



Istraživački rad za natjecanje iz biologije

ožujak, 2014.

Viktorija Jurić, 4. razred

Mentor:
DUŠICA DORČIĆ

Ganoderma lucidum – ljekoviti potencijal

Gimnazija i strukovna škola Jurja Dobrile, Pazin

Šetalište Pazinske gimnazije 11

ravnatelj@gssjd.hr

052 / 624 - 017

Istarska

Pregledano



Agencija za odgoj i obrazovanje



Istraživački rad za natjecanje iz biologije

ožujak, 2014.

4. razred

Ganoderma lucidum – ljekoviti potencijal



Agencija za odgoj i obrazovanje

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. OBRAZLOŽENJE TEME.....	3
2.1. Plan istraživanja	
2.1.1. Područje istraživanja	
2.1.2. Eksperimentalni dio	
3. MATERIJAL I METODE RADA.....	6
3.1. Područje istraživanja	
3.2. Eksperimentalni dio	
3.2.1. Ekstrakcija fenolnih spojeva	
3.2.2. Određivanje ukupnih fenolnih spojeva	
3.2.3. Analiza uzorka MALDI-TOF/TOF tehnikom	
4. REZULTATI.....	10
5. RASPRAVA.....	12
5.1. Fenolni spojevi u ekstraktima <i>G.lucidum</i>	
5.2. Vitamini u ekstraktima <i>G.lucidum</i>	
5.3. Brojnost, učestalost i pojavnost <i>G.lucidum</i>	
6. ZAKLJUČCI.....	14
7. SAŽETAK.....	155
8. POPIS LITERATURE.....	166

1. UVOD

Danas se u farmaceutskoj industriji velika pažnja poklanja ljekovitim svojstvima podrijetlom iz prirode. Milijuni ljudi okreću se alternativnim metodama prevencije opakih bolesti, primjerice raka. Rak je naziv koji se koristi za široku skupinu malignih bolesti koje karakterizira nekontrolirana dioba stanica. Unatoč velikom napretku u tehnologiji, rak je i dalje glavni uzročnik smrti u svijetu (WHO, 2008). Potraga za lijekom na pozornicu biljnog svijeta dovodi stotine biljnih vrsta uključujući i gljive koje se podvrgavaju dodatnim istraživanjima. Rezultat je postignut – kod brojnih vrsta gljiva otkrivene su tisuće bioaktivnih molekula s antitumorskim djelovanjem, uključujući i vrstu *Ganoderma lucidum* ili Hrastovu sjajnicu. (Wasser i Weis, 1999; Borchers i sur., 2008)

G. lucidum gljiva je stapčarka porodice *Ganodermataceae*. U prirodi se pojavljuje u šest boja, a najčešće dolazi u crvenoj. Klobuci su u mladosti žuti, no kasnije postepeno poprimaju crvenosmeđu, crvenoljubičastu ili zagasito ljubičastu boju. Veličine su od 40 (30) do 100 (200) mm i debljine od 5 do 20 mm. Odrvenjela stapka promjera je od 5 do 25 mm, a dužine preko 190 mm. Nalazimo je na deblu listopadnog drveća, osobito na trulim panjevima obraslim bršljanom te rjeđe na crnogorici u umjerenim i suptropskim područjima Europe, Azije, Sjeverne i Južne Amerike.

G. lucidum je dobar izvor bioaktivnih sastojaka poput antioksidansa fenola, karotenoida, flavonoida, askorbinske kiseline pri čemu su fenolni spojevi količinski najzastupljeniji. Osim toga, pronađene su i značajne količine nezasićenih masnih kiselina (Barros i sur., 2008; Manzi i sur., 2004). Fenolnim spojevima se pripisuju antioksidativna, antimikrobna, antiseptička, protuupalna i druga svojstva. Od ugljikohidrata sadrži 100 tipova polisaharida među kojima je β (1,3)-glukuronoglukan kojem se pripisuje jako antitumorno djelovanje. Za razliku od konvencionalnih antitumornih lijekova, ovi sastojci djeluju na način da aktiviraju različite imunološke odgovore u domaćinu i ne uzrokuju nikakva sustavna oštećenja organizma (Zhanga i sur., 2007). Aktivne tvari iz *G. lucidum*, osim antitumornog djelovanja imaju i dodatne korisne efekte: olakšavaju podnošenje kirurških zahvata i ubrzavaju oporavak te olakšavaju podnošenje kemoterapije i sprečavaju njihove nuspojave. Elementarna analiza *G. lucidum* otkrila je da sadrži

fosfor, silikate, sumpor, kalij, kalcij i magnezij kao glavne mineralne komponente. Željezo, bakar, mangan i stroncij također su nađeni u manjim količinama. Među vitaminima, koji imaju važnu ulogu u biokemijskim procesima, naročito su značajni vitamini B-kompleksa: tiamin (B1), pantotenska kiselina (B5), pirodoksini (B6), cijanokobalamin (B12). Vitamin B5 – Pantotenska kiselina: važna za niz bitnih metaboličkih uloga u ljudskom tijelu, uključujući pomoć u proizvodnji hormona. Nalazimo je prirodno u gljivama. Prema jednom istraživanju utvrđeno je da *G. lucidum* sadrži 1.8% pepela, 26-28% ugljikohidrata, 3-5% neprerađenih masti, 59% neprerađenih vlakana te, 7-8% neprerađenih bjelančevina i širok spektar bioaktivnih molekula poput terpenoida, steroida, nukleotida i njihovih derivata, glikoproteina.

Zdravstvena vrijednost gljive *G. lucidum* potvrđena je brojnim znanstvenim istraživanjima, a poznato je kako se iste upotrebljavaju u tradicionalnoj kineskoj medicini preko 2000 godina. Prvi put je zabilježena u kineskom gljivarskom priručniku (*Shen Nong Ben Cao Jing*) nastalom za vladavine dinastije Han gdje je *G. lucidum* opisana kao najljekovitija gljiva i najbolje rješenje za razne bolesti. Zbog toga je u Koreji dobila naziv *Boolorcho*, to jest *besmrtna biljka*, u Kini *Ling chi* (*gljiva drveta života*), a Japanci je još nazivaju *Reishi*, *Mannentake* i *Sawaitake* (*božanstvo*, *10 000 godina* i *gljiva dobre sreće*). Vjerovalo se da samo njeno posjedovanje produljuje životni vijek te je stoga bila jako cijenjena i dostupna samo bogatim plemićima i kraljevima. Zbog izuzetno žilavog mesa nije jestiva, no njen je ljekovit potencijal prepoznat diljem svijeta. Moderna farmakologija sve se više bavi istraživanjem ljekovitih svojstva *G. lucidum*. Begović (2014) navodi da *G. lucidum* ima najveći farmaceutski potencijal na svijetu.

G. lucidum možemo naći u obliku kapsula, praha ili u drugim oblicima, primjerice tinkturi. Preporučena preventivna doza je 0.5 g do 1 g suhe gljive dnevno, a kod kemoterapije i zračenja preporučuje se kao dodatni lijek uzimati od 0.4 g do 2.4 g suhe mase dnevno.

2. OBRAZLOŽENJE TEME

U azijskim zemljama, a posebice u Kini i Japanu, *G. lucidum* ima dugu povijest konzumiranja jer je prirodan izvor korisnih bioaktivnih molekula koje pomažu u zaštiti našeg organizma. U Hrvatskoj se tek nedavno počela koristiti. Naime, obitelj Čaplinskij, koja živi u okolici Buzeta, bavi se njezinom proizvodnjom (sl. 2 i sl. 3). Nakon dugogodišnjeg proučavanja Čaplinskiji su uspjeli proizvesti micelij gljive i uzgojiti je na poznatom istarskom hrastu, odnosno hrastovoj strugotini. Nakon što sam posjetila njihov laboratoriji, potreba za daljnjim istraživanjem *G. lucidum* pokazala se jednostavno prirodnom. Procjenjuje se da je globalni prihod od njene proizvodnje otprilike 2.16 milijuna dolara (Lai i sur., 2004). Zašto upravo *G. lucidum*, u čemu je tajna njene iznimne ljekovitosti?

U dosadašnjim istraživanjima dokazano je da sadrži više od 100 tipova polisaharida i 130 triterpena, fenolnih spojeva i vitamina (Gao i sur., 2004). Važnost i uloga fenolnih spojeva neiscrpna su tema brojnih istraživanja koja su počela prije više od 50 godina, a koja se provode i danas, a potvrdila su pozitivne učinke na ljudsko zdravlje (Yi i sur., 2005) Oni mogu pozitivno sinergistički djelovati s polisaharidima, te tako utjecati na prevenciju nastanka tumora učincima poput povećanja antioksidativnog kapaciteta, regulacijom aktivnosti enzima koji sudjeluju u procesima transformacije i detoksikacije mutagenih tvari, izravnog citotoksičnog djelovanja na stanice tumora ili sudjelovanjem u regulaciji drugih mehanizama u procesu supresije tumora (Borchers i sur., 2004).

Ekstrakti gljiva bili bi puno učinkovitiji u terapiji tumorskih i drugih oboljenja jer bi se učinak polisaharida pojačao sinergističkim djelovanjem drugih tvari poput antioksidanasa te tvari sa baktericidnim, antivirusnim, fungicidnim i sličnim učincima. Tijekom istraživanja koje je proveo Hasnat sa suradnicima (2013.) određena je ukupna količina fenola u reakciji s FC reagensom kod uzorka *G. lucidum* koja je uzgojena na smeđoj riži.

2.1. Plan istraživanja

2.1. 1. Područje istraživanja

Područje istraživanja tijekom 2012./2013. godine obuhvaća najznačajnije šumske zajednice koje se pojavljuju na istarskom poluotoku (šume hrasta medunca i crnog

graba, hrasta crnike i crnog jasena te šuma hrasta medunca i bijelog graba), radi prikupljanja uzorka.

2.1. 2. Eksperimentalni dio

- uzorke *G.lucidum* sušiti u sušioniku 48 h,
- odrediti ukupnu količinu fenola i flavonoida u ekstraktima sušene *G.lucidum*,
- MALDI-TOF/TOF tehnikom analizirati uzorke.

2.2. Cilj i pretpostavke istraživanja

Brojnost, učestalost i pojavnost gljiva ovisi o brojnim klimatskim uvjetima, stoga je pretpostavka da će veća brojnost biti na staništima s povoljnim klimatskim faktorima. Količina fenolnih spojeva u biljnim vrstama značajno ovisi o brojnim faktorima kao što su vrsta tla, ekološki i klimatski uvjeti; pretpostavka je da će veću količinu fenolnih spojeva imati oni uzorci ubrani na području u kojem je veća temperatura i manja količina padalina tijekom godine. Nadalje, MALDI-TOF/TOF tehnikom odrediti vitamine koji se nalaze u Hrastovoj sjajnici.

Cilj ovog rada bio je odrediti količinu ukupnih fenola i flavonoida u ekstraktima sušene *G.lucidum* s različitih područja istarskog poluotoka, te usporediti kojim se otapalom postiže bolja ekstrakcija (96%-tnom vodenom otopinom etanola ili s metanolom). Dobivene rezultate usporediti s navedenim istraživanjem. Nadalje, trebalo je odrediti vitamine koji se nalaze u *G.lucidum* MALDI-TOF/TOF tehnikom. Ukupni fenoli određeni su spektrofotometrijski po djelomično modificiranoj metodi Singleton i Rossi (1965.), a ukupni flavonoidi u ekstraktima određivani su metodom po Parku i sur. (1997.). Osim eksperimentalnog dijela istraživanja na području istarskog poluotoka, prikupljeni su i uzorci u najznačajnijim šumskim zajednicama koje se tamo pojavljuju. Čine ih šuma hrasta crnike i crnog jasena, šuma hrasta medunca i bijelog graba te šuma hrasta medunca i crnoga graba. Cilj je dokazati dostupnost, brojnost i prisutnost *G. lucidum* na trima karakterističnim staništima istarskog poluotoka.



Slika 1 *Ganoderma lucidum*



Slika 2 i 3 *Ganoderma lucidum* na hrastovoj strugotini

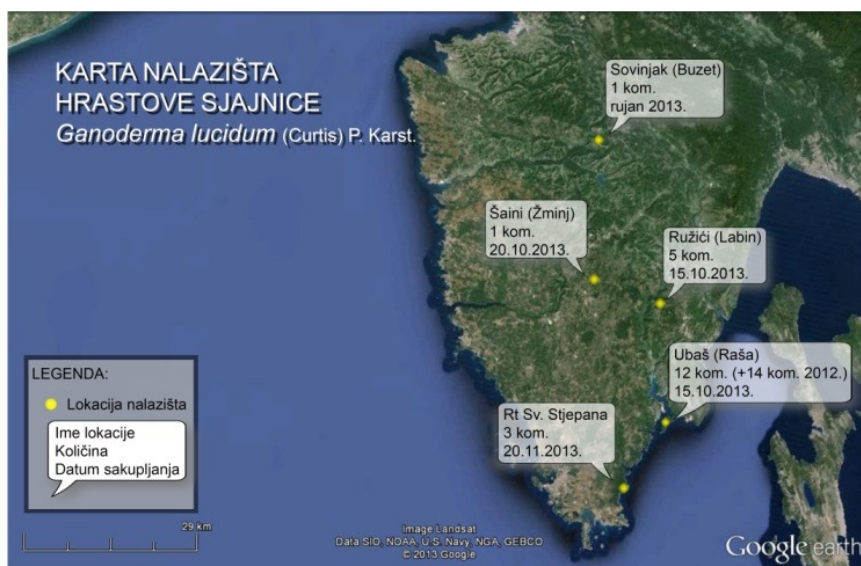
Tablica 1 Klasifikacija Hrastove sjajnice

TAKSONOMIJA	
CARSTVO	<i>Fungi</i>
KOLJENO	<i>Basidiomycota</i>
POTKOLJENO	<i>Agaricomycotina</i>
RAZRED	<i>Agaricomycetes</i>
RED	<i>Polyporales</i>
PORODICA	<i>Ganodermataceae.</i>
ROD	<i>Ganoderma</i>
VRSTA	<i>Ganoderma lucidum</i>

3. MATERIJAL I METODE RADA

3.1. Područje istraživanja

Uzorci gljive *G.lucidum* su prikupljeni s više lokacija na području Istre tijekom listopada 2012. godine te rujna i listopada 2013. godine. Te lokacije su najznačajnije šumske zajednice koje se nalaze na istarskom poluotoku. U južnom i jugozapadnom dijelu na luvisolu nalazi se šuma hrasta crnike i crnog jasena (*Fraxino orni-Quercetum ilicis*), a dio je litoralno-mediteranskog vegetacijskog pojasa u uvjetima umjereno tople vlažne klime s vrućim ljetom (Cfa po Köppenu). U središnjem dijelu je šuma hrasta medunca i bijelog graba (*Quercu-Carpinetum orientalis*) koja raste na crvenici (terra rossa), povrh vapnenca u uvjetima umjereno tople vlažne klime s toplim ljetom (Cfb po Köppenu). Uzorci su uzeti i u šumi hrasta medunca i crnoga graba (*Ostryo-Quercetum pubescentis*), u sjevernoj Istri na euteričnom smeđem tlu u uvjetima umjereno tople vlažne klime s toplim ljetom (Cfb po Köppenu). Uzorci su prikupljeni na Rtu Sv. Stjepana, Ubašu, Ružićima (Labin), Šainima (Žminj) te Sovinjaku (Buzet). Na slici 4 je karta nalazišta *G.lucidum* na području Istre. Uzorci pronađeni u Ubašu kod Raše, Ružićima, Šainima i na Rtu Sv. Stjepana korišteni su u eksperimentalnom dijelu istraživanja.



Slika 4 Karta nalazišta hrastove sjajnice na području Istre



Slika 5 Sušionik u kojem su sušeni prikupljeni uzorci *G.lucidum*

3.2.Eksperimentalni dio

Tijekom istraživanja u ekstraktu sušene *G. lucidum* određivani su:

- Ukupni fenolni spojevi
- Ukupni flavonoidi,
- Identificiran je ion koji odgovara strukturi pantotenske kiseline (vitamina B5) MALDI-TOF/TOF tehnikom.

3.2.1.Ekstrakcija fenolnih spojeva

Prikupljeni uzorci sušeni su u sušioniku tijekom 48 sati pri temperaturi od 35 do 40 °C (Slika 5.). Osušena plodišta (3.0 g) su usitnjena do praha u laboratorijskom blenderu. Ekstrakcija je vršena u 96% etanolu i metanolu (90 mL) tijekom 72 sata, na magnetnoj miješalici. Po završetku ekstrakcije uzorci su ocijeđeni i centrifugirani na 20 °C, 3000 okretaja u minuti, 0,10 minuta, a dobiveni supernatant filtriran je kroz filter papir Whatmann br. 4. Dobiveni filtrati su uparavani pomoću vakuum uparivača (Buchi, Rotavapor, R -114). Dobivena suha masa je izmjerena i rastvorena u otapalu u kome je prethodno ekstrahirana do početne koncentracije od 1 mg / mL.

3.2.2.Određivanje ukupnih fenolnih spojeva i flavonoida

Princip određivanja ukupnih fenolnih spojeva:

Djelomično modificirana metoda po Singleton i Rossi (1965), korištena je za određivanje ukupnog sadržaja fenolnih spojeva u testiranim ekstraktima. U 200 µl

uzorka određene koncentracije dodano je 1.000 µl Follina-Ciocalteau reagensa, koji je prethodno razrijeđen s H₂O u odnosu 1:10. Nakon šest minuta inkubacije u mraku, dodano je 800 µl 7.5% Na₂CO₃, a zatim je vršena inkubacija reakcijske smjese na miješalicu (160 ok/min) tijekom dva sata. Određivanje ukupnog sadržaja fenolnih spojeva vršeno je spektrofotometrijski, na valnoj duljini od 740 nm. Galna kiselina u koncentracijama od 10, 25, 50 i 100 mikrograma/ml je korištena za konstrukciju kalibracijske krivulje. Pomoću jednadžbe kalibracijske krivulje izračunata je koncentracija ukupnih polifenola, a izražena je u mikrogramima ekvivalenata galne kiseline (GAE)/g suhe mase plodišta.

Princip određivanja ukupnih flavonoida:

Ukupan sadržaj flavonoida u ekstraktima određivan je metodom po Parku i sur. (1997). U 1000 µl uzorka, određene koncentracije, dodano je 4.1 ml 80% etanola 0,100 µl 10% Al (NO₃)₃ x 9H₂O i 100 µl 1M CH₃CO₂K. Nakon 40 minuta inkubacije na sobnoj temperaturi mjerena je apsorbanca na valnoj duljini od 415 nm. Za konstrukciju kalibracijske krivulje korišten je kvercetin u koncentracijama od 10, 25, 50 i 100 mikrograma/ml. Koncentracija flavonoida u uzorku dobivena je na temelju jednadžbe standardne krivulje i izražena je u mikrograma ekvivalenata kvercetina (QE)/g suhe mase plodišta.

3.2.3. Analiza uzorka tehnikom MALDI-TOF/TOF

Osušeni uzorci su samljeveni u praškastu masu i analizirani tehnikom MALDI-TOF/TOF (matricom pomognuta desorpcija i ionizacija laserskim zračenjem uz mjerenje vremena leta iona). Količina od 50 µl uzorka je osušeno koristeći vakuum koncentrator (Eppendorf). Dobiveni talog resuspendiran je u 10 µl vodene otopine trifloroetane kiseline (0,1%, v/v) i pročišćen tehnikom tekućinske kromatografije obrnutih faza u pipetnom nastavku (ZipTip), koristeći punilo C18 (ZipTipC18, Millipore). Spojevi koji nisu bili vezani na kolonu isprani su vodenom otopinom TFA (0,1%, v/v), nakon čega su preostali spojevi eluirani u 10 µl otopine 80% acetonitrila i 20% 0.1% trifloroetane kiseline te osušeni u vakuum koncentratoru. Prije analize spektrometrijom masa dobiveni talog nakon pročišćavanja resuspendiran je u 2 µl matrice (2,6-dihidroksiacetofenon, 5 mg/ml, otopljen u vodenoj otopini acetonitrila (50%, v/v)). 1 µl dobivene smjese je nanesen na MALDI pločicu. Spektri masa snimljeni su koristeći spektrometar masa MALDI-TOF/TOF (4800 Plus MALDI-TOF/TOF, Applied Biosystems) u pozitivnom

načinu rada instrumenta (engl. *reflectron positive ion mode*) prema slijedećim parametrima: raspon masa 50-1000 Da, fokus masa 500 Da, vrijeme zadržavanja iona 100 ns. Instrument je opremljen laserom Nd:YAG valne duljine 355 nm, pulsa 3-7 ns i frekvencije 200 Hz. Prije analize spektrometar masa je kalibriran standardima: vitamin B5, tiamin mononitrat i azitromicin. Radi mjerenja točne mase (točnost mase unutar 5 ppm) spektri masa su naknadno kalibrirani koristeći unutarnje standarde (ione matrice, kao i azitromicina koji je naknadno dodan smjesi uzorka i matrice na MALDI pločicu).

5. REZULTATI

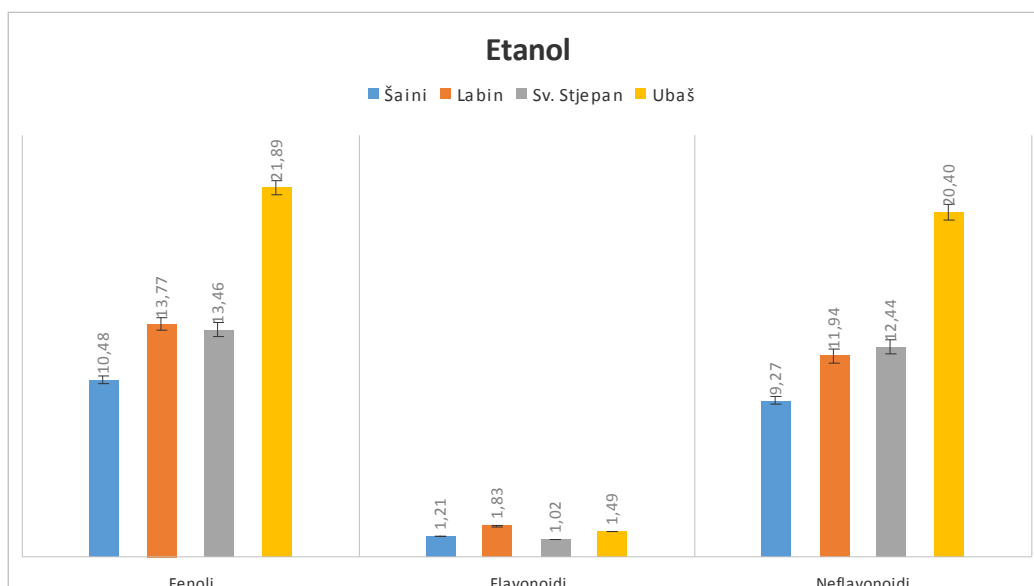
U ovom radu istraživanja su provedena na uzorcima *G.lucidum* s četiri različita područja Istre. Analizirani su uzorci iz Ubaša, Sv. Stjepana, Labina i Šaini brani sredinom listopada 2013 godine. Prilikom istraživanja određivani su ukupni fenoli i flavonoidi spektrofotometrijski na navedenim uzorcima. Prilikom ekstrakcije, korištena su dva različita otapala, 96 %-tni etanol te metanol.

Uzorci su analizirani MALDI-TOF/TOF tehnikom gdje je identificiran ion koji odgovara strukturi pantotenske kiseline (vitamina B5).

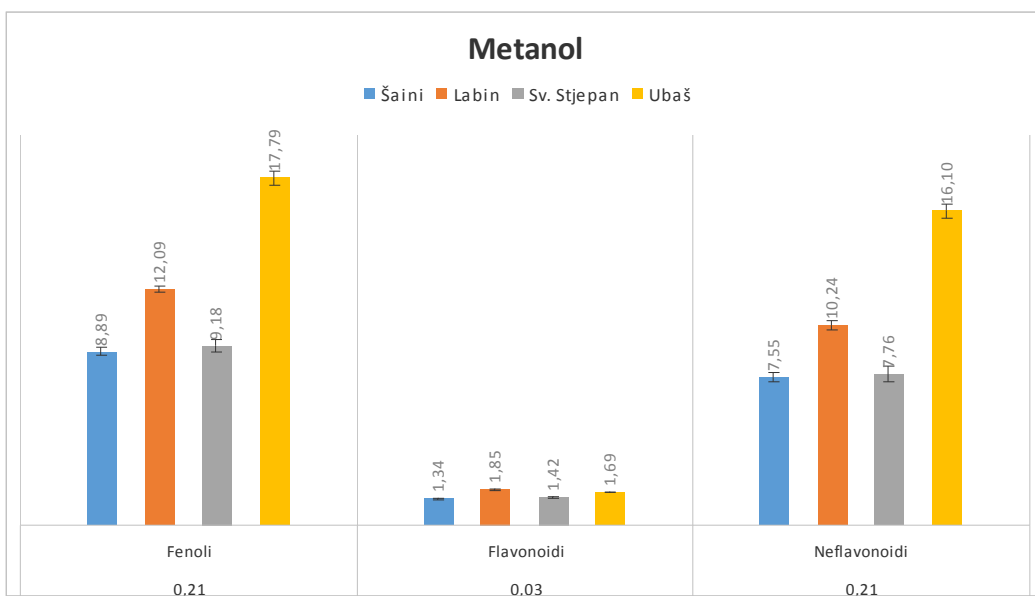
U grafu 1. prikazani su rezultati određivanja koncentracije ukupnih fenola (UF) i flavonoida (UFL) u uzorcima sušene *G. lucidum* ekstrahirani etanolnim otapalom. Iz razlike UF i UFL dobiveni su ukupni neflavonoidi. Rezultati su izraženi u miligramima ekvivalenta galne kiseline (GAE) na gram uzorka (mg GAE/ g).

U grafu 2. prikazani su rezultati određivanja koncentracije ukupnih fenola i flavonoida u uzorcima sušene *G.lucidum* ekstrahirani metanolnom otopinom. Iz razlike UF i UFL dobiveni su ukupni neflavonoidi. Rezultati su izraženi u mikrograma ekvivalenta kvercetina (QE)/g suhe mase plodišta.

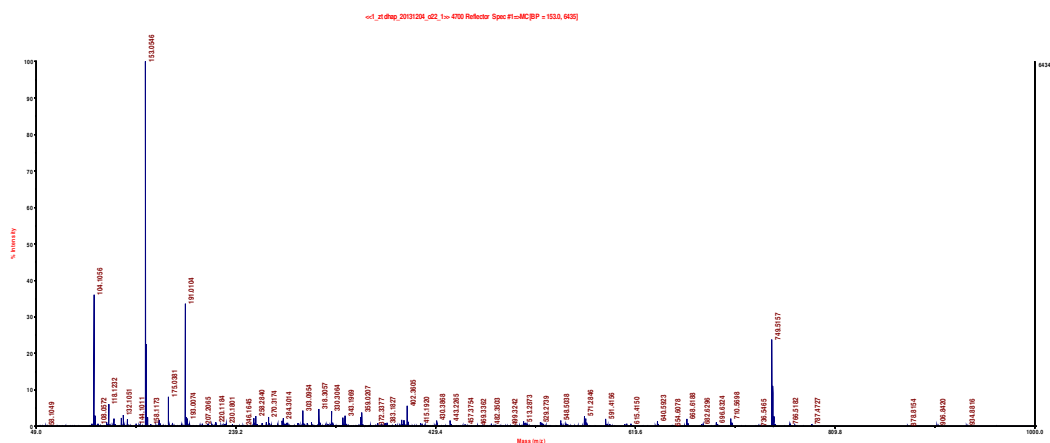
U grafu 3. prikazani su rezultati dobiveni analizom uzoraka MALDI-TOF/TOF tehnikom prilikom koje je identificiran ion koji odgovara strukturi pantotenske kiseline (vitamina B5).



Graf 1 Rezultati određivanja koncentracije ukupnih fenola (UF) i flavonoida (UFL) u uzorcima sušene *G. lucidum* s četiri različita područja Istre ekstrahirani etanolnim otapalom.



Graf 2 Rezultati određivanja koncentracije ukupnih fenola i flavonoida u uzorcima sušene *G. lucidum* s četiri različita područja ekstrahirani metanolnom otopinom.



5. RASPRAVA

U ovom radu cilj je bio usporediti koncentracije ukupnih fenola (UF), flavonoida (UFL) i neflavonoida ubranih na 4 različita područja istarskog poluotoka te MALDI-TOF/TOF tehnikom analizirati uzorke. Ekstrakcija fenolnih spojeva provedena je primjenom dvaju otapala i to: 96 % vodena otopina etanola i metanola.

5.1. Fenolni spojevi u ekstraktima *G. lucidum*

Ukupni fenoli određeni su spektrofotometrijski po djelomično modificiranoj metodi Singleton i Rossi (1965.), a ukupni flavonoidi u ekstraktima određivani su metodom po Parku i sur. (1997.). Ukupni neflavonoidi izračunati su iz razlike UF i UFL. Rezultati spektrofotometrijskog određivanja ukupnih fenolnih spojeva prikazani su u tablicama 2 i 3, a vrijednosti su izražene u mg/g suhe tvari uzorka. Dobiveni rezultati pokazuju da postoji značajna razlika između koncentracije fenolnih spojeva u uzorcima s primorskog dijela istarskog poluotoka u odnosu na uzorke s kontinentalnog dijela istarskog poluotoka.

Najviša koncentracija ukupnih fenola izmjerena je u uzorku s područja Ubaša (21.89 mg/g suhe mase), u etanolnom ekstraktu te (17.79 mg/g) u metanolnom ekstraktu. Najniža koncentracija ukupnih fenola određena je u uzorku iz Šaina (10.48 mg/g u etanolnom odnosno 8.89 mg/g u metanolnom ekstraktu). Također važno je napomenuti da u Šainima prevladavaju niže temperature i veća količina oborina nego na ostalim lokalitetima, a kako su fenoli hidrofilni više oborina znatno utječe na niže koncentracije ukupnih fenola. Stoga je količina fenolnih spojeva u Šainima dvostruko manja nego u Ubašu. U Labinu je koncentracija fenolnih spojeva 13.77 mg/g u etanolu, dok je u metanolu 12.09 mg/g. U Sv. Stjepanu je količina fenolnih spojeva 13.46 mg/g u etanolu, dok je 9.17 mg/g u metanolu. U literaturi nema dostupnih podataka o količini ukupnih fenola za hrastovu sjajnicu. Prema jednom od rijetkih istraživanja koje je proveo Hasnat i sur. (2013) određeni su različiti fenolni spojevi u Hrastovoj sjajnici koja je uzgojena na smeđoj riži. Prema prezentiranim podacima ukupni sadržaj fenolnih spojeva u ekstraktu *G.lucidum* bili su 43.14 ± 1.29 mg/g suhe tvari uzorka, a flavonoida $13,36 \pm 0,44$ mg CE po gramu suhe tvari (Hasnat i sur. 2013). Razlog tome je upravo to što je smeđa riža bogata hranjivim tvarima te tijekom klijanja

može utjecati na biokemijski sastav *G.lucidum*. Veća koncentracija fenolnih spojeva određena je u svim etanolnim ekstraktima, te se etanol pokazao kao bolje otapalo za ekstrakciju fenolnih spojeva.

Koncentracije flavonoida u uzorcima iz primorskog dijela Istre je veća nego u uzorcima s kontinentalnog područja. Najveće vrijednosti određene su u uzorcima iz Labina (1.83 mg/g u 96%-tnom etanolu odnosno 1.85 mg/g u metanolu), a najmanje u uzorcima iz Šaina (1.21 mg/g u 96%-tnom etanolu odnosno 1.34 mg/g u metanolu). Metanol se pokazao kao bolje otapalo za ekstrakciju flavonoida. Nadalje, u ukupnoj količini fenolnih spojeva prevladavaju spojevi iz skupine neflavonoida tj. fenolne kiseline i njihovi derivati.

5. 2. Vitamini u ekstraktima *G. lucidum*

MALDI-TOF/TOF tehnikom dokazana je prisutnost vitamina B5 u *G.lucidum*. Nalazimo je prirodno u gljivama, a vrlo je važna za niz bitnih metaboličkih uloga u ljudskom organizmu, uključujući pomoć u proizvodnji hormona.

5. 3. Brojnost, učestalost i pojavnost *G.lucidum*

Uzorci iz 2012. godine sakupljeni su radi procjene brojnosti i učestalosti pojavljivanja, dok su uzorci prikupljeni tijekom 2013. korišteni u eksperimentalnom dijelu istraživanja i pri procjeni pojavnosti na trima najznačajnijim šumskim zajednicama koje se pojavljuju na istarskom poluotoku. U šumi hrasta crnike i crnog jasena zabilježena je najveća pojavnost koja je čak tri puta veća nego u šumi hrasta medunca i bijelog graba. Najmanja pojavnost zabilježena je u šumi hrasta medunca i crnog graba. Razlog najveće pojavnosti u Ubašu objašnjava se velikim brojem starih panjeva koji su pogodni za njen razvitak. Način gospodarenja šumskim sastojinama tako izravno utječe na razvoj micelija i plodišta. Umjereno topla vlažna klima s vrućim ljetom pogodnija je za razvitak od umjereno tople vlažne klime s toplim ljetom u kojoj prevladavaju šume hrasta medunca s crnim ili bijelim grabom. Količina oborina svakako je jedan od najvažnijih čimbenika koji utječu na razvoj plodišta, a od ostalih klimatskih čimbenika značajna je vlažnost zraka i broj sunčanih sati.

6. ZAKLJUČCI

- Kao učinkovitije otapalo za ekstrakciju polifenola iz sušenih uzoraka pokazala se 96%-tna vodena otopina etanola, a vrijednosti ukupnih fenola u etanolnim ekstraktima određene su u rasponu koncentracija od 10.48 mg/g do 21.89 mg/g suhog uzorka.
- Najveća koncentracija fenolnih spojeva određena je u uzorku iz Ubaša, a najmanja u uzorku s područja Šaina. Uzorak iz primorskog dijela Istre sadržavao je do dva puta veću količinu ukupnih fenola u odnosu na uzorke iz kontinentalnog dijela istarskog poluotoka.
- U istraživanju je MALDI-TOF/TOF tehnikom utvrđena prisutnost vitamina B5 koji ima važnu ulogu u biokemijskim procesima u ljudskom organizmu.
- Najveća brojnost plodišta zabilježena je u šumi hrasta crnike i crnog jasena zbog povoljnih čimbenika koji utječu na razvoj te značajnog broja starih panjeva ostalih nakon proreda sastojina koji osiguravaju dobru hranjivu podlogu za uspješan razvoj micelija.
- Najmanja pojavnost zabilježena je u šumi hrasta medunca i crnog graba koji ima znatno nižu srednju godišnju temperaturu što znatno utječe na pojavnost i brojnost gljiva na nekom području.
- Uzorci gljive uzgajani na smeđoj riži sadržavali su dvostruko veću količinu fenolnih spojeva nego oni pronađeni na prirodnom staništu istarskog poluotoka.

7. SAŽETAK

G.lucidum je gljiva s dugom tradicijom korištenja u azijskim zemljama. U etanolnim i metanolnim ekstraktima sušene *G. lucidum* s četiri različita područja istarskog poluotoka (Ružići, Ubaš, Sv. Stjepan, Šaini), istraživani su ukupni fenoli, flavonoidi i neflavonoidi. Ukupni fenoli (UF) i flavonoidi (UFL) određeni su spektrofotometrijski, a ukupni neflavonoidi izračunati su iz razlike UF i UFL. Nadalje, MALDI-TOF/TOF tehnikom analizirani su uzorci *G.lucidum* iz Ubaša te je identificiran ion koji odgovara strukturi pantotenske kiseline (vitamina B5). Prema rezultatima istraživanja tlo i klimatski uvjeti značajno utječu na količinu fenolnih spojeva *G. lucidum*, a u ukupnoj količini fenola prevladavaju neflavonoidi. Na pojavnost znatno utječu klimatski čimbenici i hranjiva podloga. Najveća je pojavnost stoga zabilježena u Ubašu, a najmanja u Sovinjaku i Šainima.

8. POPIS LITERATURE

- Barros L., Cruz T., Baptista P., Estevinho L.M., Ferreira I.C.F.R. (2008) Wild and commercial mushrooms as source of nutrients and nutraceuticals. *Food and Chemical Toxicology*, 46, 2742–2747
- Borchers A.T., Keen C.L., Gershwin M.E. (2004) Mushrooms, Tumors, and Immunity: An Update. *Experimental Biology and Medicine*, 229, 393-406.
- Burić J., Hrana kao lijek, <http://www.youtube.com/watch?v=GgSqxZ26UCk> 14.3.2014.
- Hasnat A.(ur.), Acetylcholin esterase Inhibition and *in Vitro* and *in Vivo* Antioxidant Activities of *Ganoderma lucidum* Grown on Germinated Brown Rice, *Molecules*, <https://www.mdpi.com/1420-3049/18/6/6663>, Pristupljeno 31. 1. 2014.
- I. Jelić i K. Lisak: Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam 7 (1-2), 78-84 (2012)
- Manzi P., Marconi S., Aguzzi A., Pizzoferrato P. (2004)
- Martinović J. 2003. Gračar J.(ur.), *Gospodarenje šumskim tlama u Hrvatskoj, Hrvatske šume, Zagreb*
- Mau J. L, Lin H. C, Chen C. C. Non-volatile components of several medicinal mushrooms. *Food Res Int.* 2001;34:521–6.
- Park, Y.K., Koo, M.H., Ikegaki, M., Contado, J.L. (1997). Comparison of the flavonoid aglycone content of *Apis mellifera* propolis from various regions of Brazil. *Arquivos de Biologiae Technologia*, 40(1): 97-106.
- Singleton, V.L., Rossi, J.A. (1965). Colometric of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16: 144-158.
- Sissi Wachtel-Galor, *Herbal Medicine: Biomolecular and Clinical Aspects.*, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK92757/>, Pristupljeno: 23.1.2014.
- Sheena N., Lakshmi B., Janardhanan K.K. 2005. Therapeutic potential of *Ganoderma lucidum* (Fr.) P. Karst, *Natural Product Radiance*: 382-386.
- Sliva D. 2005 *Ganoderma lucidum* in cancer research, *Leukemia Research* 30: 767-768.
- Soniamol J., Baby S., Varughese G. 2011. Antitumor and anti-inflammatory activities of polysaccharides isolated from *Ganoderma lucidum*, *Acta Pharm.* 61: 335-342.

- Vukelić J., Rauš Đ., 1998., Šumarska fitocenologija i šumske zajednice u Hrvatskoj, Targa, Zagreb,
- Wasser S. P, Weis A. L. 1999., Medicinal properties of substances occurring in higher basidiomycetes mushrooms: Current perspectives. *Int J Med Mushrooms*. 1:31–62.
- WHO (World Health Organization). Mortality Statistics. 2008. World Health Report.
- Zhang M., Cui S.W., Cheung P.C.K., Wang Q. (2007) Antitumor polysaccharides from mushrooms: a review on their isolation process, structural characteristics and antitumor activity. *Trends in Food Science & Technology*, 18, 4-19.
- Yi, W.G., Fischer, J., Krewer, G., Akoh, C.C. (2005) Phenolic compounds from blueberries can inhibit colon cancer cell proliferation and induce apoptosis. *J. Agric. Food Chem.* 53, (18), 7320-7329.