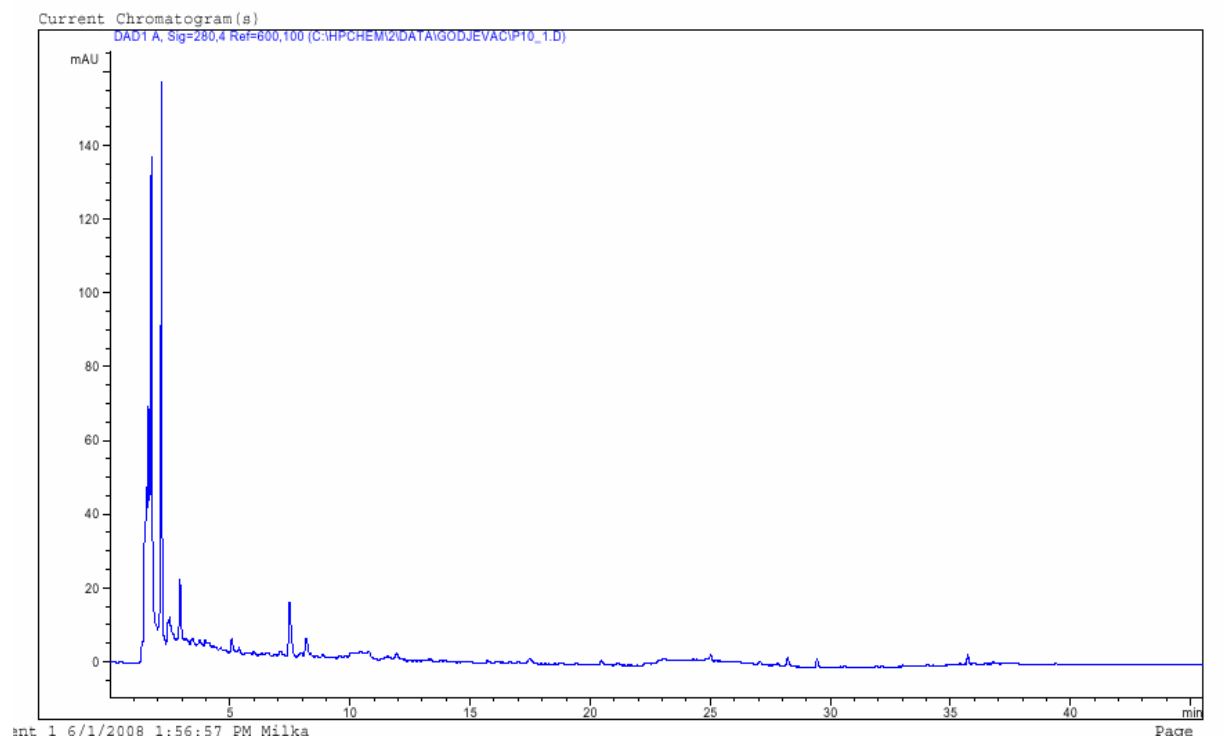
Slika P1.a. HPLC/DAD hromatogram za suvi ekstrakta pečurke *A. mellea*



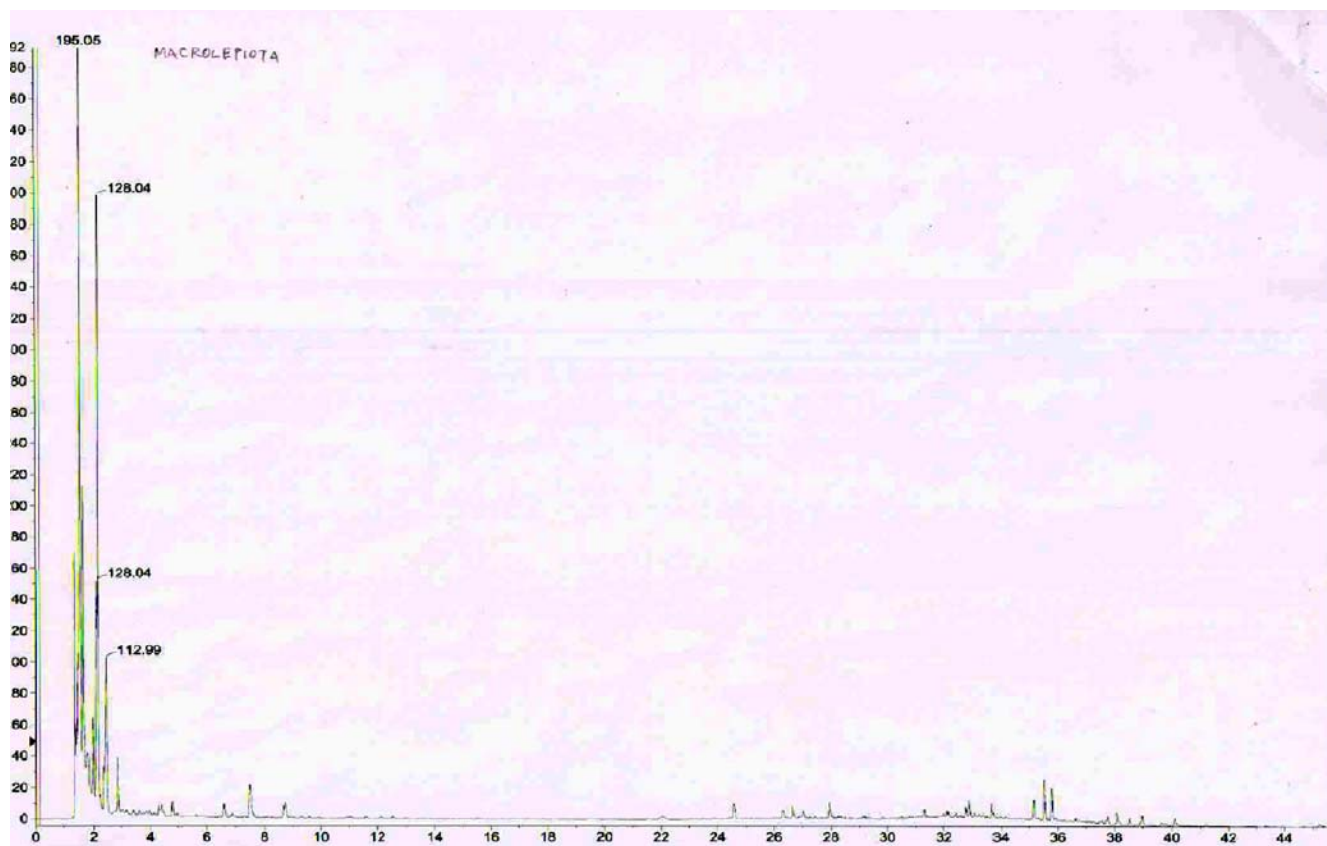
Slika P1.b. HPLC/DAD hromatogram za suvi ekstrakta pečurke *B. edulis*



Slika P1.c. HPLC/DAD hromatogram za suvi ekstrakta pečurke *D. confragosa*

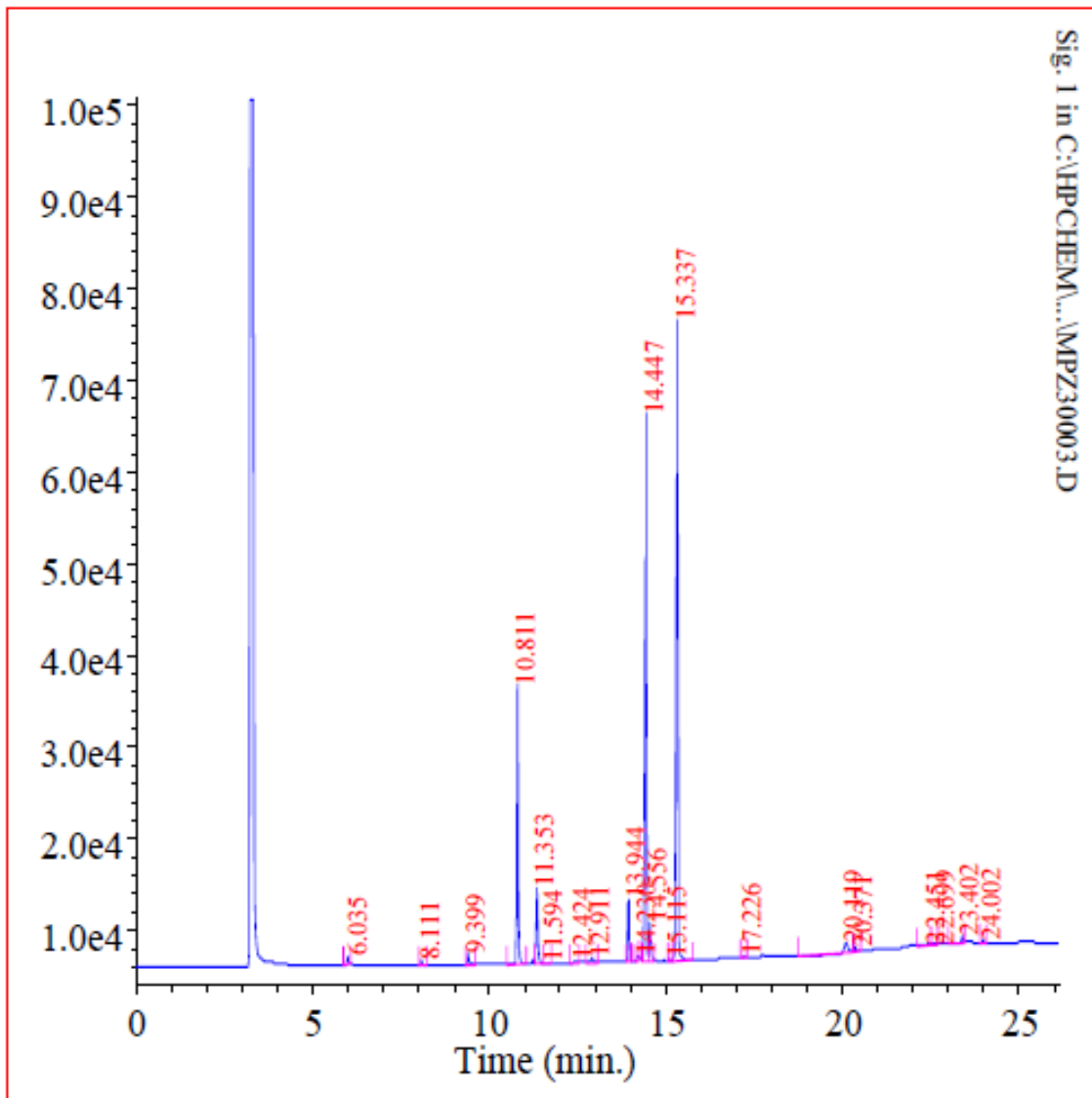


Slika P1.d. HPLC/DAD hromatogram za suvi ekstrakta pečurke *L. saccatum*

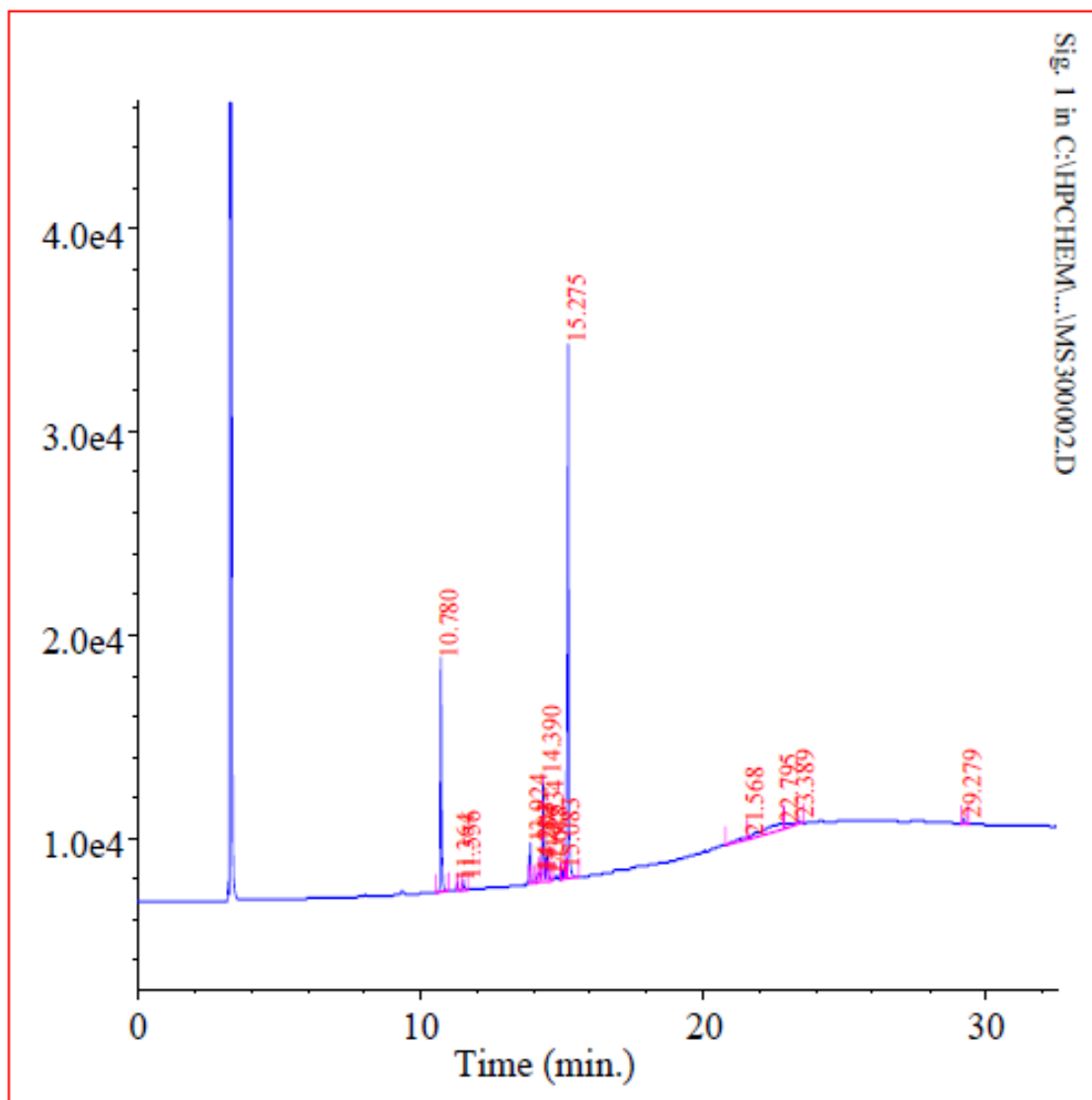


Slika P1.e. HPLC/DAD hromatogram za suvi ekstrakta pečurke *M. procera*

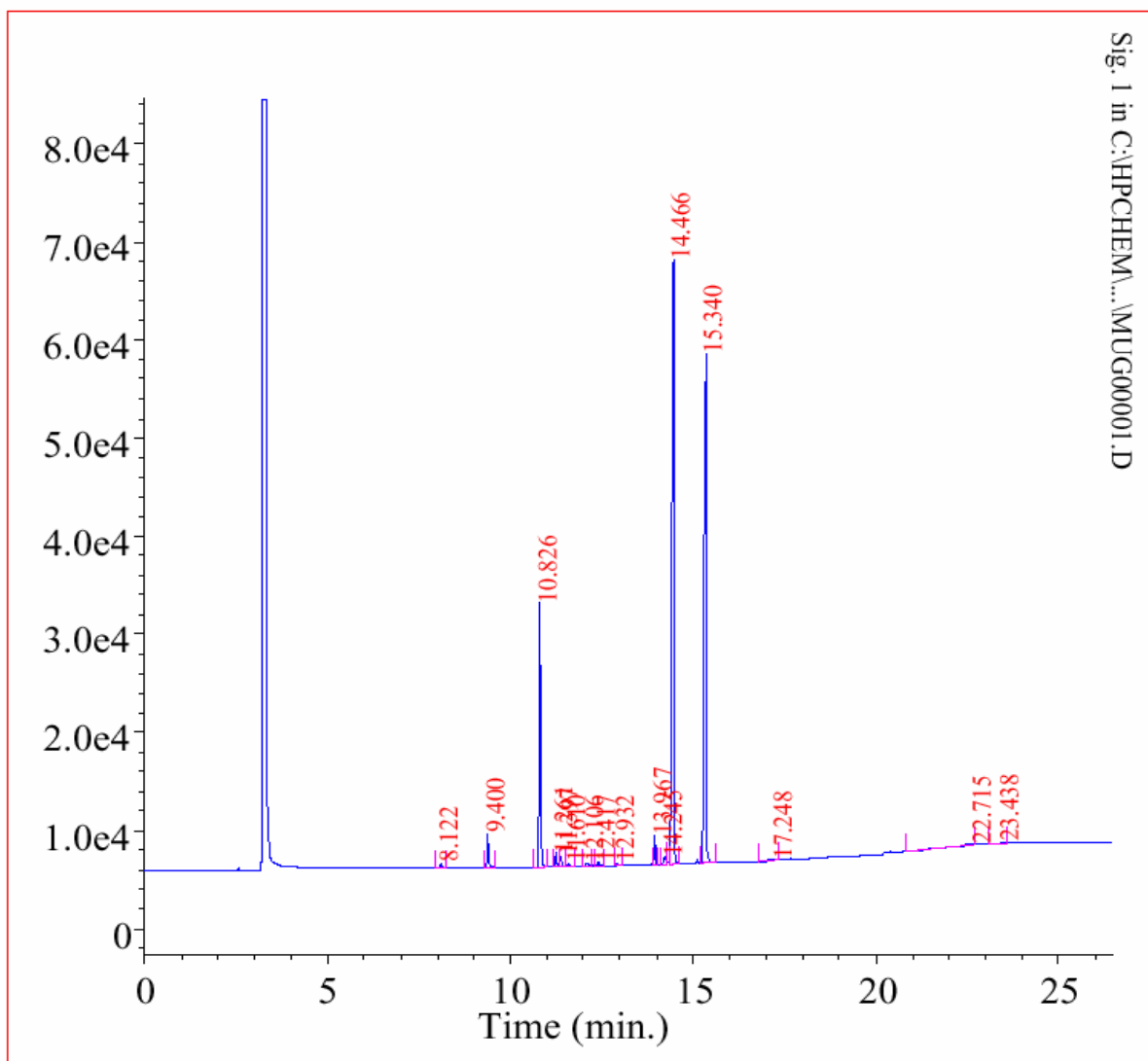
7.2. GC/MS HROMATOGRAMI SUPERKRITIČNIH EKSTRAKATA PEČURAKA



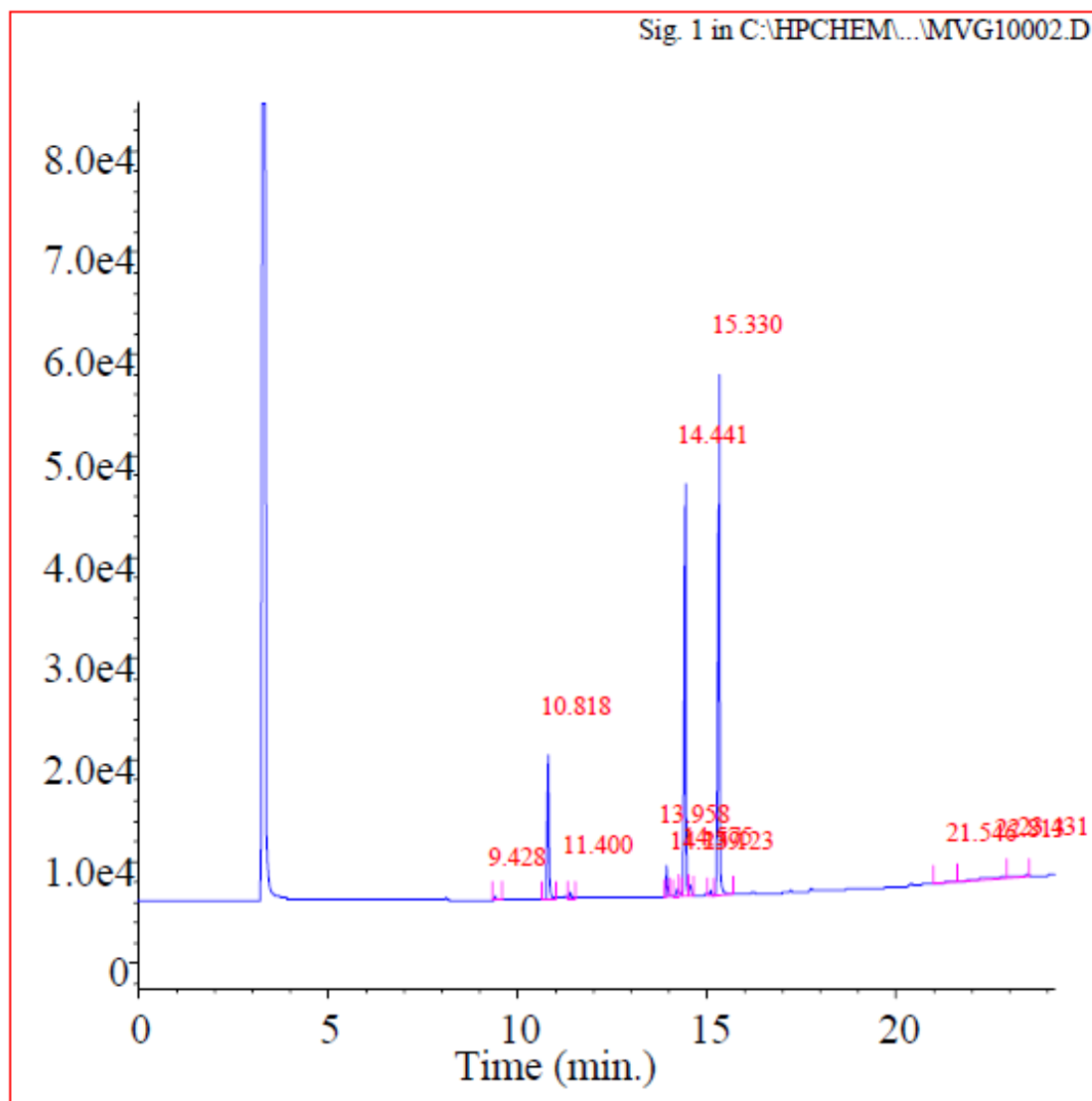
Slika P2.a. GC/MS hromatogram za superkritični ekstrakt pečurke *A. mellea*



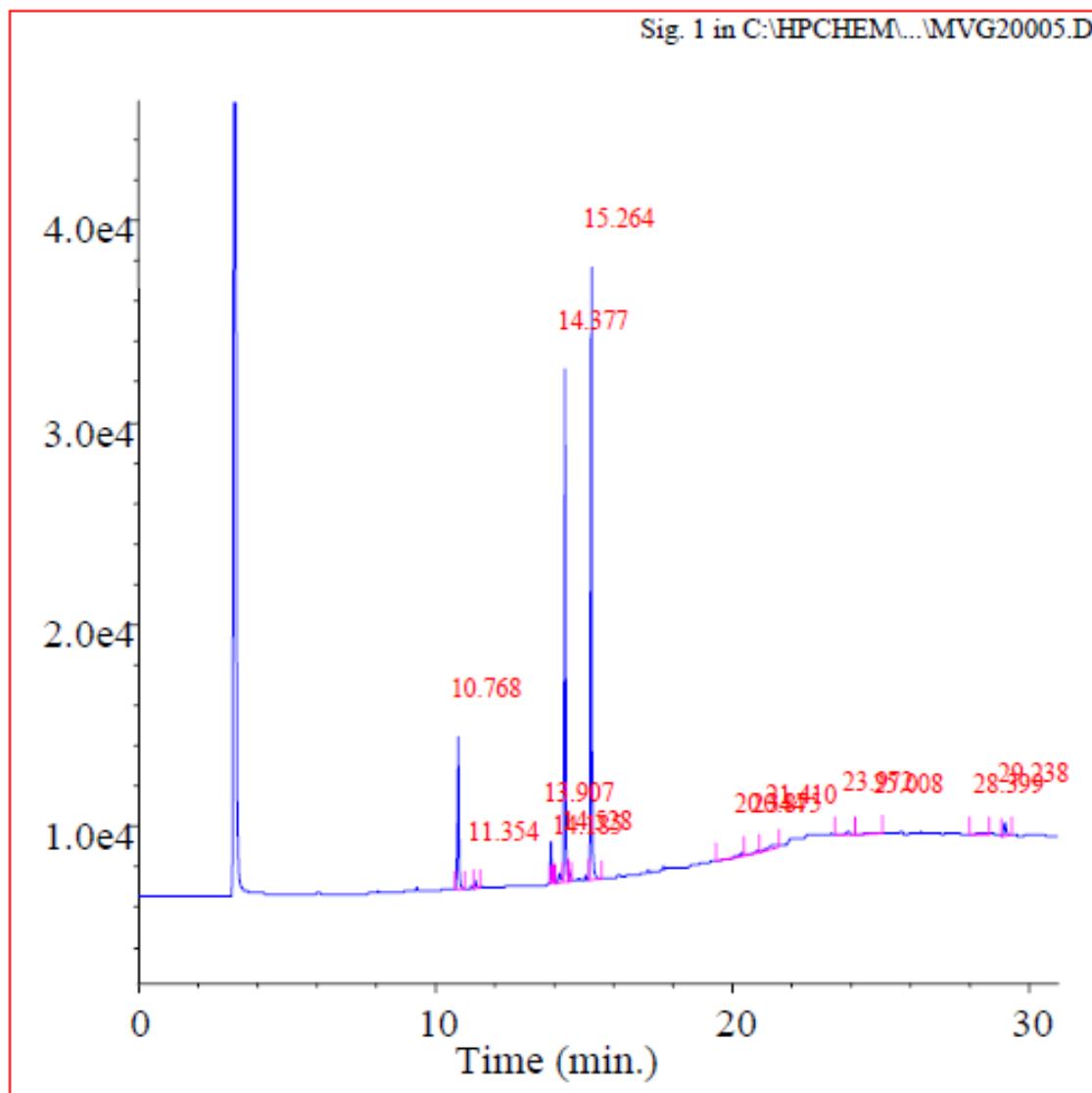
Slika P2.b. GC/MS hromatogram za superkritični ekstrakt pečurke *M. proserpina*



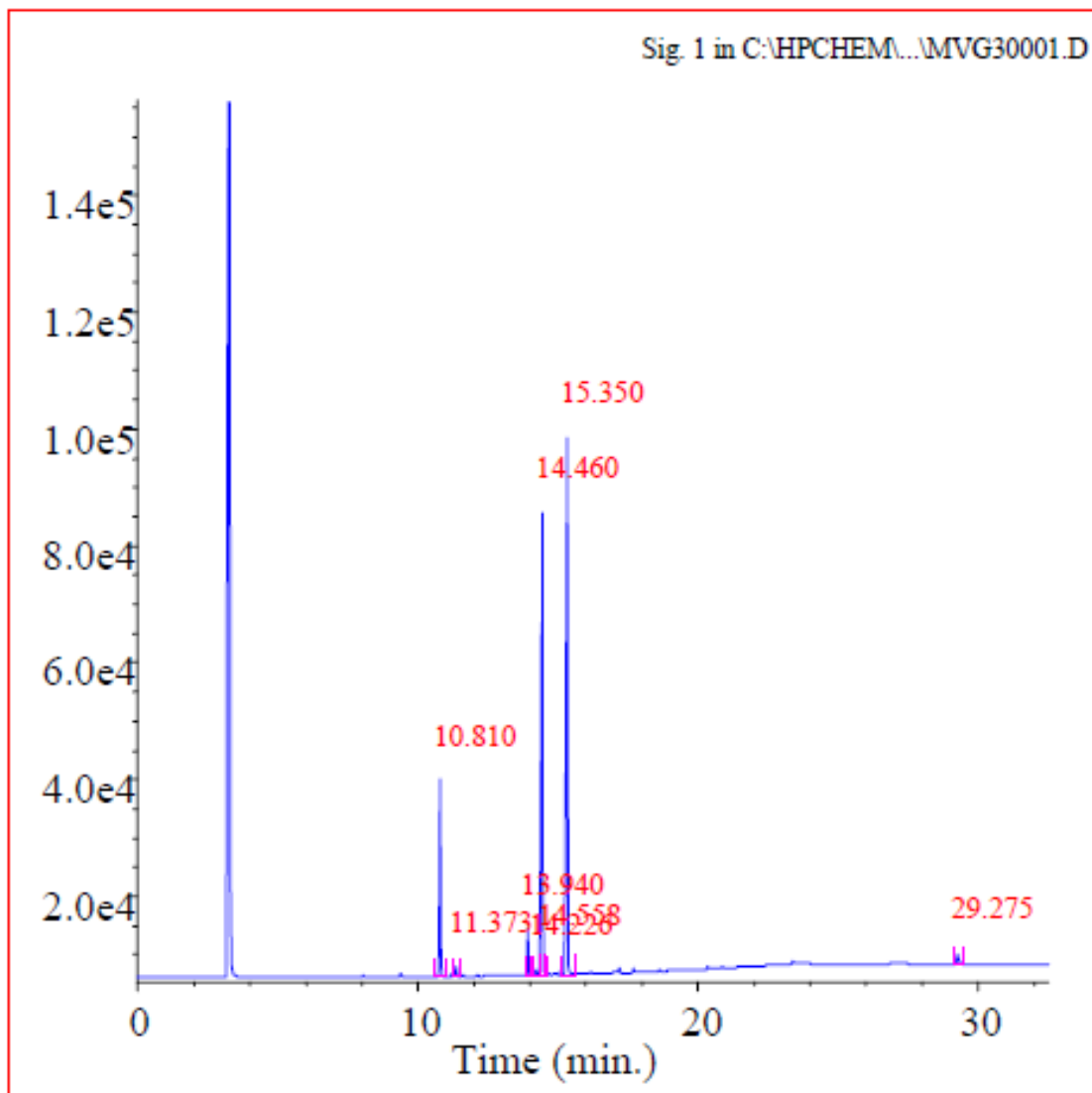
Slika P2.c. GC/MS hromatogram za superkritični ekstrakt pečurke *C. pisitllaris*



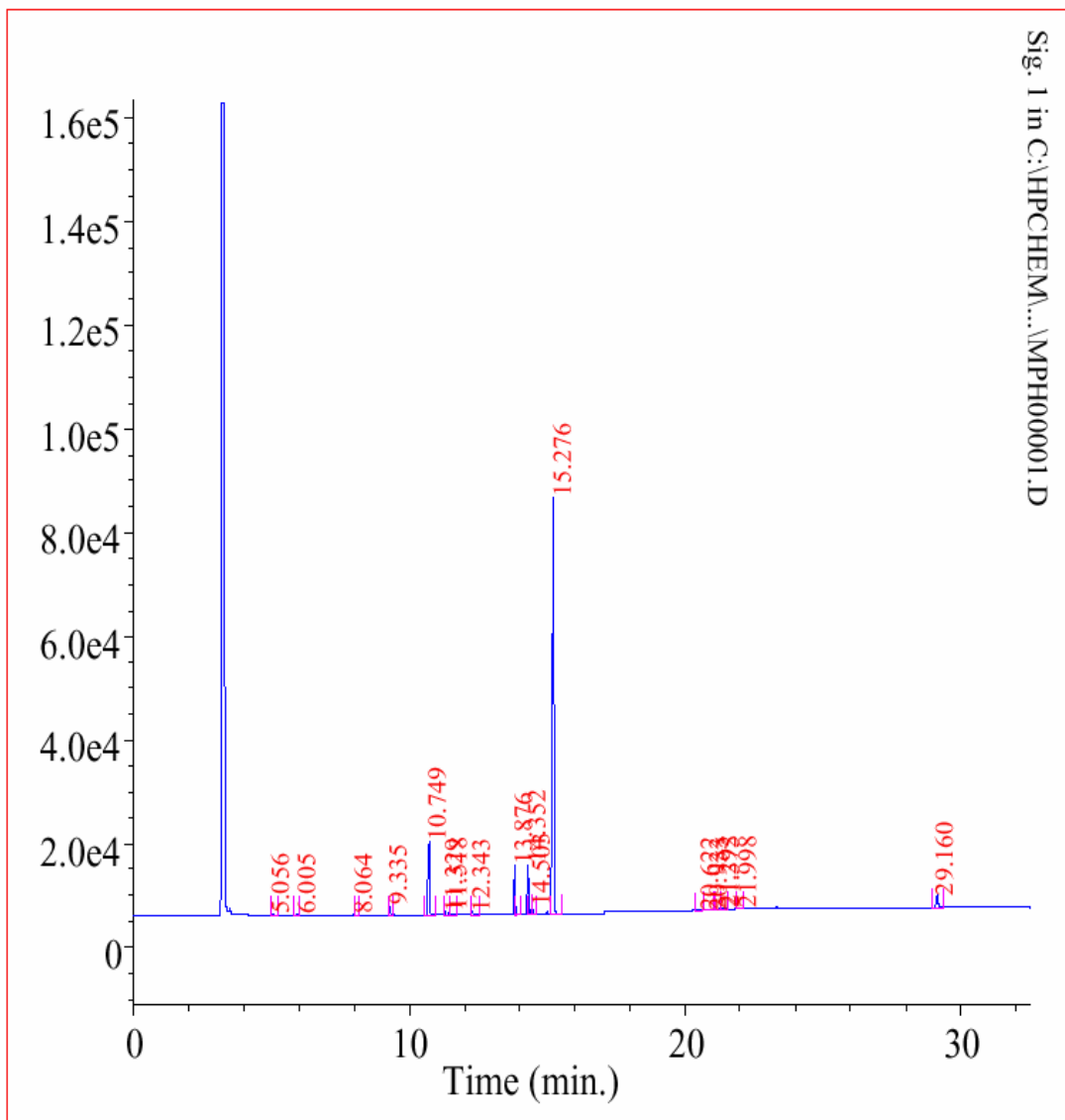
Slika P2.d. GC/MS hromatogram za superkritični ekstrakt pečurke *B. edulis* dobijen primenom pritiska od 100 bar



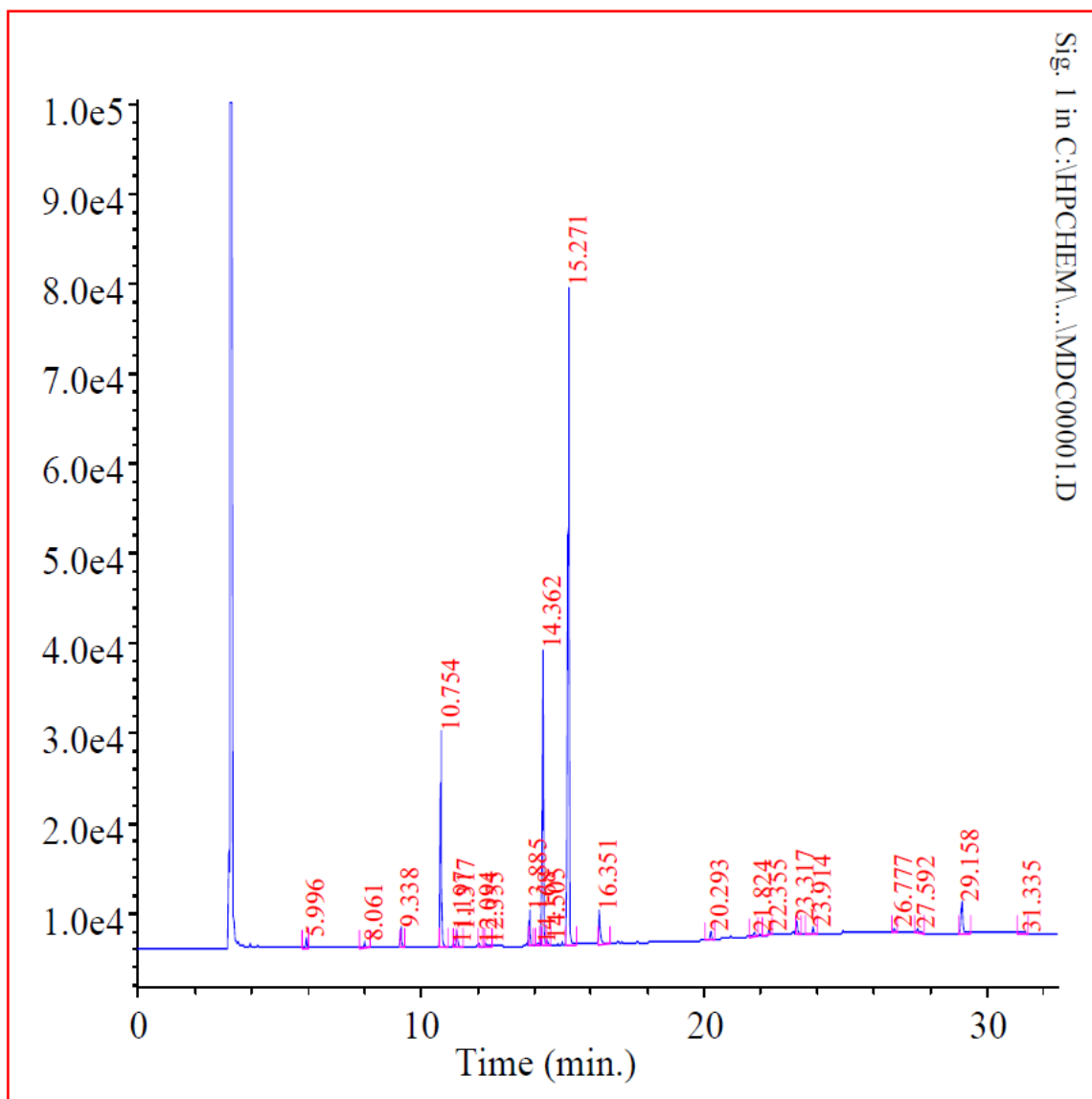
Slika P2.e. GC/MS hromatogram za superkritični ekstrakt pečurke *B. edulis* dobijen primenom pritiska od 200 bar



Slika P2.f. GC/MS hromatogram za superkrični ekstrakt pečurke *B. edulis* dobijen primenom pritiska od 300 bar



Slika P2.g. GC/MS hromatogram za superkritični ekstrakt pečurke *L. saccatum*



Slika P2.h. GC/MS hromatogram za superkrični ekstrakt pečurke *D. confragosa*