



UNIVERZITET U NIŠU
PRIRODNO-MATEMATIČKI FAKULTET
DEPARTMAN ZA HEMIJU



Marija V. Dimitrijević

**Komparativno istraživanje sadržaja elemenata i
antioksidativne aktivnosti odabranih vrsta gljiva:
hemometrijski pristup**

-DOKTORSKA DISERTACIJA-

Niš, 2021.



UNIVERSITY OF NIŠ
FACULTY OF SCIENCES AND MATHEMATICS
DEPARTMENT OF CHEMISTRY



Marija V. Dimitrijević

**Comparative research of the content of elements and
antioxidant activity of selected mushroom species: a
chemometric approach**

-DOCTORAL DISSERTATION-

Niš, 2021.

Подаци о докторској дисертацији

Ментор:	др Драган Ђорђевић, редовни професор Природно-математичког факултета Универзитета у Нишу
Наслов:	Компаративно истраживање садржаја елемената и антиоксидативне активности одабраних врста гљива: хеометријски приступ
Резиме:	<p>Циљ овог рада био је компаративно истраживање садржаја елемената и антиоксидативне активности тринаест врста самониклих гљива породице Boletaceae и Russulaceae применом хеометријског приступа. Ово пре свега подразумева идентификацију и квантификацију елементног састава гљива применом ISP – OES и ISP – MS методе, као и фенолних киселина (главних носилаца антиоксидативне активности) коришћењем HPLC технике. Одређивање акумулираних макро и микро елемената у гљивама пружа информације о нутритивној вредности, а утврђивање садржаја токсичних елемената пружа информације о безбедности конзумирања гљива, што је од велике важности с обзиром да су анализирани самоникле јестиве врсте заступљене у исхрани људи. Резултати за садржај елемената у гљивама су прерачунавани на количину од 300 g свежих гљива (просечна порција) и добијене вредности су поређене са међународним регулативама о прихватљивим и препорученим дневним уносима елемената. Како је антиоксидативна активност важан елемент у процени квалитета хране, циљ је био одређивање антиоксидативне активности екстраката различите поларности применом различитих тестова (DPPH, ABTS, FRAP, TRP, CUPRAC), као и одређивања садржаја укупних фенола и флавоноида. На основу резултата који се односе на истраживања садржаја фенолних киселина, као и антиоксидативне активности применом различитих метода, испитиване врсте гљива се могу сматрати извором антиоксиданата у исхрани. Након наведених експерименталних истраживања, добијени резултати су статистички обрађени и утврђена је корелација између одређених резултата, првенствено установљена је везе између елементног састава и антиоксидативне активности. Хеометријске методе, анализа главних компоненти и кластер анализа, омогућиле су груписање узорака на основу садржаја елемената, фенолних киселина и антиоксидативне активности и утврђени су односи између анализираних компоненти.</p>
Научна област:	Хемија
Научна дисциплина:	Општа и неорганска хемија
Кључне речи:	гљиве, есенцијални макро-елементи, есенцијални микро-елементи, токсични елементи, антиоксидативна активност, фенолне киселине, ISP-OES, ISP-MS, HPLC, хеометрија, корелација, PCA и кластер анализа
УДК:	543.068 + 542.943'78] : 528.28
CERIF класификација:	P 003 i P 360 Хемија и Неорганска хемија
Тип лиценце Креативне заједнице:	CC BY-NC-ND

Data on Doctoral Dissertation

Doctoral Supervisor:	Dragan Đorđević, Ph.D., full professor, Faculty of Science and Mathematics, University of Nis
Title:	Comparative research of the content of elements and antioxidant activity of selected mushroom species: a chemometric approach
Abstract:	<p>This study aimed to compare the content of elements and antioxidant activity of thirteen species of wild mushrooms of the family Boletaceae and Russulaceae using a chemometric approach. This primarily involves identifying and quantifying the elemental composition of mushrooms using ICP - OES and ICP - MS methods and phenolic acids (the leading carriers of antioxidant activity) using HPLC technique. Determination of accumulated macro and micro elements in mushrooms provides information on nutritional value, and the determination of toxic elements provides information on the safety of mushroom consumption, which is of great importance since the analyzed species are wild and edible present in human nutrition. The obtained results for the element content in mushrooms were recalculated to the amount of 300 g of fresh mushrooms (average portion), and the obtained values were compared with the world regulations on acceptable and recommended daily intake of elements. As antioxidant activity is an important element in assessing food quality, the aim was to determine the antioxidant activity of extracts of different polarities using different tests (DPPH, ABTS, FRAP, TRP, CUPRAC), as well as to determine the content of total phenols and flavonoids. Based on the results related to research on the content of phenolic acids and antioxidant activity using various methods, the examined types of mushrooms can be considered a source of antioxidants in the diet. After the mentioned experimental research, the obtained results were statistically processed. The correlation between certain results was determined, primarily the connections between the elemental composition and antioxidant activity were established. Chemometric methods, principal components analysis, and cluster analysis enabled the grouping of samples based on element content, phenolic acids, antioxidant activity, and the determined relationships between the analyzed components.</p>
Scientific Field:	Chemistry
Scientific Discipline:	General and Inorganic Chemistry
Key Words:	mushrooms, essential macroelements, essential microelements, toxic elements, antioxidant activity, phenolic acids, ICP-OES, ICP-MS, HPLC, chemometry, correlation, PCA and cluster analysis
UDC:	543.068 + 542.943'78] : 528.28
CERIF Classification:	P 003 and P 360 Chemistry and Inorganic Chemistry
Creative Commons License Type:	CC BY-NC-ND



ПРИРОДНО - МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ НИШ

КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА ИНФОРМАЦИЈА

Редни број, РБР:	
Идентификациони број, ИБР:	
Тип документације, ТД:	монографска
Тип записа, ТЗ:	текстуални / графички
Врста рада, ВР:	докторска дисертација
Аутор, АУ:	Марија В. Димитријевић
Ментор, МН:	Драган Ђорђевић
Наслов рада, НР:	Компаративно истраживање садржаја елемената и антиоксидативне активности одабраних врста гљива: хеометријски приступ
Језик публикације, ЈП:	српски
Језик извода, ЈИ:	енглески
Земља публикација, ЗП:	Србија
Уже географско подручје, УГП:	Србија
Година, ГО:	2021.
Издавач, ИЗ:	ауторски репринт
Место и адреса, МА:	Ниш, Вишеградска 33.
Физички опис рада, ФО: (поглавља/страна/ цитата/табела/слика/графика/прилога)	7 поглавља, 151 стране, 257 цитата, 28 табела, 51 слика
Научна област, НО:	Хемија
Научна дисциплина, НД:	Општа и неорганска хемија
Предметна одредница/Кључне речи, ПО:	гљиве, есенцијални макро-елементи, есенцијални микро-елементи, токсични елементи, антиоксидативна активност, фенолне киселине, ISP-OES, ISP-MS, HPLC, хеометрија, корелација, PCA и кластер анализа
УДК	543.068 + 542.943'78] : 528.28
Чува се, ЧУ:	библиотека

Важна напомена ВН:	Експериментални део докторске дисертације је финансирано од стране Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије, у оквиру пројеката ОИ број 172051 „Развој нових и побољшање постојећих електрохемијских, спектроскопских и проточних (ФИА) метода за праћење квалитета животне средине” и ОИ број 172047 „Природни производи биљака и лишјајева: изоловање, идентификација, биолошка активност и примена” а завршена на основу уговора о реализацији и финансирању научноистраживачког рада НИО, број 451-03-9/2021-14/200124.
------------------------------	--

Извод, ИЗ:	<p>Циљ овог рада био је компаративно истраживање садржаја елемената и антиоксидативне активности тринаест врста самониклих гљива породице Boletaceae и Russulaceae применом хеометријског приступа. Ово пре свега подразумева идентификацију и квантификацију елементног састава гљива применом ISP – OES и ISP – MS методе, као и фенолих киселина (главних носилаца антиоксидативне активности) коришћењем HPLC технике. Одређивање акумулираних макро и микро елемената у гљивама пружа информације о нутритивној вредности, а утврђивање садржаја токсичних елемената пружа информације о безбедности конзумирања гљива, што је од велике важности с обзиром да су анализирани врсте самоникле и јестиве и као такве заступљене у исхрани људи. Добијени резултати за садржај елемената у гљивама су прерачунавани на количину од 300 g свежих гљива (просечна порција) и добијене вредности су поређене са светским регулативама о прихватљивим и препорученим дневним уносима елемената. Како је антиоксидативна активност важан елемент у процени квалитета хране, циљ је био одређивање антиоксидативне активности екстракта различите поларности применом различитих тестова (DPPH, ABTS, FRAP, TRP, CUPRAC), као и одређивања садржаја укупних фенола и флавоноида. На основу резултата који се односе на истраживања садржаја фенолних киселина, као и антиоксидативне активности применом различитих метода, испитиване врсте гљива се могу сматрати извором антиоксиданата у исхрани.</p> <p>Након наведених експерименталних истраживања, добијени резултати су статистички обрађени и утврђена је корелација између одређених резултата, првенствено установљена је веза између елементног састава и антиоксидативне активности. Хеометријске методе, анализа главних компоненти и кластер анализа, омогућиле су груписање узорака на основу садржаја елемената, фенолних киселина и антиоксидативне активности и утврђени су односи између анализираних компоненти.</p>
-------------------	---

Датум прихватања теме, ДП:	31.5.2021. год.
Датум одбране, ДО:	
Чланови комисије, КО:	Председник:
	Члан:
	Члан:
	Члан, ментор:



ПРИРОДНО - МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ
НИШ

KEY WORDS DOCUMENTATION

Accession number, ANO :	
Identification number, INO :	
Document type, DT :	monograph
Type of record, TR :	textual / graphic
Contents code, CC :	doctoral dissertation
Author, AU :	Marija V. Dimitrijević
Mentor, MN :	Dragan Đorđević
Title, TI :	Comparative research of the content of elements and antioxidant activity of selected mushroom species: a chemometric approach
Language of text, LT :	Serbian
Language of abstract, LA :	English
Country of publication, CP :	Serbia
Locality of publication, LP :	Serbia
Publication year, PY :	2021.
Publisher, PB :	author's reprint
Publication place, PP :	Niš, Višegradska 33.
Physical description, PD : (chapters/pages/ref./tables/pictures/graphs/appendixes)	7 chapters, 151 pages, 257 references, 28 tables, 51 figures
Scientific field, SF :	Chemistry
Scientific discipline, SD :	General and Inorganic Chemistry
Subject/Key words, S/KW :	mushrooms, essential macroelements, essential microelements, toxic elements, antioxidant activity, phenolic acids, ICP-OES, ICP-MS, HPLC, chemometry, correlation, PCA and cluster analysis
UC	543.068 + 542.943'78] : 528.28
Holding data, HD :	library
Note, N :	PhD Research was funded by the Ministry of Education, Science and Technological Development of Republic Serbia, within the project „Development of new and improvement of the existing electrochemical, improvement of the existing electrochemical, spectroscopic and flow injection analysis (FIA) methods for monitoring the quality of the environment (No 172051)” and „Natural products of plants and lichens: isolation, identification, biological activity and application” (No. 172047).
Abstract, AB :	This study aimed to compare the content of elements and antioxidant activity of thirteen species of wild mushrooms of the family Boletaceae and Russulaceae using a chemometric approach. This primarily involves identifying and quantifying the elemental composition of mushrooms using ICP - OES and ICP - MS methods and phenolic acids (the leading carriers of antioxidant activity) using HPLC technique. Determination of accumulated macro and micro elements in mushrooms provides information on nutritional value, and the determination of toxic elements provides information on the safety of mushroom consumption, which is of great importance since the analyzed species are wild and edible present in human nutrition. The obtained results for the element content in mushrooms were recalculated to the amount of 300 g of fresh mushrooms (average portion), and the obtained values were compared with the world regulations on acceptable and recommended daily intake of elements. As antioxidant activity is an important element in assessing food quality, the aim was to determine the antioxidant activity of extracts of different polarities using different tests (DPPH, ABTS, FRAP, TRP, CUPRAC), as well as to determine the content of total phenols and flavonoids. Based on the results related to research on the content of phenolic acids and antioxidant activity using various methods, the examined types of mushrooms can be considered a source of antioxidants in the diet. After the mentioned experimental research, the obtained results were statistically processed. The correlation between certain results was determined, primarily the connections between the elemental composition and antioxidant activity were established. Chemometric methods, principal components analysis, and cluster analysis enabled the grouping of samples based on element content, phenolic acids, antioxidant activity, and the determined relationships between the analyzed components.
Accepted by the Scientific Board on, ASB :	31.5.2021. god.
Defended on, DE :	
Defended Board, DB :	President:
	Member:
	Member:
	Member, Mentor:

Ova doktorska disertacija je rađena u laboratorijama departmana za hemiju, Prirodno-matematičkog fakulteta, Univerziteta u Nišu, u okviru projekata „Razvoj novih i poboljšanje postojećih elektrohemijskih, spektroskopskih i protočnih (FIA) metoda za praćenje kvaliteta životne sredine” (broj 172051) i „Prirodni proizvodi biljaka i lišajeva: izolovanje, identifikacija, biološka aktivnost i primena” (broj 172047) finansiranih od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije

Prve redove najiskrenije zahvalnosti posvećujem prof. dr Violeti Mitić, koja se još od mojih ranih studentskih dana izdvajala svojom ljubaznošću, korektnošću i izuzetnim pedagoškim pristupom. Neizmerno hvala na ukazanom poverenju i razumevanju, poklonjenom vremenu i sjajnim idejama. Cenim sva zalaganja, svaki iskren i dobronameran kako stručni tako i prijateljski savet. Neopisiva je čast i sreća imati takvu profesorku.

Veliku zahvalnost dugujem svom mentoru prof. dr Draganu Đorđeviću na ukazanom razumevanju, podršci i pomoći kada mi je najviše trebala.

Ogromnu zahvalnost dugujem prof. dr Vesni Stankov Jovanović, koja me je posavetovala i u pravom trenutku uputila na prava vrata pruživši mi dragocenu priliku da nastavim sa daljim usavršavanjem. Hvala na uvek pokazanoj želji i spremnosti za pomoć, velikoj podršci, optimizmu, vedrini, interesovanju za moj rad, kao i na vrlo korisnim i mudrim sugestijama.

Veliko hvala profesorima dr Gordani Popović, dr Gordani Stojanović, dr Dragoljubu Miladinoviću, dr Jeleni Mutić i dr Milanu Mitiću na pomoći, uloženom trudu, i korisnim savetima tokom mog rada.

Posebnu zahvalnost dugujem svojoj kolegini i prijateljici docentu dr Jeleni Nikolić na podršci i prijateljskoj otvorenosti koju pokazuje od prvog dana našeg studiranja i dugogodišnjeg istraživačkog rada. Hvala za druženje i lepe trenutke, za sav uloženi trud, volju, strpljenje i vreme kako bi ova disertacija bila kvalitetnija. Još jednom ti hvala što si rad u laboratoriji učinila lepšim i zanimljivijim.

Od srca hvala mom dragom Milošu za svu ljubav, pažnju, radost, smeh, razumevanje, veru i podršku koju mi poklanja iz dana u dan. Najveću i najtopliju zahvalnost dugujem mojoj divnoj sestri Jeleni i Željku kao i roditeljima, koji mi svojom bezuslovnom ljubavlju, bezrezervnom podrškom, požrtvovanošću, dobrotom, velikim strpljenjem i razumevanjem uvek daju snagu za svaki naredni korak. Hvala za sve.

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DEO	3
2.1. Opšte karakteristike gljiva	3
2.2. Gljive porodice Boletaceae i Russulaceae	5
2.2.1. <i>Boletus edulis</i>	5
2.2.2. <i>Xerocomellus chrysenteron</i>	6
2.2.3. <i>Imperator rhodopurpureus</i>	6
2.2.4. <i>Rubroboletus rhodoxanthus</i>	7
2.2.5. <i>Butyriboletus appendiculatus</i>	8
2.2.6. <i>Leccinum aurantiacum</i>	8
2.2.7. <i>Leccinum albstipitatum</i>	9
2.2.8. <i>Hemileccinum impositum</i>	10
2.2.9. <i>Lactarius semisanguifluus</i>	10
2.2.10. <i>Lactarius sanguifluus</i>	11
2.2.11. <i>Lactarius deliciosus</i>	12
2.2.12. <i>Lactifluus volemus</i>	12
2.2.13. <i>Lactarius piperatus</i>	13
2.3. Hemijski sastav gljiva	14
2.3.1. Elementni sastav gljiva	14
2.3.1.1. <i>Zemljište kao izvor minerala u gljivama</i>	14
2.3.1.2. <i>Biološki važni elementi koji se mogu naći u gljivama</i>	15
2.3.1.2.1. <i>Apsorpcija esencijalnih makroelemenata</i>	16
2.3.1.2.2. <i>Apsorpcija esencijalnih mikroelemenata</i>	17
2.3.1.3. <i>Toksični elementi koji se mogu naći u gljivama</i>	19
2.3.1.3.1. <i>Apsorpcija toksičnih elemenata</i>	19
2.3.1.4. <i>Neesencijalni elementi koji se mogu naći u gljivama</i>	20
2.4. Antioksidativna aktivnost gljiva	23
2.4.1. Oksidativni stres i antioksidativna aktivnost gljiva	23
2.4.1.1. <i>Slobodni radikali</i>	23
2.4.1.2. <i>Antioksidansi</i>	24
2.4.1.3. <i>Sekundarni metabolite kao antioksidansi</i>	25
2.4.1.4. <i>Najvažniji sekundarni metabolite u prirodi</i>	26

2.4.2.	Spektrofotometrijske metode za određivanja antioksidativne aktivnosti gljiva	28
2.4.2.1.	<i>Određivane antioksidativne aktivnosti „hvatanjem” DPPH radikala</i>	29
2.4.2.2.	<i>Određivane antioksidativne aktivnosti „hvatanjem” ABTS radikala</i>	30
2.4.2.3.	<i>Određivanje redoks aktivnosti primenom FRAP testa</i>	31
2.4.2.4.	<i>Određivanje redoks aktivnosti CUPRAC testom</i>	32
2.4.2.5.	<i>Određivanje ukupne redukcijske sposobnosti</i>	33
2.4.3.	Određivanje ukupnog sadržaja fenolnih jedinjenja i flavonoida	34
2.5.	Tehnike određivanja	35
2.5.1.	Optička emisiona spektrometrija sa induktivno spregnutom plazmom	35
2.5.2.	Induktivno spregnuta plazma sa masenom spektrometrijom	36
2.5.3.	Hromatografija	37
2.5.3.1.	<i>Hromatografija visoke efikasnosti</i>	38
2.5.4.	UV/Vis spektrofotometrija	39
2.6.	Statistička analiza	40
2.6.1.	Korelaciona analiza	41
2.6.2.	Analiza glavnih komponenti (Principal Component Analysis – PCA)	42
2.6.3.	Klaster analiza (Cluster Analysis – CA)	43
3.	EKSPERIMENTALNI DEO	45
3.1.	Prikupljanje uzoraka gljiva	45
3.2.	Instrumentacija	45
3.3.	Reagensi	47
3.4.	Postupak pripreme uzoraka	48
3.4.1.	Postupak mineralizacije gljiva	48
3.4.2.	Priprema metanolnog ekstrakta za HPLC analizu	48
3.4.2.1.	<i>Hidroliza fenolnih kiselina</i>	48
3.4.3.	Priprema metanolnog, etanolnog i vodenog ekstrakta za određivanje antioksidativne aktivnosti	49
3.5.	Metode	50
3.5.1.	ISP-MS i ISP-OES analize	50
3.5.2.	Analiza fenolnih kiselina	51
3.5.3.	Spektrofotometrijske metode za određivanje antioksidativne aktivnosti primenom različitih testova, ukupnog sadržaja polifenolnih jedinjenja i flavonoida	55
3.5.3.1.	<i>Određivanje antioksidativne aktivnosti primenom DPPH testa</i>	55

3.5.3.2	<i>Određivanje antioksidativne aktivnosti primenom ABTS testa</i>	56
3.5.3.3	<i>Određivanje antioksidativne aktivnosti merenjem redukcionne moći primenom FRAP test</i>	58
3.5.3.4	<i>Određivanje antioksidativne aktivnosti merenjem ukupne redukcionne moći</i>	59
3.5.3.5	<i>Određivanje antioksidativne aktivnosti merenjem redukcionne moći primenom CUPRAC testa</i>	60
3.5.4.	Određivanje sadržaja ukupnih fenolnih jedinjenja po Folin-Ciocalteu metodi	61
3.5.5.	Određivanje ukupnog sadržaja flavonoida	62
4.	REZULTATI I DISKUSIJA	62
4.1.	Hemijski sastav gljiva	62
4.1.1.	Elementni sastav gljiva	62
4.1.1.1.	<i>Biološki važni elementi prisutni u gljivama</i>	62
4.1.1.1.1.	<i>Esencijalni makroelementi koji se mogu naći u gljivama</i>	62
4.1.1.1.2.	<i>Esencijalni mikroelementi koji se mogu naći u gljivama</i>	67
4.1.1.2.	<i>Toksični elementi koji se mogu naći u gljivama</i>	73
4.1.1.3.	<i>Neesencijalni elementi koji se mogu naći u gljivama</i>	78
4.1.2.	Hemometrijska analiza sadržaja elemenata u gljivama	81
4.1.2.1.	<i>Korelaciona analiza</i>	81
4.1.2.2.	<i>Analiza glavnih komponenata (PCA)</i>	82
4.1.2.3.	<i>Klaster analiza</i>	85
4.1.3.	Sadržaj fenolnih kiselina u gljivama	87
4.1.3.1.	<i>HPLC analiza fenolnih kiselina</i>	87
4.1.4.	Hemometrijska analiza sadržaja fenolnih kiselina u gljivama	93
4.1.4.1.	<i>Korelaciona analiza sadržaja fenolnih kiselina u gljivama</i>	93
4.1.4.2.	<i>Analiza glavnih komponenti (PCA) sadržaja fenolnih kiselina u gljivama</i>	95
4.2.	Biološka aktivnost gljiva	100
4.2.1.	Prinos ekstrakcije	100
4.2.2.	Određivanje sadržaja ukupnih fenola i flavonoida	101
4.2.3.	Antioksidativna aktivnost gljiva	105
4.2.3.1.	<i>Određivanje antioksidativne aktivnosti „hvatanja” DPPH radikala</i>	106
4.2.3.2.	<i>Određivanje antioksidativne aktivnosti „hvatanja” ABTS radikala</i>	108
4.2.3.3.	<i>Određivanje redukcionog potencijala primenom CUPRAC-testa</i>	108
4.2.3.4.	<i>Određivanje redukcionog potencijala primenom FRAP-testa</i>	109

4.2.3.5. <i>Određivanje ukupne redukcionne moći</i>	110
4.2.4. Hemometrijska analiza rezultata antioksidativne aktivnosti	110
4.2.4.1. <i>Korelaciona analiza</i>	110
4.2.4.2. <i>Analiza glavnih komponenti (PCA)</i>	113
4.3. Komparativna analiza	118
4.3.1. Korelacija sadržaja elemenata i antioksidativne aktivnosti ekstrakata odabranih vrsta gljiva	118
4.3.1.1. <i>Korelacija sadržaja fenolnih kiselina i antioksidativne aktivnosti</i>	119
4.3.1.2. <i>Korelacija sadržaja flavonoida i antioksidativne aktivnosti</i>	121
4.3.1.3. <i>Korelacija sadržaja fenolnih kiselina i sadržaja određivanih elemenata</i>	121
4.3.1.4. <i>Korelaciona analiza sadržaja ukupnih fenolnih jedinjenja i selena</i>	122
5. ZAKLJUČAK	124
6. LITERATURA	128
7. BIOGRAFIJA SA BIBLIOGRAFIJOM	143
IZJAVA O AUTORSTVU	149
IZJAVA O ISTOVETNOSTI ELEKTRONSKOG I ŠTAMPANOG OBLIKA DOKTORSKE DISERTACIJE	150
IZJAVA O KORIŠĆENJU	151

RKV	Reaktivne Kiseonične Vrste
RAV	Reaktivne Azotove Vrste
O₂^{•-}	Superoksidni anjon radikal
HO₂[•]	Hidroperoksidni radikal
ROO[•]	Peroksil radikal
OH[•]	Hidroksil radikal
NO[•]	Azot oksid radikal
¹O₂	Singletni kiseonik
HAT	Hydrogen Atom Transfer (Predaja vodonikovog atoma)
SET	Single Electron Transfer (Predaja elektrona)
ORAC	Oxygen Radical Absorbance Capacity (Kapacitet radikalne apsorpcije kiseonika)
TEAC	Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (Troloks ekvivalent antioksidativni kapacitet)
DPPH	2,2-difenil-1-pikrilhidrazil
ABTS	2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina)
FRAP	Ferric ion Reducing Antioxidant Parameter (Redukcija feri jona kao parametar antioksidativne aktivnosti)
CUPRAC	Cupric Reducing Antioxidant Capacity (Redukcija kupri jona kao parametar antioksidativne aktivnosti)
FC	Folin-Cioacalteu reagent (Folin–Sjoklto reagens)
TPTZ	2,4,6-Tri(2-piridil)-s-triazin
TRP	Total Reducing Power (Ukupna redukciona moć)
ISP	Indukovano Spregnute Plazma
OES	Optička Emisiona Spektrometrija
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (Hromatografija visoke efikasnosti)
UV/VIS spektrofotometrija	Ultraljubičasta/vidljiva spektrofotometrija
MVS	Multivarijantne Statističke Analize
PCA	Principal Component Analysis (Analiza glavnih komponenti)
PC	Principal Component (Glavna komponenta)

CA	Cluster Analysis (Klaster analiza)
PNU	Prihvatljiv Nedeljni Unos
PTWI	Provisional Tolerable Weekly Intake (Privremeni podnošljivi nedeljni unos)
RDI	Recommended Daily Intake (Preporučeni dnevni unos)
PDU	Preporučeni Dnevni Unos
SZO	Svetska Zdravstvena Organizacija
sm	suva masa
sg	sveža gljiva

.....
„Ali se još niko nije pomerio da uzbere gljive. Stajali su i posmatrali ih. Činilo im se da gledaju kako izrastaju tu pred njihovim očima. Kao da vide kako svrdlaju odnekud iz dubine, poput neke čudne gliste, zatim kako se nadima sloj trulog lišća. Onda se ispod zemlje pomalja mrka glatka kapa, kao testo koje se rumeni i nadolazi”.....

Odlomak „Priča o pečurkama” (Rani jadi, Danilo Kiš)



Uvod

Smatra se da su gljive među najrasprostranjenijim živim organizmima na Zemlji i svrstavaju se u posebno carstvo – carstvo gljiva, *Fungi* (lat.). Ovo carstvo je od davnina privlačilo pažnju ljudi. Do XVIII veka skoro ništa nije bilo poznato o načinu razmnožavanja gljiva pa je pojava gljiva „ni iz čega”, njihov brzi rast, neobična svojstva, pojavljivanje nekih vrsta u pravilnim krugovima, pravim ili cik cik linijama, pripisivan mističnim silama (Hadžić, 2002). Izraz pečurka se često koristi kao sinonim za gljivu, ali se u stvari odnosi na mesnato plodonosno telo viših gljiva.

Gljive se odavnina smatraju kvalitetnom hranom i najpre su se koristile samo samonikle vrste koje su se smatrale terapijskom hranom. Kineska farmakopeja dokumentuje upotrebu od preko 100 vrsta gljiva od strane tradicionalne medicine u lečenju raznih vrsta oboljenja (Vunduk, 2017). Sa porastom njihove upotrebe, za jelo i u terapijske svrhe, započeto je njihovo uzgajanje i upotreba kao sirovina za dobijanje preparata na bazi gljiva. Ovi proizvodi su prečišćeni, delimično definisani ekstrakti koji se konzumiraju u obliku kapsula ili tableta, danas se proizvode i intenzivno koriste u Japanu, Koreji i Kini, dok zapadna medicina proizvode na bazi gljiva još uvek nedovoljno koristi (Vunduk, 2017).

Hrana samo kao izvor energije više nije dovoljna čovečanstvu. Od nje se zahteva da bude i funkcionalna, odnosno da ima i medicinska svojstva i da kao takva doprinosi opštem zdravlju organizma. Hrana je više nego ikad energija, medicina, filozofija, trend, ali i nauka (Vunduk, 2017). Više nije dovoljno tvrditi da je neka namirnica blagotvorna po zdravlje čoveka, već je potrebno identifikovati aktivne komponente, utvrditi koje biološke osobine ispoljavaju, a potom i na koji način ih je moguće izolovati, a postupak učiniti komercijalnim (Vunduk, 2017).

Pravilna ishrana predstavlja veći unos vitamina, minerala, dijetetskih vlakana, proteina, vode i antioksidanasa, a manje količine masti i ugljenih hidrata. Namirnica koja u potpunosti odgovara ovakvom opisu je gljiva. Još u V veku pre nove ere, grčki lekar i osnivač medicine kao nauke, Hipokrat, ostavio je prve zapise o korišćenju gljiva u lekovite svrhe čime stiče veliku zaslugu za širenje svesti o gljivama i njihovoj upotrebi. Kako su se saznanja o gljivama povećavala došlo je do daljeg razvoja i formiranja nauke mikologije (od grčke reči *myko* – šampinjon, pečurka, *logos* – nauka) čijim se osnivačem smatra Aristotel za koga se zna da je među prvima dao opise nekih gljiva.

Danas se od ove grupe organizama proizvode antibiotici, antimikotici, sredstva za regulaciju nivoa holesterola (lovastatin), imunosupresivi (ciklosporin) i drugo (De Silva i sar., 2012).

Koncentracija metala u gljivama je znatno veća od one u poljoprivrednom bilju, povrću, voću ili čak životinjskom tkivu (Mleczek i sar., 2013). Gljive sadrže veliki broj esencijalnih,

mikro i makro elementa, ali i neželjene toksične elemente. Tako se gljive smatraju jednim od najvećih prirodnih izvora selena i njihovim konzumiranjem može se obezbediti četvrtina dnevnih potreba za selenom. Sadržaj makro konstituenata kao što su: natrijum, kalijum i fosfor je približno konstantan, dok se sadržaj kalcijuma, magnezijuma i sumpora menja u zavisnosti od sastava supstrata na kome se gljiva razvija (Rudawska i Laski, 2005).

Gljive su dobar izvor vitamina, posebno vitamina grupe B, kao što su riboflavin (vitamin B2), niacin (vitamin B3) i folna kiselina (vitamin B9). Sadržaj vitamina B2 u gljivama je veći nego u povrću, jajima i sirevima (Matilla i sar., 2001).

Gljive proizvode i skladište širok spektar sekundarnih metabolita koji se mogu iskoristiti u terapeutske svrhe. Među biološki aktivnim supstancama prisutnim u gljivama, polifenoli su privukli veliku pažnju zbog svojih izvanrednih antioksidativnih, antiupalnih i antitumorskih svojstava (Puttaraju i sar., 2006). Među izvorima različitih prirodnih antioksidanasa, gljive imaju istaknutu ulogu.

Na osnovu svega pomenutog u vezi sa samoniklim jestivim gljivama, predmet izučavanja ove doktorske disertacije je trinaest vrsta gljiva iz porodice Boletaceae i Russulaceae. Osnovni ciljevi su sledeći:

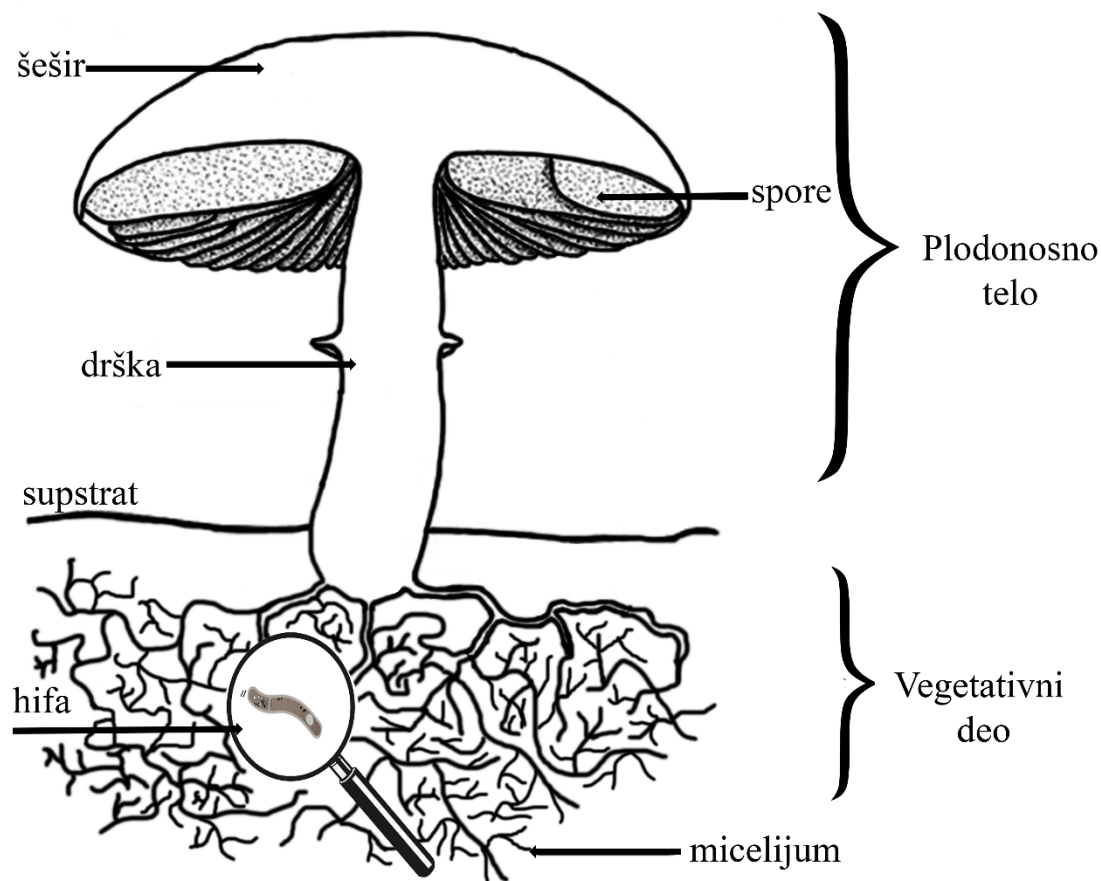
1. određivanje hemijskih karakteristika gljiva:
 - određivanje sadržaja esencijalnih makro, mikro i toksičnih elemenata
 - određivanje sadržaja fenolnih kiselina
2. određivanje antioksidativne aktivnosti
3. hemometrijska analiza dobijenih eksperimentalnih rezultata

Teorijski deo

2.1. OPŠTE KARAKTERISTIKE GLJIVA

Gljive su svrstane u posebno carstvo organizama jer se razlikuju od drugih živih bića po svom načinu života i razmnožavanja, načinu ishrane i svojim oblicima (Focht, 1986).

Izraz „pečurka” se često koristi kao sinonim za gljivu, ali se u stvari odnosi na mesnato plodonosno telo viših gljiva, dok je vegetativni deo, micelijum, skriven u zemlji i sastoji se iz rastućih ćelija (slika 2.1). Gljive se razmnožavaju uglavnom sporama i njihova funkcija je da proizvedu što veći broj spora u najkraćem mogućem vremenu i oslobode ih u vazduh. Kada spore dospeju na tlo, na vlažno mesto koje nije previše toplo ili hladno i nalazi se blizu izvora hranjivih materija, dolazi do stvaranja finih, končanih niti koje se zovu hife. Na brzinu i rast micelijuma utiče više faktora kao što su temperatura zemljišta i dostupnost hranjivih materija.



Slika 2.1 Prikaz građe gljive

Gljive se svrstavaju u posebno carstvo jer iako su pričvršćene za podlogu, kao i biljke, nemaju hlorofil i ne mogu da vrše fotosintezu.

Gljive čine oko četvrtinu biomase zemlje (Halpern, 2007) i povezane su sa biljnim svetom čineći neraskidivu simbiozu. Micelijum stupa u posebnu i neobičnu vezu sa korenjem drveća i trava i ta veza se zove mikoriza. U ovom slučaju se micelijum ponaša kao sekundarni

korenski sistem, pruža se duboko u zemlju i preko svog mrežastog sistema doprema drveću sve hranljive materije koje samo drvo nije uspelo da izvuče. Neki naučnici veruju da je sposobnost gljiva da razlože organsku materiju u prirodi povezana sa njihovim lekovitim svojstvima za ljude (Halpern, 2007). Za uzvrat, drveće obezbeđuje gljivama niz hranljivih materija koje su im neophodne za rast.

Gljive su veoma bitne za ekosistem jer se smatraju odličnim reducentima (razlagačima). Bez njih, organska materija se ne bi raspala i svet bi bio preplavljen mrtvim životinjama i biljkama. Gljive koje pripadaju ovoj grupi su saprobi. One kao hranu koriste mrtvu organsku materiju i na taj način učestvuju u njenoj razgradnji na osnovne elemente. Imajući u vidu da žive u ekosistemu sa patogenima koji izazivaju razne bolesti da bi preživele, moraju da imaju zdrave imunološke funkcije. Neki naučnici veruju da su antipatogene osobine koje su gljive razvile kao mehanizam preživljavanja upravo ono što ih čini vrednim za ljudski imuni sistem (Halpern, 2007).

Po obliku gljive su veoma različite: jedne liče na korale, druge na morske zvezde, treće su loptaste, peharaste, trubaste, valjkaste, u obliku grma, itd. (Hadžić, 2002). Miris im je različit – mirišu na luk, voće, ribu, buđ, brašno, anis ili badem. Neke su ljute, gorke, dok su druge veoma blagog i prijatnog ukusa. Što se boje tiče, gljive mogu biti vrlo intenzivnih boja do neupadljivih.

Glavna podela gljiva sa aspekta primene u ishrani je na: **jestive** – mogu se konzumirati i bez ikakve obrade, bezbedne su i vrlo ukusne; **uslovno jestive** – konzumiraju se isključivo nakon termičke obrade, u sirovom stanju su toksične; **lekovite** – gljive za koje se zna da imaju lekovito svojstvo; **nejestive** – gljive bez nutritivne vrednosti i **otrovne** – gljive koje sadrže toksične supstance koje se ne mogu ukloniti obradom.

2.2. GLJIVE PORODICE BOLETACEAE I RUSSULACEAE

Porodica Boletaceae ili u narodu poznata kao vrganjevke pripada redu Boletales. Francuski botaničar Francois Fulgis Chevallier je 1826. godine prvi put Boletaceae opisao kao porodicu koja se razlikuje od Agaricaceae. Rolf Singer je 1986. godine u modernoj taksonomiji gljiva porodicu Boletaceae podelio na 26 rodova i 415 vrsta (Singer, 1986), a samo dvadeset godina kasnije su Manfred Binder i David Hibbett porodicu Boletaceae razvrstali na 38 rodova. Brz razvoj mikologije kao i opsežna sistematska istraživanja doprinela su da danas imamo 59 rodova i 787 vrsta koje pripadaju porodici Boletaceae.

Porodica Russulaceae pripada redu Russulales. Porodicu je prvi put, 1907. godine, imenovao holandski botaničar Johannes Paulus Litsi, (International Mycological Association) koji je sve vrste razvrstao u tri roda: *Russula*, *Lactarius* i *Russulina* (danas poznatu kao *Russula*). Danas je poznato 1900 vrsta koje pripadaju ovoj porodici (Kirk, 2014) koje su razvrstane u sedam rodova: *Russula* sadrži 1100 vrsta, *Lactarius* 550 vrsta, *Lactifluus* 120 vrsta, *Boidinia* 13 vrsta, *Multifurca* 6 vrsta, *Gloeopeniophorella* 6 vrsta i *Pseudokenasma* 1 vrstu (Kirk, 2014; Lebel i sar., 2013).

2.2.1. *Boletus edulis*

Carstvo: Fungi
Divizija: Basidiomycota
Klasa: Agaricomycetes
Red: Boletales
Porodica: Boletaceae
Rod: *Boletus*
Vrsta: *Boletus edulis*



Prečnik šešira do 25 cm
Visina drške do 20 cm
Cevčice slobodne, ne dodiruju dršku
Spore u masi su maslinaste
Vreme rasta od VI-XI meseca u godini
Način života: simbiot

Boletus edulis Bull. ili pravi vrganj je vrsta jestive gljive iz porodice vrganjevki. Latinski naziv roda *Boletus* potiče od grčke reči *bolos* što znači izraslina ili grumen, a ime vrste *edulis* znači jestiv (<https://www.plantea.com.hr/pravi-vrganj/>). Ova gljiva menja boju šeširića u zavisnosti od mesta gde raste, ali je osnovna nijansa smeđe-crvenkasta ili oker, prema obodu bleđa (Hadžić, 2002). Šeširić je u početku polu-okruglast, a kasnije postane otvoren, vlažan i lepljiv. Raste leti i u jesen po listopadnim, ali i jelovim i smrekovim šumama, na osunčanim mestima. Meso je debelo, belo, ukusno i prijatnog mirisa, ali često napadnuto crvima.

2.2.2. *Xerocomellus chrysenteron*

Carstvo: Fungi
Divizija: Basidiomycota
Klasa: Agaricomycetes
Red: Boletales
Porodica: Boletaceae
Rod: *Xerocomellus*
Vrsta: *Xerocomellus chrysenteron*



Prečnik šešira do 12 cm
Visina drške do 9 cm
Cevčice dodiruju dršku
Spore maslinaste
Vreme rasta od VI-X meseca u godini
Način života: simbiot

Xerocomellus chrysenteron ili zlatača je jestiva gljiva iz porodice vrganjevki. Javlja se u listopadnim i četinarskim šumama od juna do novembra. Zlatača je manja gljiva, smeđe-crvenkastog šeširića koji često ispuca i po nekoliko milimetara, pri čemu se između pukotina pojavi žućkasto ili crvenkasto meso (Hadžić, 2002). Plodonosno telo je šeširić koji je mekan i gnjecav i na preseku poplavi a zatim malo i pocrveni. Raste pojedinačno ili u grupama i može se zameniti sličnim vrstama kao što je lažna zlatača (*Xerocomus subtomentosus*), ali ta zamena je bezopasna jer među gljivama iz roda *Xerocomellus* nema otrovnih (Hadžić, 2002).

2.2.3. *Imperator rhodopurpureus*

Carstvo: Fungi
Divizija: Basidiomycota
Klasa: Agaricomycetes
Red: Boletales
Porodica: Boletaceae
Rod: *Imperator*
Vrsta: *Imperator rhodopurpureus*



Prečnik šešira do 15 cm
Visina drške do 20 cm
Cevčice crvene, na pritisak poplave
Spore žutosmeđe
Vreme rasta od V-VIII meseca u godini
Način života: simbiot

Imperator rhodopurpureus ili skerletni vrganj je uslovno jestiva gljiva koja sadrži termolabilne sastojke koji su štetni za ljudski organizam, ali se na visokim temperaturama (kuvanjem, pečenjem) razgrađuju pa ova vrsta postaje sigurna za ljudsku upotrebu, ne izazivajući nikakve poteškoće. Miris je kiselkast, a ukus blag. Kod mladih primeraka ove gljive šeširić je roze-smeđe, kasnije purpurne boje do boje crvenog vina (<https://prepoznavanje->

gljiva.blogspot.com/2018/01/skerletni-vrganj.html). Drška im je žuta i duža, prekrivena crvenom mrežicom tako da stariji primerci izgledaju kao da je gljiva cela crvena. Na preseku, ova gljiva postaje plava. Pojavljuje se u proleće i raste do kasnog leta. Može se naći u listopadnim šumama.

2.2.4. *Rubroboletus rhodoxanthus*

Carstvo: Fungi
Divizija: Basidiomycota
Klasa: Agaricomycetes
Red: Boletales
Porodica: Boletaceae
Rod: *Rubroboletus*
Vrsta: *Rubroboletus rhodoxanthus*

Prečnik šešira do 20 cm
Višina drške do 12 cm
Cevčice žute, na pritisak poplave
Spore tamno crvene
Vreme rasta od VI-IX meseca u godini
Način života: simbiot



Rubroboletus rhodoxanthus u narodu poznat kao purpurno-žuti vrganj ili žuta ruževača je uslovno jestiva vrsta gljive iz porodice vrganjevki. Pre upotrebe treba je prokuvati jer je u sirovom stanju otrovna. Ovo je jedna od najlepših gljiva iz roda *Rubroboletus*, predivnog mirisa i vrlo retka (<http://www.boletus.hr/prikaz.asp?slovo=Leccinum+aurantiacum+%28Bull%29+SF+Gray>). Šeširić je debeo i čvrst, starenjem postaje mekši i gladak. Meso šeširića je bledožute boje a drška je izrazito žuta i preko nje je navučena crvenkasta gusta mrežica, te izgleda kao da je ceo crven. Raste leti u brdovitom i pretplaninskom pojasu uz hrastove i bukve. Purpurno-žuti vrganj se može na prvi pogled zameniti ludarom, ali *Boletus satanas* gotovo da nikada nema ružičastih tonova po šeširiću i ima neprijatan miris (<http://www.boletus.hr/prikaz.asp?slovo=Leccinum+aurantiacum+%28Bull%29+SF+Gray>). Postoji i velika sličnost sa vrstama *Imperator rhodopurpureus* i *Rubroboletus rubrosanguineus*. Od njih se žuta ruževača najlakše razlikuje po tome što joj poplavi samo meso šeširića (http://www.gljive.com.hr/gljive/Boletus_rhodoxanthus.html).

2.2.5. *Butyriboletus appendiculatus*

Carstvo: Fungi
Divizija: Basidiomycota
Klasa: Agaricomycetes
Red: Boletales
Porodica: Boletaceae
Rod: *Boletus*
Vrsta: *Butyriboletus appendiculatus*



Prečnik šešira do 20 cm
Visina drške do 15 cm
Cevčice slobodne, ne dodiruju dršku
Spore žute
Vreme rasta od VI-XI meseca u godini
Način života: simbiot

Butyriboletus appendiculatus ili šiljatonogi vrganj je gljiva koja dobro podnosi sušna razdoblja pa se može naći i kad druge gljive ne rastu. Kod mladih primeraka ove gljive može se uočiti da je šeširić ispupčen i baršunast a kasnije se ispruži. Raste od druge polovine proleća pa do početka jeseni uz bukvu i hrast, mada se može naći i pokraj breze ili lipe (<http://gorila.jutarnji.hr/vijestigorila/zivot/svastara/siljatonogi-vrganj-vrganj-koji-dobro-podnosi-susna-razdoblja/>). Drška mu je valjkastog oblika sa laganim zadebljanjem prema dnu i bazom koja je duboko ukopana u tlo. Smeđa kraljevka, kako je još u narodu poznata, je odlična jestiva vrganjevka, odličnog ukusa i mirisa. Najsličnija mu je jestiva vrsta *Boletus subappendiculatus* Derm, Lazebn & Ves. koja za razliku od *Butyriboletus appendiculatus* ne poplavi na dodir.

2.2.6. *Leccinum aurantiacum*

Carstvo: Fungi
Divizija: Basidiomycota
Klasa: Homobasidiomycetes
Red: Boletales
Porodica: Boletaceae
Rod: *Leccinum*
Vrsta: *Leccinum aurantiacum*



Prečnik šešira do 16 cm
Visina drške do 20 cm
Cevčice slobodne, ne dodiruju dršku
Spore smeđe
Vreme rasta od VIII-XI meseca u godini
Način života: simbiot

Leccinum aurantiacum (Bull.) Gray u narodu poznat kao turčin ili crveni hrapavac je jestiva gljiva koja je ime dobila na osnovu boje šeširića koji je u ranoj mladosti intenzivno crven, a kasnije pobledi. Ova koloristički zanimljiva vrganjevka sa poluloptastim šeširićem na

visokoj pegavoj dršci raste od kasnog leta do kraja jeseni u listopadnim šumama, naročito uz topole, jasike, breze i leske, na ivici šuma i livada (Hadžić, 2002). Rod *Leccinum* čine 22 vrste gljiva i sve su jestive. Turčin je dobra i ukusna gljiva, retko crvljiva. Drška je jestiva samo u ranoj mladosti jer je tvrda i teško svarljiva. Meso šeširića kod mladih primeraka je kompaktno i krem bele boje. Na preseku postane sivoljubičasta a nakon pola sata meso pocrni (<http://www.boletus.hr/prikaz.asp?slovo=Leccinum+aurantiacum+%28Bull%29+SF+Gray>).

2.2.7. *Leccinum albstipitatum*

Carstvo: Fungi
 Divizija: Basidiomycota
 Klasa: Agaricomycetes
 Red: Agaricomycetes
 Order: Boletales
 Porodica: Boletaceae
 Rod: *Leccinum*
 Vrsta: *Leccinum albstipitatum*



Prečnik šešira do 25 cm
 Visina drške do 20 cm
 Cevčice slobodne
 Spore krembele
 Vreme rasta od VI-X meseca u godini
 Način života: simbiot

Leccinum albstipitatum den Bakker & Noordel je gljiva poznata kao belonogi turčin. Pripada rodu *Leccinum* i porodici Boletaceae. Šeširić ove gljive je sunđerast i vrlo upadljiv zbog svoje narandžasto-crvene boje i jastučastog oblika. Površina šeširića je suva i prekrivena sitnim dlačicama koje se ponekad slepe i stvara se utisak postojanje ljuske. Drška je puna i mesnata i posuta ljuspicama koje mogu da promene boju. Vrlo često se dešava da prilikom branja ove gljive u šumi drška bude bele boje a da prilikom povratka kući u korpi vidimo gljivu sa šarenom drškom. Za razliku od vrste *L. aurantiacum* koja je u simbiozi sa više različitih vrsta drveća, vrsta *L. albstipitatum* se može naći samo u šumama topole. Raste od juna do oktobra.

2.2.8. *Hemileccinum impolitum*

Carstvo: Fungi
Divizija: Basidiomycota
Klasa: Agaricomycetes
Red: Boletales
Porodica: Boletaceae
Rod: *Hemileccinum*
Vrsta: *Hemileccinum impolitum*

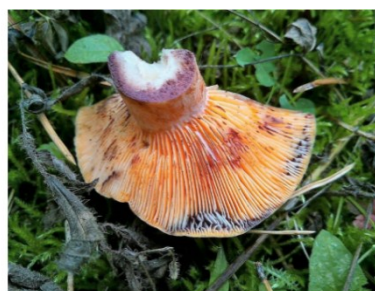


Prečnik šešira do 12 cm
Visina drške do 14 cm
Cevčice bledo žute do jarko žute
Spore žute
Vreme rasta od VI-IX meseca u godini
Način života: simbiot

Hemileccinum impolitum je retka gljiva koja pripada porodici Boletaceae. Latinski naziv vrste *impolitum* znači grub i hrapav pa je zbog toga u narodu poznata kao bezsjajni vrganj. Ova trobojna gljiva sa mesnatim i tvrdim šeširićem raste na kiselom zemljištu najčešće pored hrastova od početka leta do kasne jeseni. Šeširić mu je svetlooker boje, a drška i pore žute; na preseku meso ne menja boju (<https://gdnovisad.weebly.com/zascaronti263ene-i-retke-gljive-srbije>). Jestiva je gljiva čiji miris pomalo podseća na hlor, dok mu je ukus blago kiselkast (<https://gdnovisad.weebly.com/zascaronti263ene-i-retke-gljive-srbije>).

2.2.9. *Lactarius semisanguifluus*

Carstvo: Fungi
Divizija: Basidiomycota
Klasa: Agaricomycetes
Red: Russulales
Porodica: Russulaceae
Rod: *Lactarius*
Vrsta: *Lactarius semisanguifluus*



Prečnik šešira do 12 cm
Visina drške do 6 cm
Lističi silaze niz dršku
Spore okruglasto-elipsoidne
Vreme rasta od VII-X meseca u godini
Način života: simbiot

Lactarius semisanguifluus je gljiva u narodu poznata kao jelina rujnica. Ova gljiva spada u rod *Lactarius*, a ono po čemu se razlikuje od ostalih rujnica, je boja mleka koje poteče na oštećenom ili posečenom delu. Mleko je najpre žuto-narandžaste boje, nakon jednog sata je karmin-purpurno a na kraju vino-crvene boje (Focht, 1986). Šeširić ove vrste gljive je narandžasto-oker sa zelenkastim tonovima koji na pritisak pocrveni a onda pozeleni. Drška je

glatka i bez jamica, u mladosti puna a vremenom šuplja. Prilično je česta vrsta koja se može naći u četinarskim šumama, s jeseni. Brinovka, kako je još ljudi zovu je jestiva vrsta, ali pomalo gorka i ljuta.

2.2.10. *Lactarius sanguifluus*

Carstvo: Fungi
 Divizija: Basidiomycota
 Klasa: Agaricomycetes
 Red: Russulales
 Porodica: Russulaceae
 Rod: *Lactarius*
 Vrsta: *Lactarius sanguifluus*



Prečnik šešira do 15 cm
 Visina drške do 8 cm
 Lističi silaze niz dršku
 Spore okruglasto-elipsoidne
 Vreme rasta od VI-X meseca u godini
 Način života: simbiot

Lactarius sanguifluus je gljiva koja je u narodu poznata kao krvava rujnica. Pripada rodu *Lactarius*. Od ostalih mlečnica iz sekcije rujnica razlikuje se po boji mleka koja je odmah krvavo-crvene boje (<http://www.boletus.hr/prikaz.asp?slovo=Leccinum+aurantiacum+%28Bull%29+SF+Gray>). Šeširić ove gljive je u mladosti konveksan, zatim raširen i na kraju levkastog oblika, narandžasto do crvenkaste boje dok se kod starijih primeraka javljaju zelenkaste mrlje, sa manje ili više vidljivim koncentričnim krugovima, rub je u mladosti vrlo uvijen (http://www.gljivarsko-drustvo.org.rs/index.php?option=com_content&task=view&id=33&Itemid=51). Pretežno raste uz stabla borova tokom cele jeseni. Drška ove gljive je kratka i zdepasta, kod mladih primeraka puna, a vremenom šuplja i tvrda. Takođe, na osnovu drške moguće je ovu vrstu razlikovati od *Lactarius semisanguifluus* koji ima dršku iste boje samo je bez plićih jamica tamnijih tonova.

2.2.11. *Lactarius deliciosus*

Carstvo: Fungi
Divizija: Basidiomycota
Klasa: Agaricomycetes
Red: Russulales
Porodica: Russulaceae
Rod: *Lactarius*
Vrsta: *Lactarius deliciosus*

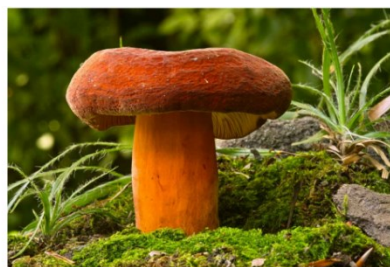


Prečnik šešira do 14 cm
Visina drške do 8 cm
Lističi silaze niz dršku
Spore krembele
Vreme rasta od VI-XI meseca u godini
Način života: simbiot

Lactarius deliciosus je gljiva boje šargarepe, sa narandžastim mlekom, koje u dodiru sa vazduhom pozeleni (Hadžić, 2002). Ime vrste *deliciosus* potiče od latinske reči *delicia* što znači uživanje (<https://www.plantea.com.hr/pravi-vrganj/>) i upravo ime koje opisuje ukus ove vrste. Smatra se jednom od najukusnijih vrsta. Šeširić ove vrste je narandžaste boje sa tamnijim koncentričnim krugovima, najpre izbočen a kasnije otvoren. Drška je u istoj boji, sa jamicama u tamnijoj boji. Sundečaste je strukture koja brzo postane šuplja. Ova plemenita rujnica kako je ljudi još zovu ima prijatan miris koji podseća na biljne začine i slatkasto gorki ukus. Raste na kiselom zemljištu uz mlade borove, ređe uz jele i smreke (Hadžić, 2002), od kraja leta do kasne jeseni.

2.2.12. *Lactifluus volemus*

Carstvo: Fungi
Divizija: Basidiomycota
Klasa: Agaricomycetes
Red: Russulales
Porodica: Russulaceae
Rod: *Lactifluus*
Vrsta: *Lactifluus volemus*



Prečnik šešira do 14 cm
Visina drške do 9 cm
Lističi silaze niz dršku
Spore prjavobeke
Vreme rasta od VI-X meseca u godini
Način života: simbiot

Lactifluus volemus je gljiva iz roda *Lactifluus*. Ova gljiva je u narodu poznata kao presnac i kao što ime kaže može se jesti sirov, tj. presan. Gljiva je crveno-smeđe boje, drška je u istoj boji kao i šeširić, prilično jaka i malo zakrivljena. Površina šeširića je suva i u vreme suša može

da ispuca a oko tih pukotina nastaju smeđe mrlje od mleka koje se osušilo na vazduhu. Ova gljiva raste posle dužih kiša u svim našim šumama i zanimljivo je napomenuti da je nikada ne napadaju crvi (Hadžić, 2002). Ova vrsta mlečnice ispušta obilan beli mlečni sok, lepljiv i sladak, koji takođe na vazduhu nakon nekog vremena blago potamni (<http://www.boletus.hr/prikaz.asp?slovo=Leccinum+aurantiacum+%28Bull%29+SF+Gray>). Meso presnaca je debelo i krto, slatkog ukusa sa mirisom sardina. Vrlo dobro podnose sušno razdoblje pa se mogu naći za vreme letnjih suša dok drugih gljiva ima jako malo (<http://www.boletus.hr/prikaz.asp?slovo=Leccinum+aurantiacum+%28Bull%29+SF+Gray>).

2.2.13. *Lactarius piperatus*

Carstvo: Fungi
 Divizija: Basidiomycota
 Klasa: Agaricomycetes
 Red: Russulales
 Porodica: Russulaceae
 Rod: *Lactifluus*
 Vrsta: *Lactarius piperatus*



Prečnik šešira do 18 cm
 Visina drške do 7 cm
 Lističi silaze niz dršku
 Spore bele
 Vreme rasta od VI-X meseca u godini
 Način života: simbiot

Lactarius piperatus je gljiva iz roda *Lactifluus*. Naziv roda potiče od latinske reči *lac* što znači mleko zbog belog mlečnog soka koji gljiva luči kada se iseče ili ošteti dok ime vrste *piperatus* ukazuje na ljut ukus (<https://www.plantea.com.hr/pravi-vrganj/>). Mleko koje poteče na oštećenom mestu nakon nekog vremena na vazduhu malo pozeleni. Zbog vrlo ljutog ukusa u narodu je poznata kao ljutača koja posle termičke obrade, pečenja ili kuvanja gubi svoju ljutinu pa postaje jestiva (Hadžić, 2002). Šeširić je u mladosti konveksan, kasnije se raširi i udubi poput levka, mesnat i gladak, a u vreme suša može da ispuca. Ljutača je prisutnija u listopadnim šumama, ali se može naći i među četinarima tokom leta do početka jeseni.

2.3. HEMIJSKI SASTAV GLJIVA

2.3.1. Elementni sastav gljiva

2.3.1.1. Zemljište kao izvor minerala u gljivama

Zemljište je nastalo raspadanjem stena pod uticajem prirodnih faktora kao što je klima, ali i pod uticajem živih organizama, pre svega biljaka i gljiva koje zauzimaju važno mesto u ekosistemu. Prvobitni sastav zemljišta u koji ulaze svi do sada poznati elementi nije konstantan i vremenom se menja. Oblik i koncentracija elemenata zavise od vrste stena od koje je nastalo zemljište i ovi elementi se nazivaju litogeni jer potiču direktno od litosfere. U poslednjih šezdeset godina najveći uticaj na sastav zemljišta ima čovek koji svojim svakodnevnim aktivnostima kao što su sagorevanje fosilnih goriva, razvoj industrije ili pak primena široke palete poljoprivrednih hemikalija, doprinosi da se koncentracija i sastav elemenata u zemljištu znatno menja. Svi oni elementi koji se mogu naći u zemljištu kao direktna ili indirektna posledica čovekovih aktivnosti jesu antropogeni elementi.

Nekoliko nedavnih istraživanja jasno su pokazala da je bez obzira na oblik antropogenih elemenata u zemljištu, njihova fitoraspoloživost znatno veća od elemenata pedogenog ili litogenog porekla (Kabata-Pendias, 2011).

Zemljište predstavlja važnu komponentu biosfere i ima značajnu ulogu za ljude, jer je opstanak čoveka vezan za održavanje produktivnosti zemljišta. Stoga je održavanje ekoloških i poljoprivrednih funkcija zemljišta važno za čovečanstvo. Kod proučavanja zemljišta neophodno je napraviti razliku između količine prirodno prisutnih elemenata i količine elemenata dodatih ljudskim uticajem, jer neka zemljišta mogu prirodno sadržati povećane količine pojedinih metala (npr. nikla) (Stefanović, 2016)

Takođe, zemljište se može opisati i kao jedan geohemijski „sakupljač” zagađujućih supstanci koji se ponaša kao prirodni pufer koji kontroliše transport hemijskih elemenata i jedinjenja do atmosfere, hidrosfere i živog sveta, štiteći globalni ekosistem od uticaja zagađenja (Kabata-Pendias, 2011). Ove funkcije su efikasne sve dok su očuvana svojstva zemljišta i prirodna ravnoteža. Za razliku od organskih zagađivača, metali se ne razlažu i ostaju u životnoj sredini (Wuana i Okieimen, 2011).

Zemljište se smatra zagađenim onda kada je neki element ili supstanca prisutna u koncentracijama većim od prirodnih što je posledica ljudske aktivnosti i ispoljava štetan uticaj na životnu sredinu i njene komponente (Kabata-Pendias, 2011). Promena koncentracija prisutnih elemenata u zemljištu može dovesti do promena bioloških procesa u životnoj sredini,

a preko biljaka i životinja ući u lanac ishrane i dovesti do štetnih posledica po ljudsko zdravlje (Wuana i Okieimen, 2011).

Svi elementi koji mogu da dospeju u lanac ishrane mogu se posmatrati kao: biološki važni elementi, toksični i elementi koji nemaju biološku ulogu ali ni toksični efekat kada u malim koncentracijama dospeju u organizam.

Međutim, nije uvek lako razlikovati toksične elemente od ostalih, jer se smatra da su svi elementi prisutni u većim količinama toksični. Ponekad je razlika između toksičnosti i dozvoljenih koncentracija veoma mala, kao što je slučaj sa selenom (Pavón i sar., 2015).

Uprkos gore navedenim sumnjama, ipak je moguće razlikovati elemente za koje se sigurno zna da su biološki važni i oni koji i u malim koncentracijama pokazuju toksično dejstvo i nemaju biološku ulogu u metabolizmu.

Arsić i sar. (2016) su postavili određene uslove koje element mora da ispuni da bi se smatrao esencijalnim za ljudsko zdravlje:

- mora biti prisutan u zdravom tkivu;
- njegova koncentracija mora biti relativno konstantna u različitim organizmima;
- njegov nedostatak mora da izazove precizne, određene biohemijske promene;
- promena njegove koncentracije dovodi do sličnih nepravilnosti kod različitih vrsta;
- njegov unos dovodi do uklanjanja problema uzrokovanih abnormalnostima (Cotzias, 1967).

2.3.1.2. *Biološki važni elemenati koji se mogu naći u gljivama*

Ljudskom telu su svakodnevno potrebne određene količine elemenata za pravilan rad i razvoj – zato se ti elementi smatraju esencijalnim jer svaki od njih ima svoju ulogu u čovečijem organizmu. Postoje elementi koji se u telu skladište u velikim količinama i to su Ca, Mg, P, K, Na, S i Cl. Oni čine 0,9% elemenata koji se nalaze u živim organizmima i nazivaju se esencijalni makroelementi. Međutim, postoje i mikroelementi koji su neophodni za pravilan rad organizma. Oni čine 0,1% elemenata koji se nalaze u ljudskom organizmu i nazivaju se esencijalni mikroelementi (Fe, Mn, Se, Zn, Cu, Ni, Co i Cr).

Preporučeni dnevni unos (PDU) makroelemenata koje predlaže Evropska agencija za bezbednost hrane (EFSA, 2017; EFSA, 2019) date su u tabeli 2.1.

Tabela 2.1 Prosečna dnevna potreba makroelemenata (mg/dan) (ESFA, 2017)

Element	PDU mg/dan
Kalcijum	950
Magnezijum	350
Fosfor	550
Kalijum	3500
Natrijum	1,5

2.3.1.2.1. *Apsorpcija esencijalnih makroelemenata*

Gljive se mogu smatrati bitnim izvorom biološki važnih elemenata. Koncentracije elemenata u nekim vrstama gljiva su veće nego u biljkama, voću i povrću (Cocchi i sar., 2006; Turkekul i sar., 2004), što sugerira da one poseduju efektivan mehanizam apsorpcije elemenata iz zemljišta (Sesli i Tüzen, 2004; Demirbaş, 2001), koji se prilično razlikuje od mehanizma kojim biljke usvajaju elemente. U gljivama se u najvećim količinama mogu naći upravo makroelementi, i to kalijum i fosfor (Mattila i sar., 2001). Fosfora u gljivama ima više nego u većini vrsta povrća, tako da porcija od 100g gljiva može obezbediti približno 10% dnevnih potreba za ovim elementom (Genccelep i sar., 2009). Balans kalijuma i natrijuma u organizmu utiče na krvni pritisak, pa se osobama koje konzumiraju puno natrijuma preporučuje konzumiranje hrane bogate kalijumom, kao što su gljive. Nizak nivo natrijuma i prisustvo velike količine kalijuma u gljivama je dobra preporuka za upotrebu gljiva u antihipertenzivnoj ishrani (Genccelep i sar., 2009).

Kalcijum se u gljivama može naći u intervalu koncentracija 100–500 mg/kg suve mase, ali se gljive ne smatraju dobrim akumulatorima ovog makroelementa (Kalač, 2009).

U tabeli 2.2 prikazane su prosečne vrednosti sadržaja makroelemenata u samoniklim gljivama preračunato na suhu masu – sm (Kalač 2019).

Tabela 2.2 Prosečne vrednosti makroelemenata u samoniklim gljivama (mg/kg sm)

Element	Prosečne vrednosti (mg/kg sm)
Kalcijum	100–500
Magnezijum	800–1800
Fosfor	5000–10000
Kalijum	20000–40000
Natrijum	100–400

Uobičajeni sadržaji biološki važnih elemenata odnose se na vrste iz nezagađenih mesta (Vidović, 2011).

2.3.1.2.2. Apsorpcija esencijalnih mikroelemenata

Esencijalni elementi u tragovima su podjednako važni za ljudsko zdravlje i imaju bitnu ulogu u prevenciji mnogih bolesti, sprečavaju nastanak malignih i srčanih oboljenja, dijabetesa i povišenog krvnog pritiska.

U poređenju sa biljkama, gljive mogu da akumuliraju velike količine mikroelemenata. Poznate su kao najosetljiviji akumulatori selena, tako da koncentracija selena u gljivama može da bude približno hiljadu puta veća nego u biljkama. Visoke koncentracije selena određene su u nekim gljivama iz roda *Boletus* (*Boletus edulis*, *Boletus pinicola*, *Boletus aestivalis*), roda *Albatrellus*, naročito *Albatrellus pes-caprae*, sa približno 200 mg Se/kg sm, u proseku, što je čini najbogatijom ovim elementom među gljivama (Falandysz, 2008).

U tabeli 2.3 date su prosečne vrednosti sadržaja mikroelemenata u samoniklim gljivama (Kalač 2019).

Tabela 2.3 Prosečne vrednosti mikroelemenata u samoniklim gljivama (mg/kg sm)

Element	Prosečni sadržaj (mg/kg sm)
Gvožđe	30–150
Kobalt	0,5–1
Mangan	10–60
Bakar	20–100
Cink	25–200
Nikl	0,5–5
Selen	0,5–5
Hrom	0,5–200

Preporučeni dnevni unos mikroelemenata prema Institutu za medicinu Američke nacionalne akademije dati su u tabeli 2.4 i predstavljaju nivo esencijalnih elemenata potreban za zadovoljenje nutritivnih potreba zdrave, odrasle osobe.

Tabela 2.4 Preporučeni dnevni unos mikroelemenata (mg/dan) (U.S. National Academies, Institute of Medicine, 2001)

Element	Muškarci (mg/dan)	Žene (mg/dan)
Gvožđe	8	18
Kobalt	/	/
Mangan	2,3	1,8
Bakar	0,9	0,9
Cink	11	8
Selen	0,055	0,055
Nikl	/	/
Hrom	0,035	0,025

Mangan, gvožđe i kobalt čine grupu elemenata koja se u zemljištu može naći u obliku nepristupačnom za gljive. Zbog toga je prema mišljenju nekih autora (Tüzen i Özdemir, 1998) koncentracija ovih metala manja u gljivama nego u biljkama, dok je po istraživanjima drugih autora (Kalač i Svoboda, 2000) sadržaj mangana, gvožđa i kobalta približno isti u gljivama i biljkama. Količina mangana u gljivama i u odgovarajućem zemljištu su uporedivi, dok je koncentracija gvožđa manja u gljivama nego u supstratu.

Uobičajene koncentracije gvožđa u gljivama su od 30 do 150 mg/kg sm, kobalta ima približno 0,5 mg/kg sm, uz pojedinačne slučajeve pojedinih vrsta gde prelazi 1 mg/kg sm, a mangana između 10 i 60 mg/kg sm, s tim što u *Macrolepiota procera* i *Boletus edulis* može preći 100 mg/kg sm (Kalač, 2010).

Sadržaj bakra u gljivama je viši nego u biljkama (Kalač i Svoboda, 2000). Zabeleženo je da u nekim vrstama gljivama brza akumulacija bakarnih jona utiče na apsorpciju kalijumovih i magnezijumovih jona (Stefanović, 2016). Gljive su dobri akumulatori bakra, što se može potvrditi analizom gljiva koje rastu na zagađenim mestima, gde je primećen veći sadržaj bakra. Smatra se da su gljive odličan izvor bakra i da se njegov sadržaj kreće približno 0,5 mg/100 g sm, što kada se preračuna na porciju od 300 g svežih gljiva čini približno 55% preporučenih dnevnih količina (Vidović, 2011).

Cink je među najčešće praćenim elementima u gljivama (Kalač, 2019) jer se svrstava među bitne elemente prisutne u tragovima koji često nedostaju u ljudskoj ishrani. Sadržaj cinka u nekim vrstama može da iznosi i 1,1 mg/100g sm, što čini približno 11% ukupnih dnevnih potreba za cinkom. Tokom petnaestominutnog blanširanja *Agaricus bisporus* primećen je gubitak od 23% početnog sadržaja cinka (Coşkuner i Özdemir, 1997). Šeširići obično imaju

nešto veći sadržaj cinka od drške (Alonso i sar., 2003).

Nikl i kobalt su mikronutrijenti čija uloga dugo nije bila poznata, pa se nisu smatrali bitnim za ljudsko zdravlje. S obzirom da su veoma mobilni u zemljištu, gljive ih lako mogu akumulirati (Kabata-Pendias, 2011). Apsorpcija je pozitivno povezana sa koncentracijama nikla u zemljištu (Kabata-Pendias, 2011). Ekstremno visoke koncentracije nikla pronađene su u gljivama koje su sakupljene u oblasti blizu topionice nikla (Barcan i sar., 1998).

Hrom se smatra esencijalnim mikroelementom i njegova koncentracija u zemljištu je značajna, ali je biodostupnost ograničena. Sa povećanjem koncentracije hroma u zemljištu raste i koncentracija hroma u gljivama. Takođe, zabeležene su povišene vrednosti hroma kod samoniklih gljiva koje rastu na kiselom tlu (Campos i Tejera, 2011). Prosečan sadržaj hroma u gljivama se kreće između 0,5 i 10 mg/kg sm.

2.3.1.3. Toksični elementi koji se mogu naći u gljivama

2.3.1.3.1. Apsorpcija toksičnih elemenata

Sedamdesetih godina prošlog veka počela su opsežna istraživanja elemenata koji se nalaze u gljivama i sva istraživanja su imala dva cilja: pronalaženje jestivih vrsta koje akumuliraju velike količine elemenata u tragovima, kako bi se procenio uticaj prisustva tih elemenata na ljudsko zdravlje i mogućnost korišćenja plodonosnog tela gljiva kao bio-indikatora zagađenja životne sredine elementima (Kalač i Svoboda, 2000).

U praksi se termin „teški metali” obično poistovećuje sa terminom toksični elementi što je neispravno jer elementi kao što su Fe, Zn, Cu, Se Co spadaju u grupu teških metala ali u malim koncentracijama nisu toksični, čak su i neophodni za normalne funkcije organizma. Elementi poput Hg, Pb, Cd i As su za razliku od pomenutih elemenata toksični u bilo kojoj koncentraciji i nemaju nikakvu biološku ulogu.

Sadržaj elemenata u plodonosnim telima gljiva zavisi od vrste gljive (Kalač, 2019). U poređenju sa biljkama, gljive su bolji akumulatori nekih metala prisutnih u tragovima u zemljištu, te su dobri indikatori zagađenja životne sredine (Quinche, 1976), što je posledica prilično različitog mehanizma usvajanja hranljivih i toksičnih sastojaka. Gljive akumuliraju veće količine Hg, Cd, Se, Cu i Zn u odnosu na biljke koje rastu na istom zemljištu (Kabata-Pendias, 2011).

Utvrđeno je da su gljive relativno dobri akumulatori arsena. Slekovec i Irgolic (1996) su ispitivali 83 vrste samoniklih gljiva i najniža koncentracija bila je u vrsti *Ramaria botritis* (10 mg/kg sm), a najviša u *Thelephora terrestris* (38 mg/kg sm). Visoka koncentracija arsena u

gljivama najčešće je posledica biomagnifikacije (preferencijalno prihvatanje metala iz zemljišta kojih ima u malim koncentracijama) ili rezultat „normalnog” unosa iz tla sa visokim koncentracijama arsena (Slekovec i Irgolic, 1996).

Neke gljive, kao što su vrste roda *Agaricus*, *Lycoperdon*, *Boletus*, pokazuju afinitet prema usvajanju kadmijuma iz zemljišta. Takođe, gljiva *Amanita muscaria*, koju su Little i sar. (1980) brali sa nezagađenog šumskog tla sa relativno niskim sadržajem kadmijuma (0,34 mg/kg sm), sadržala je 29,9 mg/kg sm kadmijuma. Nuorteva (1990) je uočio visok sadržaj kadmijuma u gljivama koje su brane u nezagađenim šumama Finske.

Neke vrste gljiva koje pripadaju rodu *Agaricus* ili *Boletus* pokazale su se dobrim bioakumulatorima žive, pogotovu vrste koje su rasle na zemljištu kontaminiranom živom. Analizom je utvrđeno da je živa neravnomerno raspoređena, tj. da se veće koncentracije žive mogu naći u šeširiću nego u dršci. *Macrolepiota procera* je vrsta gljive koja akumulira živu, ali njen bioakumulacioni potencijal opada kada dođe do povećane kontaminacije zemljišta ovim metalom (Falandysz i Gucia, 2008).

Zbog kratkog životnog veka plodonosnog dela gljive (do 14 dana) udeo koncentracije metala koji potiče od atmosfere depozicije smatrao se zanemarljivim u odnosu na onaj procenat koji potiče iz zemljišta. Međutim, kada su Tüzen i sar. (1998) uporedili sadržaj olova u opranim i neopranim gljivama uočili su da oprane gljive sadrže 68% manje olova od neopranih i zaključili da je to posledica visokog zagađenja olovom iz vazduha. Kalač i Svoboda (2000) su dokazali da plodonosna tela gljive akumuliraju velike količine olova u poređenju sa biljkama, posebno kada su u blizini veoma zagađenih mesta. Toksični efekat olova je posledica njegovog kumulativnog dejstva i konzumiranjem kontaminirane hrane javlja se hronično trovanje.

2.3.1.4. Neesencijalni elementi koji se mogu naći u gljivama

Osim esencijalnih makro i mikro elemenata u zemljištu se mogu naći i elementi kao što su srebro, aluminijum, barijum, bizmut, stroncijum i rubidijum. Za ove elemente nije utvrđena biološka uloga u organizmu ljudi kao ni nutritivna vrednost tako da se ne mogu smatrati esencijalnim. Takođe, koncentracija ovih elemenata u gljivama je veoma često niska i prosečne vrednosti date su u tabeli 2.5 (Kalač, 2019). Međutim, nekada se ovi elementi mogu javiti u povećanim koncentracijama i izazvati pojavu zdravstvenih problema.

Tabela 2.5 Prosečne vrednosti mikroelemenata u samoniklim gljivama (mg/kg sm)

Element	Prosečni sadržaj (mg/kg sm)
Srebro	0,5–2
Aluminijum	>500
Barijum	<2
Bizmut	<0,1
Stroncijum	2
Rubidijum	25–500

Geohemijske karakteristike srebra su slične karakteristikama bakra, a koncentracija srebra je u zemljištu približno 1000 puta niža od koncentracije bakra (Kabata-Pendias, 2011). Srebro nema biološku ulogu u organizmu ljudi i kao takav se smatra toksičnim.

Sadržaj srebra u biljkama, gljivama i zelenim algama se razlikuje i zavisi od vremena branja. Horovitz i sar. (1974) su ustanovili da je sadržaj srebra u biljkama ubranim u septembru mnogo niži nego u biljkama ubranim u maju. Takođe, ustanovili su da su gljive i alge bogatije srebrom nego biljke, što je verovatno posledica sposobnosti gljiva da bioakumuliraju srebro. Prosečna vrednost koncentracije srebra u samoniklim i kultivisanim gljivama je od 0,5 do 2 mg/kg sm (Kalač, 2019). Međutim, postoje vrste samoniklih gljiva čija je koncentracija iznad navedenih vrednosti. Na primer, koncentracija srebra u vrsti *Agaricus campestris* se kreće u rasponu od 1,7 do 150 mg/kg sm (Falandisz i sar., 1994).

Aluminijum je metal koji nije mnogo proučavan u gljivama. Prosečne vrednosti ovog metala u kultivisanim vrstama gljiva su manje od 25 mg/kg sm, dok je u samoniklim gljivama ova koncentracija veća i može da se kreće i preko 500 mg/kg sm (Kalač, 2019). Durkan i sar. (2011) su proučavali vrste *Pleurotus ostreatus*, *Agaricus bitorquis* i *Xerocomellus chrysenteroni* i ustanovili su da je koncentracija aluminijuma u svakoj od njih 3310, 2080 i 1850 mg/kg sm.

Barijum i bizmut su elementi čije koncentracije nisu mnogo proučavane u gljivama i nema mnogo informacija vezanih za ove elemente u gljivama. Poznat je nivo barijuma u gajenim i samoniklim vrstama, koji je manji od 2 mg/kg sm, dok je veći sadržaj (preko 10 mg/kg sm) karakterističan za vrste koje rastu na geološki specifičnim terenima (Kalač, 2019). Za razliku od barijuma, bizmut se u gljivama nalazi u mnogo manjim koncentracijama (manjim od 0,1 mg/kg sm), kako u samoniklim tako i u gajenim vrstama. Sadržaj stroncijuma u samoniklim i gajenim gljivama se obično kreće do 2 mg/kg sm, ali može da bude i veći.

Koncentracije preko 30 mg/kg sm mogu se naći u gljivama koje rastu na kiselom zemljištu (Campos i Tejera, 2011).

Rubidijum spada u često određivane elemente u gljivama. Prosečan sadržaj varira u rasponu od 25 mg/kg sm do 500 mg/kg sm (Kalač, 2019). Veoma visoke vrednosti rubidijuma zabeležene su u vrsti *Cantharellus cibarius* sa četiri lokacije u Poljskoj (Drewnowska i Falandysz, 2015). Niži nivo rubidijuma može se naći u gljivama koje rastu na kiselom zemljištu (Campos i Tejera, 2011). U mnogim istraživanjima je pokazano da su gljive porodice Boletaceae bogate ovim elementom. Drewnowska i sar. (2017) su ispitivali uticaj blanširanja i kišeljnja na sadržaj rubidijuma u gljivama i utvrdili da se nakon blanširanja u ključaloj vodi tokom 15 min količina rubidijuma smanjuje za 85%, a posle stajanja u sirćetnoj kiselini 30 dana – 98%.

2.4. ANTIOKSIDATIVNA AKTIVNOST GLJIVA

2.4.1. Oksidativni stres i antioksidativna aktivnost gljiva

2.4.1.1. Slobodni radikali

Slobodan radikal se definiše kao atom ili molekul koji ima najmanje jedan nespareni elektron (Morello i sar., 2002). Novonastala jedinjenja sa nesparenim elektronima su veoma nestabilna i neselektivno reaktivna, pa lako stupaju u reakcije sa drugim molekulima, ali i međusobno. Slobodni radikali se ponašaju i kao oksidaciona i kao redukciona sredstva jer mogu i da doniraju i da preuzimaju elektrone od drugih molekula (Cheeseman i Slater, 1993).

Kiseonik, element koji je neophodan za život, pod određenim uslovima ima štetno dejstvo za ljudski organizam. Štetni efekat se javlja usled nastajanja određenih hemijskih jedinjenja, poznatih kao reaktivne kiseonične vrste (RKV), koja imaju tendenciju da doniraju atom kiseonika drugim jedinjenjima (Lobo i sar., 2010). Pored pomenute vrste postoje i reaktivne azotove vrste (RAV). Obe pomenute vrste su proizvodi normalnog ćelijskog metabolizma (Dröge, 2002). Termin „reaktivne vrste” se vrlo često koristi ne samo za slobodne radikale već i za vrste koje nisu radikali, ali lako mogu dovesti do slobodnih radikalskih reakcija u živim organizmima. Najvažnije reaktivne vrste kiseonika i azota su superoksidni anjon radikal ($O_2^{\bullet-}$), hidroperoksidni (HO_2^{\bullet}), peroksil (ROO^{\bullet}), hidroksil (OH^{\bullet}) i azot oksid (NO^{\bullet}) radikal, ali i hipohlorasta kiselina (HClO), vodonik peroksid (H_2O_2), singletni kiseonik (1O_2) i ozon (O_3), koji mogu da se transformišu u potencijalno toksične kiseonične vrste u organizmu i nazivaju se pro-oksidansi.

RKV i RAV imaju dvostruku ulogu u biološkom smislu, jer mogu biti i štetni i korisni za žive organizme (Valko i sar., 2004). Reaktivne vrste, prisutne u malim koncentracijama, učestvuju u odbrani organizma od zaraznih agenasa, uništavaju inficirane ili oštećene ćelije. Pri visokim koncentracijama, slobodni radikali prekidaju normalne fiziološke procese u različitim fazama, iniciraju niz štetnih lančanih reakcija koje dovode do molekulskog oštećenja bioloških tkiva i narušavaju mehanizme signalizacije (Victor i sar., 2004). Oštećenja koja se javljaju na biološkim molekulima poput dezoksiribonukleinske kiseline (DNK), proteina, ugljenih hidrata i lipida, imaju ključnu ulogu u razvoju bolesti kao što su rak, artritis, arterioskleroza i mnoge neurodegenerativne bolesti. Poznato je da su rak i ateroskleroza, najrasprostranjenije bolesti slobodnih radikala (Lobo i sar., 2010).

Adekvatna ravnoteža korisnog i štetnog dejstva slobodnih radikala u živim organizmima se postiže kroz mehanizam koji se zove „redoks regulacija” (Barja, 2004). Za pravilan i

uravnotežen rad organizma veoma je bitan balans između proizvodnje i eliminacije reaktivnih vrsta i on se postiže složenim mehanizmima. Ukoliko dođe do narušavanja ravnoteže na bilo koji način (povećana proizvodnja ili umanjena eliminacija reaktivnih vrsta) zbog spoljašnjih stimulanasa (atmosfersko zagađenje, pušenje, ultraljubičasto zračenje, radijacija i sl.) ili unutrašnjih metaboličkih promena (npr. poremećeni rad organizma zbog dijabetesa) može doći do narušavanja redoks homeostaze čime se povećava nivo pro-oksidanasa i nastupa stanje koje se zove oksidativni stres (Trachootham i sar., 2008).

Pri normalnim fiziološkim uslovima, reaktivne vrste na reverzibilan način ulaze u strukturu makromolekula i takve modifikacije igraju ključnu ulogu u regulisanju ćelijske funkcije. Međutim, pod oksidativnim stresom, uvećane količine reaktivnih vrsta konstantno napadaju lipide, proteine i DNK, što dovodi do ozbiljnog i nepovratnog oksidativnog oštećenja (Trachootham i sar., 2008). Povećani oksidativni stres igra ključnu ulogu u razvoju bolesti, uključujući najčešće rak, neurodegenerativne bolesti i starenje.

Najosetljiviji i veoma podložni oksidativnoj modifikaciji su molekuli lipida. Pri reakciji lipida sa slobodnim radikalima dolazi do lančane reakcije koja se naziva lipidna peroksidacija pri čemu se stvaraju lipidni radikali. Novonastali radikali mogu dalje da napadaju sledeće molekule lipida i na taj način vrše propagaciju lančanog procesa.

2.4.1.2. Antioksidansi

Organizam je kao odgovor na reaktivne vrste razvio odbrambeni mehanizam, tj. sistem za njihovo uklanjanje – antioksidanse. Antioksidansi su stabilni molekuli koji neutrališu slobodan radikal tako što mu daju elektron, a pri tome sami ne postaju reaktivna vrsta.

Ovaj složeni odbrambeni sistem podrazumeva različite mehanizme delovanja, tako da neki mehanizmi mogu da deluju preventivno tako što se smanjuje formiranje radikala, drugi mehanizam obuhvata uklanjanje već formiranih slobodnih radikala uz prekidanje lančane reakcije, a postoje i mehanizmi koji obuhvataju različite sisteme popravke oštećenja koja su nastala kao posledica delovanja reaktivnih vrsta.

Antioksidativni sistem odbrane uključuje enzimске i neenzimске antioksidanse, koji štite organizam od štetnih efekata slobodnih radikala (Birben i sar., 2012). Superoksid dismutaza, glutathion peroksidaza i katalaza čine enzimске sisteme koji učestvuju u primarnoj antioksidativnoj zaštiti. Primarna funkcija antioksidanasa jeste da održava ravnotežu između formiranja i eliminisanja slobodnih radikala tokom metaboličkih procesa (Rahman, 2007) kako bi se sprečila pojava oksidativnog stresa. Ovi antioksidansi interaguju sa slobodnim radikalima i prekidaju lančanu reakciju pre nego što dođe do oštećenja bioloških molekula.

Neenzimski antioksidansi takođe doprinose uklanjanju reaktivnih vrsta. Tu spadaju jedinjenja male molekulske mase, hidrosolubilne (vitamin C, mokraćna kiselina, bilirubin, albumin, glutation, neki polifenoli) ili liposolubilne prirode (vitamini E i A, karotenoidi, neki polifenoli), različite strukture i mehanizama kojima ostvaruju svoju aktivnost u sistemu antioksidativne zaštite. Ova vrsta antioksidanasa se naziva sekundarnim antioksidansima pošto nastaju samo u situaciji kada su prisutne reaktivne vrste. Sekundarni antioksidansi funkcionišu različitim mehanizmima, uključujući vezivanje metalnih jona, „hvatanje” (eng. *scavenging*) kiseonika, pretvaranje hidroperoksida u neradikalne vrste, apsorbuju UV zračenje ili deaktiviraju singletni kiseonik (Shi i sar., 2001).

2.4.1.3. Sekundarni metaboliti kao antioksidansi

Iako organizam ima svoj odbrambeni mehanizam, odnosno proizvodi jedinjenja koja imaju važnu ulogu u borbi protiv slobodnih radikala, za potpunu zaštitu od raznih bolesti ponekad su potrebni dodaci ishrani od kojih su najznačajniji polifenoli. U različitim biljnim vrstama identifikovano je više od 8000 polifenolnih jedinjenja, koji se razlikuju po strukturi. Ovi molekuli su sekundarni metaboliti biljaka i imaju važnu ulogu u „hvatanju” slobodnih radikala i sprečavanju štete koja se javlja nakon njihovog delovanja. Takođe doprinose specifičnom mirisu, ukusu i boji u biljkama (Bennett i Vallsgrrove, 1994), a mnogi od njih imaju značajne primene u farmakologiji, hemijskoj industriji, poljoprivredi i šumarstvu (Cannes do Nascimento i Fett-Neto, 2010).

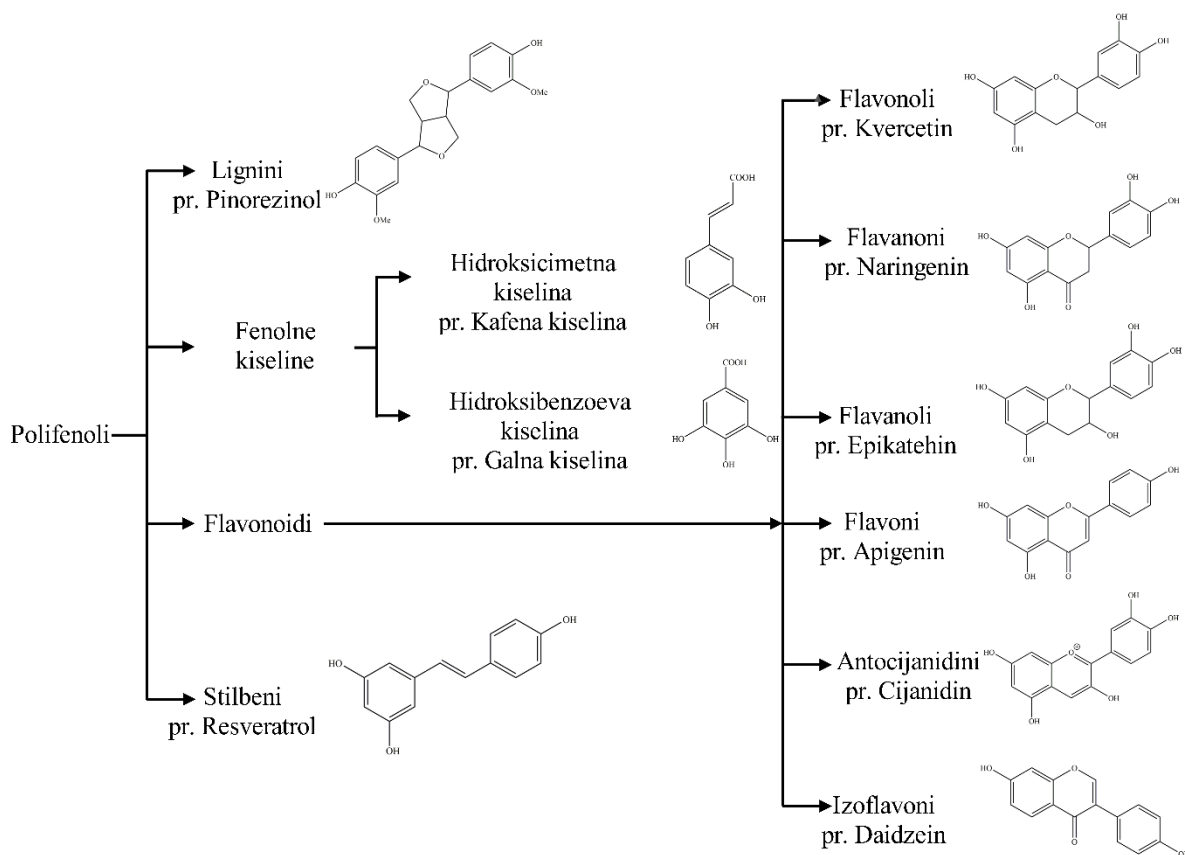
Polifenolna jedinjenja u biološkim sistemima mogu da deluju na više načina i to (Prior i sar., 2005):

1. direktnim vezivanjem („hvatanjem”) slobodnih radikala predajom H – atoma (*Hydrogen Atom Transfer (HAT)*);
2. redukcijom slobodnih radikala doniranjem jednog elektrona (*Single Electron Transfer (SET)*);
3. heliranjem prelaznih metala;

Polifenolna jedinjenja se retko javljaju slobodna u prirodi, češće su prisutna u vidu glikozida. Takođe, uobičajeno je povezivanje sa karboksilnim kiselinama, aminima, lipidima kao i sa različitim fenolnim jedinjenjima (Kondratyuk i Pezzuto, 2004).

Struktura polifenolnih jedinjenja se veoma razlikuje, ali ono što je karakteristično za sve jeste da sadrže aromatični prsten i kao supstituente hidroksilne grupe.

Na osnovu broja prstenova i načina na koji su oni povezani, polifenolna jedinjenja se mogu podeliti na fenolne kiseline, flavonoide, stilbene i lignine (slika 2.2).



Slika 2.2 Glavne vrste polifenolnih jedinjenja

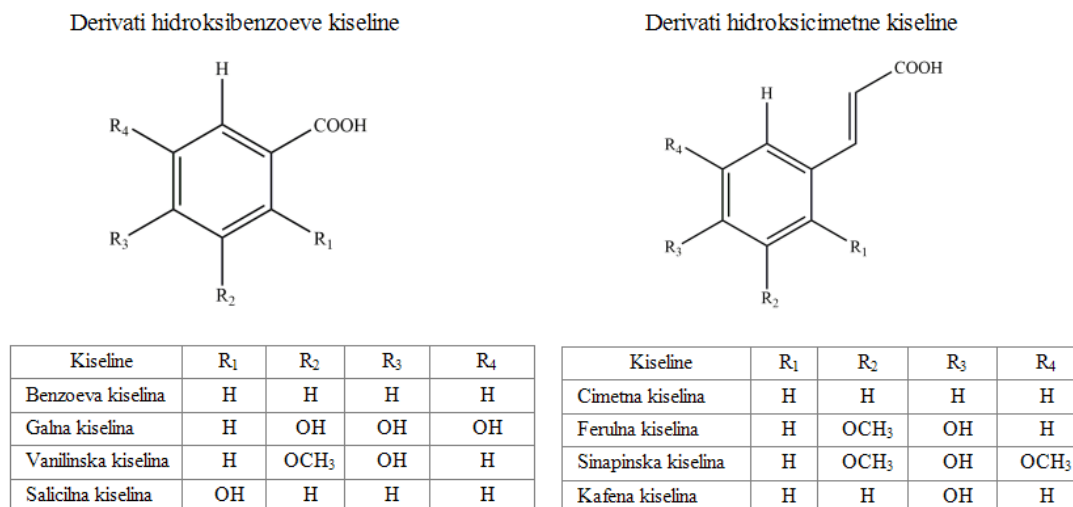
2.4.1.4. Najvažniji sekundarni metaboliti u prirodi

Flavonoidi i fenolne kiseline su najvažnije grupe sekundarnih metabolita u biljkama i smatraju se prirodnim antioksidansima u ljudskoj ishrani.

Termin „fenolne kiseline” se odnosi na jedinjenja kod kojih je karboksilna grupa vezana za fenolni prsten i smatraju se biljnim polifenolima jer su bioprekursori polifenola i, što je još važnije, oni su metaboliti polifenola (Saxena i sar., 2012).

Fenolne kiseline se u prirodi retko javljaju slobodne, najčešće su vezane za alkohole, polisaharide ili organske kiseline. Pokazuju antioksidativnu aktivnost jer imaju mogućnost „hvatanja” hidroksi i peroksi radikala, superoksidnog radikalnog anjona, nekih organskih radikala, peroksnitrita i singletnog kiseonika (Chandrasekara, 2018). Fenolne kiseline obuhvataju veliku grupu široko rasprostranjenih hidroksi-derivata cimetne i benzojeve kiseline (slika 2.3). U biljkama je koncentracija hidroksibenzojeve kiseline uglavnom niska, dok su hidroksicimetne kiseline češće i uglavnom su to *p*-kumarninska, kafena, ferulna i sinapinska kiselina (Pandey i Rizvi, 2009).

Fenolne kiseline su široko rasprostranjene i u gljivama, u većim ili manjim količinama u zavisnosti od vrste.



Slika 2.3 Strukture važnih fenolnih kiselina

Mehanizam delovanja fenolnih kiselina kao antioksidanasa ogleda se u otpuštanju vodonikovog atoma ili reakcijama „hvatanja“ slobodnih radikala dok je njihova efikasnost u vezi sa položajem i brojem OH grupa.

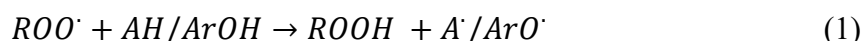
Flavonoidi su sekundarni metaboliti biljaka sa polifenolnom strukturom, imaju malu toksičnost i veoma su rasprostranjeni u biljkama. Identifikovano je više od 4000 vrsta flavonoida, od kojih su mnogi odgovorni za atraktivne boje cvetova, plodova i listova (de Groot i Rauen, 1998). Pokazalo se da flavonoidi imaju višestruku biološku aktivnost, uključujući antimikrobnu, citotoksičnu, antiinflamatornu i antitumorsku aktivnost, međutim, gotovo svaka grupa flavonoida pokazuje izuzetnu antioksidativnu aktivnost i mogućnost da ljudski organizam zaštiti od slobodnih radikala. Sposobnost flavonoida da deluju kao antioksidansi zavisi od njihove strukture i položaja hidroksilnih grupa koja može biti različita (Bors i sar., 1990). Flavonoidi svoj vodonikov atom predaju radikalima i na taj način prekidaju slobodno radikalsku reakciju. Oni sami postaju slobodni radikali, ali su stabilizovani rezonantnim strukturama i nemaju dovoljno energije da pokrenu lančanu reakciju sa supstratom. Flavonoidi se sintetišu u biljkama kao odgovor na mikrobiološke infekcije (Kumar i Pandey, 2013) i poseduju i u *in vitro* uslovima antimikrobnu aktivnost u odnosu na veliki broj mikroorganizama. Flavonoidi se u prirodi uglavnom javljaju kao glikozidi ili metil derivati, a ređe slobodni. Mogu se podeliti u šest podgrupa u zavisnosti od stepena oksidacije centralnog piranovog prstena (C), kao i od položaja sekundarnog aromatičnog prstena i to na: flavonole, flavone, izoflavone, flavanone, antocijanidine i flavanole (slika 2.2).

2.4.2. Spektrofotometrijske metode za određivanja antioksidativne aktivnosti gljiva

Antioksidansi se mogu naći u širokom spektru prehrambenih proizvoda, a njihova aktivnost može da varira u zavisnosti od temperature, sastava i strukture hrane. Ovi faktori mogu da dovedu do promene aktivnosti pa je potrebno odrediti antioksidativni potencijal.

Ne postoji univerzalna metoda kojom se precizno i kvantitativno može meriti antioksidativna aktivnost. Zbog toga je važno razviti veći broj metoda kako bi se što preciznije odredila antioksidativna aktivnost odabrane namirnice. Takođe, na rezultate antioksidativne analiza utiče polarnost, pH i priroda rastvarača, odnosno mogućnost doniranja vodonikovog atoma slobodnim radikalima i samim antioksidansima koji mogu postati radikalne vrste nakon reakcije sa slobodnim radikalima (Charles, 2013).

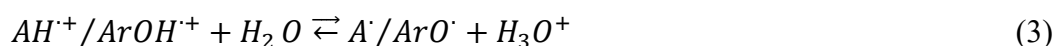
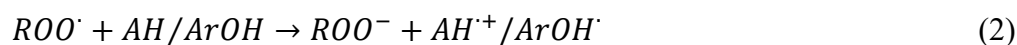
Antioksidansi svoju aktivnost iskazuju direktnim vezivanjem („hvatanjem”) slobodnih radikala predajom H – atoma (jednačina 1) i redukcijom slobodnih radikala doniranjem jednog elektrona (jednačine 2–4).



Testovi koji uključuju reakcije prenosa H-atoma su veoma brzi i pH ne utiče na mehanizam reakcije. Prisustvo redukcionih sredstava, uključujući metalne jone, može dovesti do povećane aktivnosti u HAT testovima (Prior i sar., 2005).

U ovu grupu metoda spadaju: ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity), TRAP (Total Radical Trapping Antioxidant Parameter), Crocin test izbeljivanja, inhibirajuća potrošnja kiseonika (Inhibited Oxygen Uptake, IOU) i inhibicija oksidacije linoleinske kiseline.

Testovi koji se baziraju na SET mehanizmu koriste se za procenu sposobnosti antioksidanasa da redukuju metale, karbonilna jedinjenja i radikale (Wright i sar., 2001). Relativna reaktivnost bazirana je na deprotonizaciji i jonizacionom potencijalu funkcionalne grupe (Prior i sar., 2005). Ove reakcije zavise od pH vrednosti. Reakcije koje se odigravaju po ovom mehanizmu su znatno sporije i kod njih se antioksidativna aktivnost određuje na osnovu smanjenja koncentracije proizvoda reakcije.



U ovu grupu metoda spadaju: TEAC (*Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*), DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil), ABTS (2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina)), FRAP (*Ferric ion Reducing Antioxidant Parameter*), CUPRAC (*Cupric Reducing Antioxidant Capacity*), određivanje ukupnih fenola Folin-Ciocalteu (Folin–Sjoklto) reagensom (Charles, 2013).

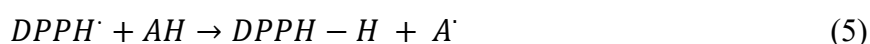
2.4.2.1. Određivane antioksidativne aktivnosti „hvatanjem” DPPH radikala

DPPH test se zasniva na spektrofotometrijskom određivanju antioksidativne aktivnosti merenjem sposobnosti antioksidanasa da neutrališu slobodne radikale. Prvi koji je ovu metodu uveo bio je Marsden Blois, 1958. godine, ali je njena široka primena počela sa Brand-Williams i njegovim saradnicima 1995 (Brand-Williams i sar., 1995) koji su je pojednostavili. DPPH je radikal (DPPH[•]) koji se dosta koristi za određivanje antioksidativne aktivnosti. Pripada grupi organskih, azotovih radikala (Pyrzynska i Pekal, 2013).

Za razliku od drugih radikala ove vrste, 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil je stabilan radikal što je posledica delokalizacije nesparenog elektrona, pa se kod ovog molekula ne javlja dimerizacija što bi bio slučaj kod većine drugih slobodnih radikala (Molyneux, 2004). Apsorpcioni maksimum etanolnog rastvora je na talasnoj dužini od 515 nm.

Prior i sar. (2005) su predložili dva moguća mehanizma uklanjanja DPPH radikala :

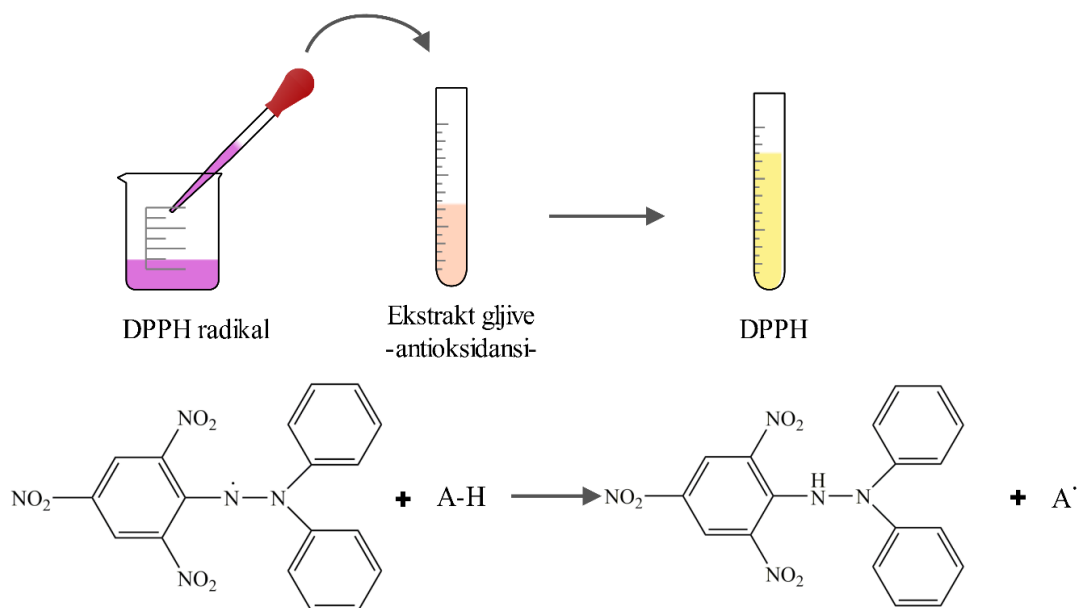
1. prenosom vodonika (HAT) (jednačina 5)



2. prenosom elektrona (SET) (jednačina 6)



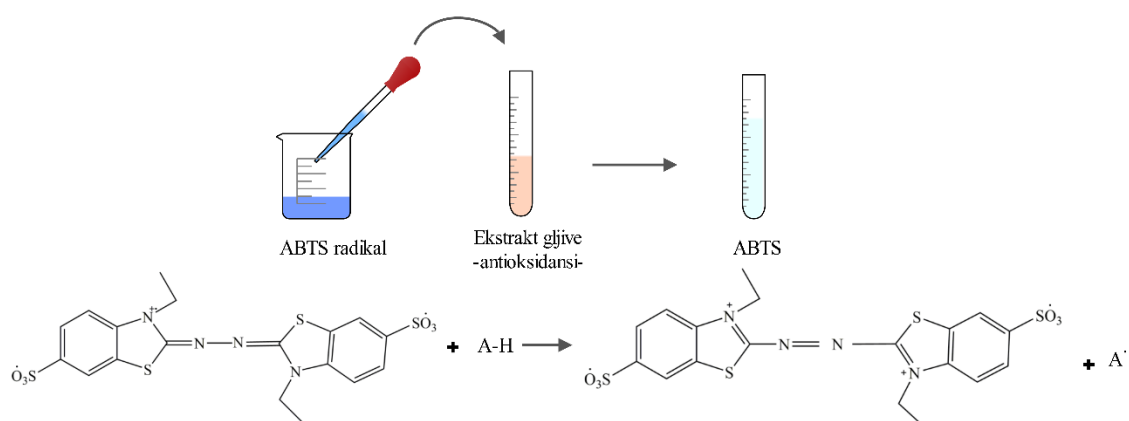
Medijum u kojem se odvija reakcija, veličina, polarnost i kiselost fenolnih hidroksilnih grupa određuju hoće li se reakcija odvijati SET ili HAT mehanizmom. U reakciji 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikala sa antioksidansom dolazi do stvaranja 2,2-difenil-1-pikrilhidrazina, jedinjenja žute boje (slika 2.4). Za razliku od drugih testova koji se koriste za određivanje antioksidativne aktivnosti, veća apsorbancija reakcione smeše u ovom testu znači nižu antioksidativnu aktivnost. Razlog ove pojave je nedostatak antioksidanasa u analiziranom uzorku koji bi reagavali sa DPPH radikalom, i na taj način smanjili apsorpciju. Tako da se može reći da je apsorbancija obrnuto proporcionalna koncentraciji antioksidanasa u ispitivanom uzorku.



Slika 2.4 Određivanje antioksidativne aktivnosti ekstrakta gljiva „hvatanjem” DPPH radikala

2.4.2.2. Određivane antioksidativne aktivnosti „hvatanjem” ABTS radikala

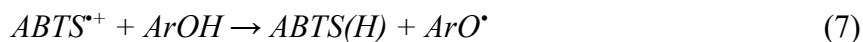
DPPH i ABTS testovi spadaju u najpopularnije metode određivanja antioksidativne aktivnosti. Re i sar. (1999) su modifikovali već postojeću metodu pomoću persulfata kao oksidanta i na taj način je unapredili i omogućili širu primenu. Način delovanja ABTS metode je sličan mehanizmu DPPH, ali se ovde kao radikal koristi plavo-zeleno obojeni radikal katjon 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonske kiseline) ABTS^{•+} koji se formira oksidacijom rastvora ABTS i njegova aktivnost se meri na talasnoj dužini od 734 nm (slika 2.5).



Slika 2.5 Određivanje antioksidativne aktivnosti ekstrakta gljive „hvatanjem” ABTS^{•+} radikal katjona

ABTS metoda otkrivena je 1993. godine prilikom određivanja antioksidativne aktivnosti plazme odraslih ljudi i dece. ABTS katjon radikal može reagovati po SET i HAT mehanizmu kao što je prikazano prema jednačinama 7 i 8:

1. prenosom vodonika (HAT)



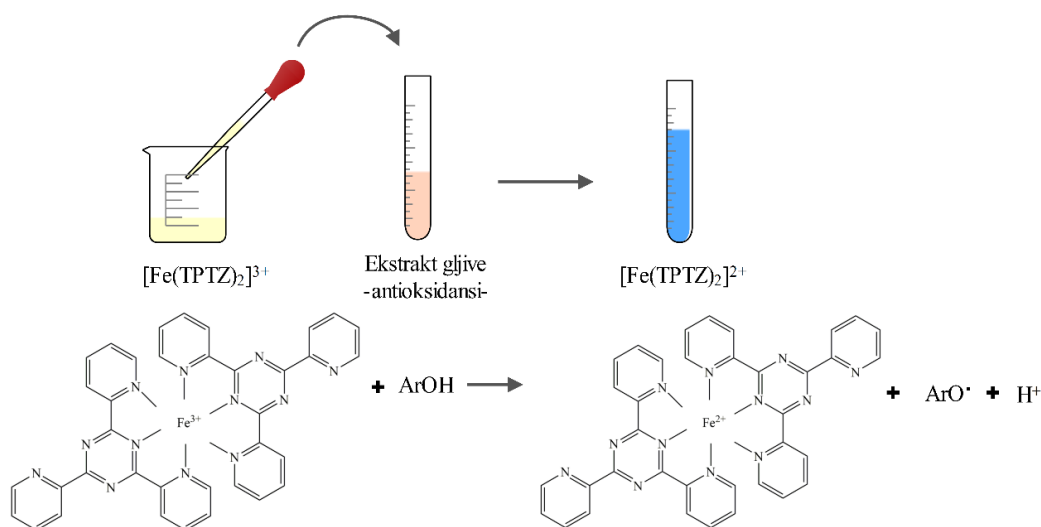
2. prenosom elektrona (SET)



Uopšteno gledano, ABTS test je pogodan za hidrofilne i lipofilne antioksidanse dok je DPPH pogodniji za procenu hidrofobnih sistema (Kim i sar., 2002). Takođe, ABTS test se može koristiti pri različitim pH vrednostima uzorka što je pogodno onda kada se ekstrakcija vrši kiselim rastvaračima.

2.4.2.3. Određivanje redoks aktivnosti primenom FRAP testa

Redoks potencijal ili redukciona moć antioksidanasa je važan indikator antioksidativne efikasnosti i meri se kroz reakciju redukcije različitih metalnih jona, kao što su gvožđe, bakar, hrom i cerijum (Shahidi i Zhong, 2015). FRAP metoda se zasniva na principu povećanja apsorbancije reakcione smeše koja se javlja kao posledica redukcije Fe^{3+} jona, koji je vezan u kompleksu žute boje, $[Fe(TPTZ)_2]^{3+}$, do Fe^{2+} jona, u obliku plavo obojenog kompleksa, $[Fe(TPTZ)_2]^{2+}$, od strane antioksidanasa (slika 2.6). Koncentracija antioksidanasa je proporcionalna apsorbanaciji koja se meri na 595 nm.

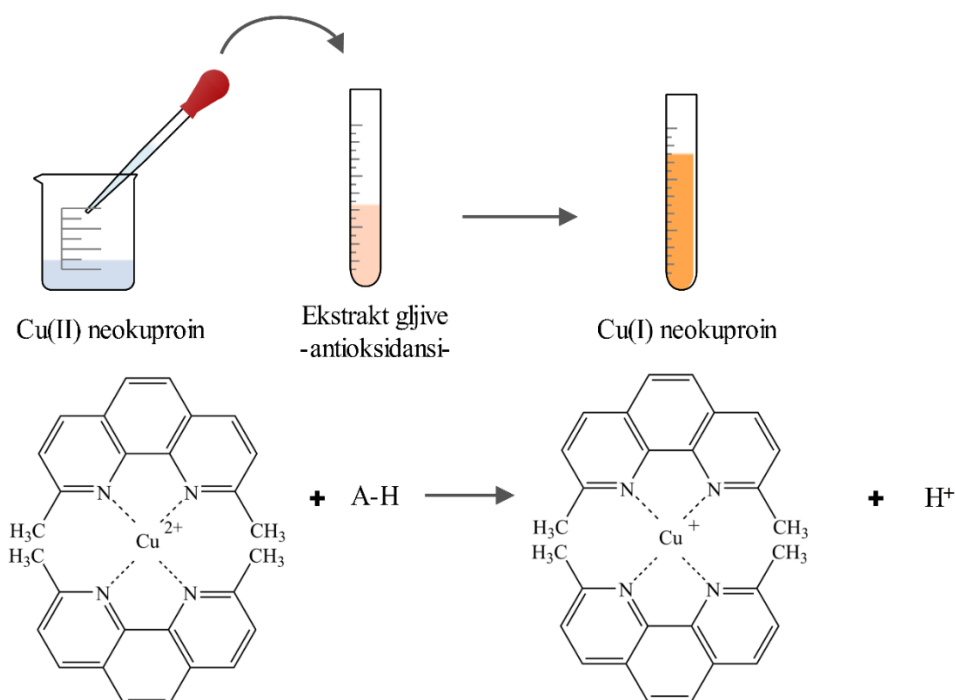


Slika 2.6 Određivanje redoks potencijala ekstrakta gljive primenom FRAP testa

FRAP test je jednostavan, brz i isplativ i ne zahteva specijalizovanu opremu. Međutim, Pulido i sar. (2000) su objavili da se rezultati FRAP testa mogu razlikovati u zavisnosti od vremena očitavanja, koje se kretalo od nekoliko minuta do nekoliko sati. Zato se apsorbancija u jednoj tački ne može smatrati krajnjom tačkom reakcije, jer različiti antioksidansi zahtevaju različita vremena reakcije (Prior i sar., 2005). Rezultati FRAP metode su različiti sa obzirom na rastvarač u kojima se odvija reakcija. FRAP metoda ne meri tiolne antioksidanse kao što je glutation. Uvećane FRAP vrednosti se mogu javiti ukoliko se ispitivani uzorak sastoji od jedinjenja koja apsorbuju na istoj talasnoj dužini.

2.4.2.4. Određivanje redoks aktivnosti CUPRAC testom

CUPRAC metoda je razvijena kao druga varijanta FRAP testa, i to je metoda koja koristi kompleks *bis* neokuproin Cu(II) katjon. Metoda se zasniva na merenju apsorbancije helata Cu(I)-neokuproina nastalog kao rezultat redoks reakcije antioksidanasa sa hromogenim oksidacionim reagensom na maksimalnoj talasnoj dužini apsorpcije svetlosti od 450 nm (slika 2.7).



Slika 2.7 Određivanje redoks potencijala ekstrakta gljive primenom CUPRAC testa

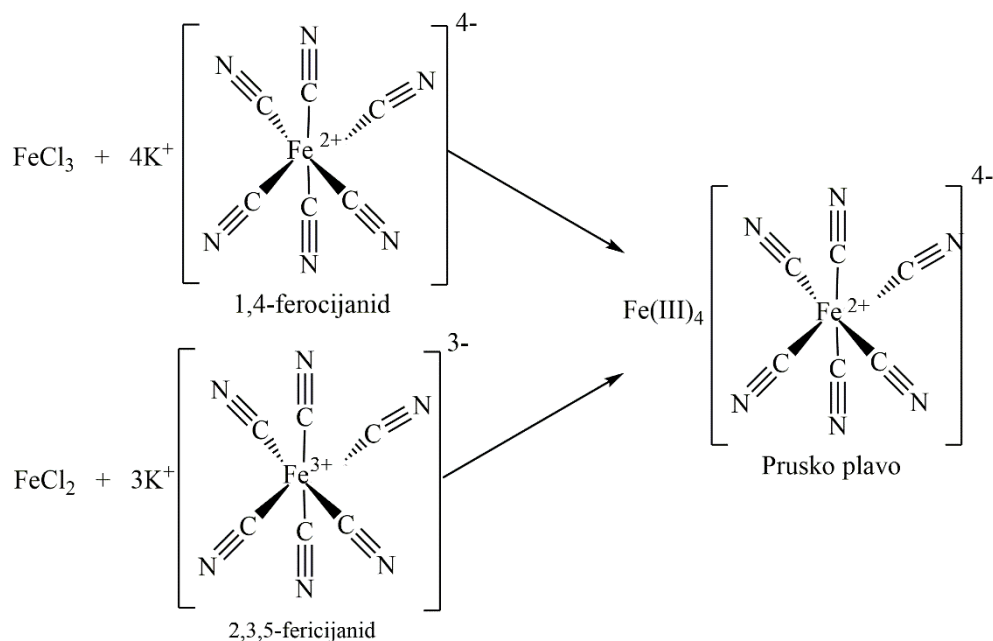
Od osam kriterijuma koje je predložio Prior i sar. (2005), za definisanje idealno standardizovane metode za merenje antioksidativne aktivnosti, CUPRAC metoda ispunjava šest. Pre svega metoda je jednostavna. Instrumenti koji se koriste su dostupni. Može se koristiti za širok spektar polifenola, uključujući fenolne kiseline, flavonoide, karotenoide, antocijane,

kao i za tiole, sintetičke antioksidanse i vitamine C i E (Özyürek i sar., 2011). Prednost je jasnoća krajnje tačke i mehanizma kao i mogućnost za rutinske analize.

U poređenju sa drugim reagensima prednost ovog reagensa je što ne zavisi od prirode fenolnih jedinjenja, sternih efekata, pH vrednosti reakcionog sistema i prisustva dnevne svetlosti (Apak i sar., 2004; Apak i sar., 2005). Takođe, reagens je selektivan jer ima manji redoks potencijal od onih iz Folinovih ili drugih oksidantnih reagensa koji se zasnivaju na Fe^{2+} jonima (Charles, 2013).

2.4.2.5. Određivanje ukupne redukcionne sposobnosti

Redukciona sposobnost nekog jedinjenja može biti značajano merilo njegove antioksidativne aktivnosti. Merjenja redukcionne sposobnosti, zasnovano na merenju obojenog proizvoda reakcije poznatog kao „prusko plavo” $\text{Fe}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]_3$, na talasnoj dužini od 700 nm, omogućava određivanje koncentracije antioksidanasa u analiziranom uzorku. „Prusko plavo” nastaje kao krajnji proizvod koji se kvantitativno određuje spektrofotometrijski i ukazuje na redukcionu moć testiranih antioksidanata. „Prusko plavo” se može graditi na dva načina. Antioksidansi mogu ili redukovati Fe^{3+} do Fe^{2+} jona, koji se zatim vezuju za heksacijanoferat(II) i daju „prusko plavo”, ili redukuju heksacijanoferat(III) do heksacijanoferata(II), koji zatim vezuju slobodni Fe^{3+} u rastvoru i formiraju gvožđe(III)-heksacijanoferat(II) – „prusko plavo” (slika 2.8) (Shahidi i Zhong, 2015). Formiranje plave boje je sporo, a maksimalni intenzitet boje postignut je nakon 30 min.



Slika 2.8 Nastanak kompleksa $\text{Fe}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]_3$, poznatim pod nazivom „prusko plavo”

2.4.3. Određivanje ukupnog sadržaja fenolnih jedinjenja i flavonoida

Od svih prirodnih antioksidanasa, polifenolna jedinjenja pokazuju najbolju sposobnost „hvatanja” slobodnih radikala i smatra se da imaju važan doprinos antioksidativnoj aktivnosti. Na osnovu sadržaja fenola u nekom uzorku može se predvideti antioksidativna aktivnost, pa je zbog toga veoma važno odrediti ukupan sadržaj fenolnih jedinjenja. Jedan od najčešćih načina je spektrofotometrijski. Folin i Ciocalteu (Folin i Ciocalteu, 1927), su dali originalnu metodu za određivanje fenolnih jedinjenja u uzorcima koja je kasnije bila modifikovana od strane Singletona (Singleton i sar., 1999). Ova metoda je veoma jednostavna, jeftina, ponovljiva i može se koristiti za raznolike uzorke. Zahvaljujući redukciji hidroksilnih grupa u fenolnim jedinjenjima, nastaje fenoksidni anjon, koji redukuje Folin-Ciocalteu reagens u baznoj sredini. Karbonatni pufer se koristi za podešavanje pH vrednosti i krajnja tačka reakcije je najpre merena nakon 120 min na sobnoj temperaturi, da bi nakon modifikacije korišćena reakciona temperatura ($T = 37^{\circ}\text{C}$) kako bi se smanjilo vreme potrebno za postizanje maksimalnog intenziteta boje. Ova metoda se zasniva na merenju promene žute boje Folin-Ciocalteu reagensa do tamno-plave u prisustvu antioksidanasa na talasnoj dužini od 750–765 nm. U alkalnoj sredini se ovaj reagens brzo raspada pa je neophodno koristiti veliki višak reagensa kako bi reakcija bila kvantitativna (Blainski i sar., 2013). Ova metoda pruža precizne i specifične podatke za nekoliko grupa fenolnih jedinjenja, jer mnoga jedinjenja menjaju boju drugačije zbog razlika u molekulskoj masi (Glasl, 1983).

Flavonoidi su jedna od najraznovrsnijih grupa prirodnih jedinjenja koja spadaju u grupu sekundarnih metabolita. Imaju sposobnost da neutrališu štetne efekte slobodnih radikala u tkivima pa se zato smatra da štite od oksidativnog stresa (Bandyopadhyay i sar., 2007). Ukupan sadržaj flavonoida se može odrediti spektrofotometrijskim merenjem apsorbancije kompleksa koji se formira u reakciji aluminijum hlorida sa flavonoidima. Kompleks flavonoid–aluminijum ima maksimalnu absorbancu na talasnoj dužini od 520 nm.

2.5. TEHNIKE ODREĐIVANJA

2.5.1. Optička emisiona spektrometrija sa induktivno spregnutom plazmom

Spektrometrija indukovano spregnute plazma (ISP) je analitička tehnika koja se koristi za određivanje elementa u uzorcima različitog porekla. Ova metoda kao izvor pobuđivanja elemenata koristi indukovano spregnutu plazmu koja nastaje zagrevanjem ili podvrgavanjem neutralnog gasa jakom elektromagnetnom polju pri čemu nastaje jonizovana i provodljiva gasna supstanca. ISP ima visoku efikasnost jonizacije i proizvodi pozitivne jone. Za proizvodnju plazme se najčešće koristi argon, inertan gas sa velikom energijom jonizacije. Ovaj izvor odlikuje velika stabilnost, mala pozadinska emisija i mogućnost simultanog određivanja veoma niskih koncentracija više od 70 elemenata (Hill, 2007).

Plazmenik (eng. *torch*) u kome se formira plazma sastoji se od tri koaksijalne kvarcne cevi. Ispitivani uzorak zajedno sa argonom koji služi kao noseći gas se uvodi u unutrašnju cev. Kroz srednju cev se uvodi argon koji se koristi za formiranje plazme, dok je spoljašnja cev najšira i kroz nju struji pomoćni gas (argon, azot ili vazduh) koji služi za hlađenje i stabilizovanje plazme. Indukcioni kalem koji se nalazi oko spoljašnje cevi je povezan sa radiofrekventnim generatorom koji stvara oscilujuće magnetno polje koje stvara oscilujuću struju u jonima i elektronima nosećeg gasa. Ovi joni i elektroni sudarima prenose energiju na atome nosećeg gasa radi stvaranja plazme sa vrlo visokom temperaturom koja varira od 6000 do 10000 K. Kod ISP tehnike uzorak koji se analizira treba da bude u obliku rastvora. Visoka temperatura plazme omogućava isparavanje rastvarača, pobuđivanje i jonizuju atoma. Stepem jonizacije nekog elementa u ISP-u zavisi od snage izvora, brzine protoka nosećeg i plazmenog gasa, položaja posmatranja tačke u plazmi i potencijala jonizacije elemenata (Dean, 2005).

Optička emisiona spektrometrija (OES) se zasniva na ispitivanju zračenja koju emituje analizirana supstanca kada se uvede u plazmu argona na visokoj temperaturi. Kako je ISP i kvalitativna i kvantitativna tehnika, svaki atom elementa unešen u plazmu postaje toplotno pobuđen i emituje svetlost koja mora da se prevede u električni signal, koji se može kvantitativno izmeriti. Ovo se postiže razdvajanjem svetlosti pomoću optičke rešetke, a zatim merenjem intenziteta svetlosti na specifičnoj talasnoj dužini za svaku liniju elemenata. U spektrometru se signal pojačava i intenzitet elektronskog signala se određuje na osnovu intenziteta standarda čija je koncentracija tačno poznata i koji je prethodno snimljen. Jedan element može imati više specifičnih talasnih dužina koje bi se mogle koristiti za analizu, pa odabir najbolje linije zavisi od iskustva analitičara koji radi analizu.

Prednost ove tehnike jeste mogućnost da identifikuje i kvantifikuje sve elemente periodnog sistema osim argona koji se koristi kao noseći gas. Takođe, mogućnost određivanja širokog opsega koncentracija, od mikro do makro koncentracija, čine ovu metodu vrlo pogodnom za rutinske analize većine metala. Mogućnost brzog, simultanog multielementnog određivanja je velika prednost u odnosu na ostale metode analize. Širok opseg linearnosti (4–6 redova veličine), dobra osetljivost, niske granice detekcije (ppb), visoka tačnost i preciznost (relativna standardna devijacija-RSD približno 1%), odlična reproduktivnost, velika brzina rada uz mali utrošak uzorka i jednostavnost izvođenja analiza su još neke od prednosti koje ovu tehniku čine veoma popularnom pri analitičkom određivanju elementnog sastava ispitivanog uzorka (Stefanović, 2016).

Iako se u teoriji primenom ove tehnike mogu odrediti svi elementi osim argona, za određivanje nekih elementa potrebne su posebne mere rukovanja. Takođe, pri radu sa halogenim elementima potrebna je posebna optika za prenošenje vrlo kratkih talasnih dužina. Nedostatak ove tehnike je svakako i mogućnost određivanja samo tečnih uzoraka, kao i spektralne i hemijske smetnje, skupa instrumentacija i veliki utrošak inertnog gasa.

2.5.2. Induktivno spregnuta plazma sa masenom spektrometrijom

Kombinacija indukovano spregnute plazme sa masenom spektrometrijom (ISP-MS) je tehnika koja se koristi za određivanje niskih koncentracija (ppb) i ultra niskih koncentracija elemenata (ppt). (Stefanović, 2016). Prednosti ove metode se ogledaju u multielementnoj analizi, širokom dinamičkom opsegu (istovremeno se mogu odrediti koncentracije elemenata u ppm i ppb), niskom detekcionom limitu (ppb i ppt opseg), brzini analize, velikoj matriks toleranciji, dobijanju informacija o izotopima (Dean, 2005).

Analiza induktivno spregnutom plazmom sa masenom spektrometrijom (ISP-MS) obuhvata pet osnovnih koraka: stvaranje aerosola, jonizaciju uzoraka u plazmi, ekstrakciju jona kroz interfejs region, razdvajanje jona po odnosu masa/neelektrisanje i detekciju jona (Thomas, 2008).

Kao i kod ISP-OES metode, i ovde se uzorak koji se analizira mora prevesti u rastvor i preko sistema za uvođenje se uvodi u ISP-MS. Uzorak se uvodi u plazmu argona kao aerosol, pri čemu se zbog visoke temperature plazme, od 6000 do 8000 K, uklanja rastvarač i dolazi do atomizacije i jonizacije uzorka. Na ovaj način, agregatno stanje uzorka se menja od tečnog aerosola do gasovitog stanja.

Samo mali deo jona proizvedenih u plazmi dospeva do masenog spektrometra. Transport jona iz plazme do masenog spektrometra je najkritičniji deo analize i naziva se interfejsni region. On u ISP–MS sistemu prenosi jone koji putuju u struji argona iz plazme koja je na atmosferskom pritisku i visokoj temperaturi u oblast niskog pritiska masenog spektrometra. Ovaj proces se vrši kroz srednji vakuum region pri čemu je glavna funkcija ovog regiona da fokusira jonski snop ka masenom spektrometru pomoću elektrostatičkih sočiva.

Kada joni jednom uđu u maseni spektrometar, oni se razdvajaju prema odnosu mase i naelektrisanja (m/z odnos). Način razdvajanja zavisi od vrste masenog analizatora koji se koristi, ali glavni cilj jeste da se željeni joni odvoje od jona argona, rastvarača i matriksa.

Nakon masenog spektrometra nalazi se detektor koji prevodi broj jonskih udara u električni signal, tako da svi joni koji su razdvojeni na osnovu m/z bivaju detektovani. Koncentracija analita se određuje na osnovu standarda koji je prethodno analiziran istom metodom.

2.5.3. Hromatografija

Hromatografija je tehnika razdvajanja smeše koja se sastoji od velikog broja različitih ili sličnih komponenti. Osnovni elementi hromatografskog sistema su analizirana supstanca, stacionarna i mobilna faza (Milovanović, 1985). Razdvajanje supstanci iz smeše zasniva se na različitom vremenu kretanja različitih komponenata smeše kroz kolonu koje nastaje kao posledica različite raspodele analita između mobilne i stacionarne faze. U zavisnosti od hemijske prirode i ponašanja razdvajanih vrsta supstanci, one će se u različito vreme eluirati iz kolone.

U prvo vreme se hromatografija koristila samo za razdvajanje komponenti smeše i njihovo prečišćavanje, ali je razvoj tehničkih performansi hromatografije omogućio i analizu nakon njihovog razdvajanja.

U zavisnosti od agregatnog stanja mobilne faze, hromatografija se može podeliti na tečnu i gasnu hromatografiju. Odabir tehnike se vrši u zavisnosti od prirode supstance koja se analizira.

Tečna hromatografija obuhvata:

- tečnu hromatografiju pod visokim pritiskom
- tečnu hromatografiju na koloni
- hromatografiju na tankom sloju
- hromatografiju na hartiji

2.5.3.1. Hromatografija visoke efikasnosti

Cilj razdvajanja u analitičkoj hromatografiji je dobijanje kvantitativne i kvalitativne informacije o analitu u uzorku. Vrlo često je uzorak koji se analizira kompleksan i sadrži širok spektar komponenti sa promenljivom rastvorljivošću te stoga priprema uzorka i metode odvajanja moraju biti visoko selektivne i osetljive. Ovi zahtevi su zadovoljeni primenom hromatografije visoke efikasnosti.

Hromatografija visoke efikasnosti (*High Performance Liquid Chromatography – HPLC*) je jedna od najčešćih korišćenih analitičkih tehnika. To je nedestruktivna tehnika koja tokom analize ne menja hemijsku prirodu analita, pa je pogodna kako za kvalitativnu tako i za kvantitativnu analizu. Takođe se može opisati kao brza i efikasna tehnika sa visokom tačnošću, preciznošću i niskom granicom detekcije.

S obzirom da HPLC omogućava višekomponentnu analizu, trebalo je povećati selektivnost i rezoluciju u odnosu na klasičnu tečnu hromatografiju. To je postignuto primenom mikro čestica prečnika 2–5 µm, ili poroznim monolitnim materijalom kojim se puni stacionarna faza što je dovelo do pada pritiska u koloni (Rouessac i Rouessac, 2007). Kako bi se uspostavila ravnoteža između stacionarne i mobilne faze, kao i kontinualni protok tečne faze bilo je potrebno delovati visokim ulaznim pritiskom na mobilnu fazu. Visok pritisak mobilne faze omogućio je lako odvajanje širokog spektra hemijskih smeša.

U koloni se smeša razdvaja na komponente (Skoog i Leary, 1992). Nivo rezolucije zavisi od stepena interakcije između komponenata rastvora i stacionarne faze. Izborom različitih rastvarača i stacionarnih faza može se uticati na pomenutu interakciju (Lindsay i Barnes, 1992), i na taj način poboljšati ili pogoršati razdvajanje sastojaka smeše.

Snajder je HPLC opisao kao dinamički proces adsorpcije komponenti (Snyder i Dolan, 1996). Analit nošen tečnom fazom kroz poroznu stacionarnu fazu, pokazuje kompetitivna svojstva sa molekulima eluenta kako bi stupio u interakciju sa adsorpcionim mestima površine.

Kako bi razdvajanje bilo što uspešnije potrebno je, u zavisnosti od analita, odrediti odgovarajuću mobilnu fazu kao i vrstu adsorbensa za stacionarnu fazu. U zavisnosti od ovih karakteristika HPLC metoda se može podeliti na:

- HPLC na normalnim fazama (*HPLC normal phase*)
- HPLC na obrnutim fazama (*HPLC reverse phase*)

HPLC na normalnim fazama predstavlja razdvajanje molekula na osnovu njihove interakcije sa polarnom stacionarnom fazom i nepolarnom mobilnom fazom, a koristi se kada je supstanca koja se analizira polarna. Polarne supstance se adsorbuju na česticama stacionarne

faze i jačina adsorpcije je veća što je veća polarnost supstance, a samim tim je veće i vreme zadržavanja.

HPLC na obrnutim fazama kao stacionarnu fazu koristi nepolarne supstance, najčešće je to C-18, i polarnu mobilnu fazu. U ovoj vrsti hromatografije se najduže zadržavaju nepolarna jedinjenja koja se adsorbuju za stacionarnu fazu, dok polarna, koja se slabo adsorbuju, nošena polarnom mobilnom fazom se brže eluiraju. U HPLC na obrnutim fazama osnovni rastvarač je obično voda. Ostali polarni rastvarači kao što su metanol, acetonitril ili tetrahidrofuran se dodaju u fiksnim ili promenljivim proporcijama, kako bi se regulisala brzina eluiranja.

2.5.4. UV/Vis spektrofotometrija

Ultraljubičasta/vidljiva (UV/VIS) spektrofotometrija spada u grupu apsorpcionih tehnika kod koje se prate promene spektra elektromagnetnog zračenja u opsegu talasnih dužina od 200 nm do 800 nm.

Spektrofotometrija u vidljivoj oblasti se može koristiti samo za obojene i bistre rastvore. Apsorpcija svetlosti se može koristiti u analitičkoj hemiji za kvalitativno i kvantitativno određivanje supstanci. Kako se koristi oblast talasnih dužina od 200 nm do 800 nm, spektrofotometrija ima ograničenu primenu u kvalitativnoj analizi organskih molekula, a široku primenu u kvantitativnoj analizi primenom Lamber–Berovog zakona (Todorović i sar., 1997), po kome je dobijena apsorbancija linearna funkcija koncentracije ispitivane supstance i dužine optičkog puta zračenja (jednačina 9).

$$A = \log(I_0/I) = \varepsilon \cdot l \cdot c \quad (9)$$

A – apsorbancija

I_0 – intenzitet upadnog zračenja

I – intenzitet propuštenog zračenja

ε – molarni koeficijent apsorpcije

c – koncentracija supstance

l – dužina optičkog puta

2.6. STATISTIČKA ANALIZA

Prilikom bilo kakvog opsežnog istraživanja u laboratoriji dobija se set podataka karakterističnih za pojedini uzorak. Kako bi se što bolje razumeli dobijeni podaci i eliminisali rezultati koji su eventualno posledica grubih grešaka, poslednjih godina se sve više koristi statistička obrada podataka. Statistika se definiše i kao numerička mera koja opisuje karakteristike uzorka (Berenson i sar., 2011). Razvoj kompjutera i kompjuterskih programa doprineo je većoj primeni statistike. Sama statistička analiza podataka nikako ne predstavlja zamenu za hemijske, biohemijske, fizičke, biološke i druge analize, koje se tradicionalno primenjuju u ispitivanjima prehrambenih proizvoda (Pastor, 2018).

Keler (2014) je statistiku podelio u dve celine: na deskriptivnu koja ima zadatak da sažima podatke u lako razumljivu celinu i statističko zaključivanje koje podrazumeva izvođenje zaključaka o skupu na osnovu uzorka podataka. Karakteristike uzorka koje se proučavaju nazivaju se varijable (Babbie, 2009), i one predstavljaju promenljive osobine ispitivanog uzorka – varijabilnost. U početku su se u statističkoj obradi rezultata istovremeno koristile samo dve varijable tako da je statistika predstavljala deskriptivnu analizu podataka. Sa razvojem tehnike i pojavom analize gde je kao rezultat dobijan set podataka sa mnogo više varijabli došlo je do razvoja multivarijantne statističke analize (MVS) koja ima zadatak da odredi odnos više varijabli. Multivarijantna analiza se, dakle, može definisati kao umeće izdvajanja hemijski relevantnih informacija iz mnoštva podataka koji se dobijaju različitim hemijskim eksperimentima, koristeći pri tome statistička i matematička sredstva (Pastor, 2018).

Za razliku od tradicionalnih statističkih metoda, multivarijantna statistička analiza omogućava višestruki pristup koji uključuje detekciju skrivenih veza između promenljivih i odvajanje korisnih od beskorisnih informacija. Sve MVS metode mogu se podeliti u dve grupe: konfirmatorne metode (tzv. *supervised*) koje proveravaju da li postoji odnos između zavisnih i nezavisnih varijabli, i istraživačke (tzv. *non-supervised*). Konfirmatorne metode imaju karakterističan odnos među varijablama, tj. prati se varijacija zavisnih varijabli od nezavisnih.

Za razliku od konfirmativnih, istraživačke metode određuju strukturu skupa podataka na osnovu merenja, utvrđuju da li postoji odnos između varijabli koje imaju podjednaku važnost i sve se posmatraju kao nezavisne. Ove međuzavisne metode su bitne jer omogućavaju otkrivanje na prvi pogled, skrivenih veza među kompleksnim podacima. One otkrivaju šablon grupisanja među analiziranim podacima i ukazuju na varijable koje imaju najizraženiji uticaj na formiranje ovakvih šablona (Aparicio i Aparicio-Ruiz, 2002). U ovu grupu metoda spadaju:

analiza glavnih komponenti, klaster, faktorska i korespodentna analiza, strukturne jednačine i multidimenzionalno skaliranje.

Primenom MVS smanjuje se broj podataka i dobijaju se korisne informacije koje olakšavaju interpretaciju različitih hemijskih i fizičkih analitičkih podataka.

2.6.1. Korelaciona analiza

Korelaciona analiza je statistička metoda kojom se utvrđuje da li između posmatranih varijabli postoji statistički značajna veza i koliki je stepen zavisnosti. Mera povezanosti dve varijable predstavlja koeficijent korelacije, koji pokazuje da li između varijacija dve varijable postoji kvantitativno slaganje. Ovaj parametar ne ukazuje na stepen promene jedne varijable koja nastaje kao posledica promene druge varijable. Postoje dve vrste koeficijenata, Pirsonov koeficijent linearne korelacije (r) koji se koristi kod varijabli kod kojih postoji linearna povezanost i neprekidna normalna distribucija, i Spirmanov koeficijent korelacije ranga (r_o) koji se koristi kada između varijabli ne postoji linearna korelacija i kada se promenljive ne mogu transformacijom prevesti u linearnu zavisnost.

Vrednosti koje može imati Pirsonov koeficijent su u intervalu od -1 do +1. Kada među varijablama postoji pozitivna korelacija (pozitivni predznak), to ukazuje da sa porastom jedne, raste vrednost druge promenljive i obrnuto, dok kod negativne korelacije (negativni predznak) odnos varijabli je obrnuto proporcionalan što znači da kada vrednost jedne promenljive raste druge opada i obrnuto. Stepem, tj. jačina povezanosti varijabli je određena apsolutnom vrednošću koeficijenta. Što je stepen korelacije veći jača je veza između promenljivih i određivanjem vrednosti jedne varijable sa velikom sigurnošću može se odrediti i vrednost druge. Stepem korelacije se određuje pomoću dijagrama rasipanja kod koga vrednosti za promenljive zauzimaju položaj prave linije u koordinatnom sistemu ukoliko je korelacija među promenljivama visoka, ili su nasumično raspoređene ukoliko je korelacija niska.

Postojanje ili odsustvo korelacija između istih jedinjenja može biti dobar pokazatelj očekivane količine datog jedinjenja u određenim uslovima koji dominiraju na staništu, pa tako biti od značaja za izbor populacija kada se obavljaju ciljane analize (Bajić-Ljubičić, 200). Takođe, korelacija između različitih jedinjenja može biti indikativna za povezanost njihovih biosintetskih puteva, odnosno učesće u sličnom adaptivnom mehanizmu (Ciu i sar., 2006). I u jednom i u drugom slučaju, dobijene informacije ukazuju na specifičnost ispitivanih vrsta kao i na raspodelu pojedinih jedinjenja u njima.

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

Analiza glavnih komponenti je statistička metoda koja se koristi kod opsežnih istraživanja gde se kao rezultat dobija skup kompleksnih podataka koji se matematičkom transformacijom redukuju na manji broj promenljivih, a da pri tome zadržavaju prvobitne informacije. Time, ne samo što je smanjen broj promenljivih u analizi, već se ostvaruje i napredak u razumevanju strukture fenomena koji se izučava, pa se može reći da metoda glavnih komponentata predstavlja istraživačko sredstvo pomoću koga se generišu hipoteze o proučavanom fenomenu (Bulajić, 2002).

Glavni cilj PCA metode jeste uočavanje teško primetnih faktora u originalnom setu podataka radi lakše interpretacije podataka. Drugi zadatak jeste određivanje nekoliko linearnih kombinacija originalnih promenljivih koje će, osim toga što imaju maksimalnu varijansu, biti međusobno nekorelisane i pritom će što je moguće manje gubiti informaciju sadržanu u skupu originalnih promenljivih (Radojičić, 2001). Kao krajnji rezultat analize dobijaju se transformisane promenljive koje se nazivaju glavne komponente i predstavljaju linearnu kombinaciju originalnih promenljivih. Ukupan broj novoformiranih glavnih komponenti jednak je broju polaznih varijabli. Međutim, nisu sve glavne komponente od velike važnosti, tačnije samo prve glavne komponente sadrže značajne informacije.

Prva glavna komponenta, PC1, se izdvaja sa najvećim udelom varijanse originalnih promenljivih, dok se sve naredne glavne komponente formiraju tako što obuhvataju maksimalni udeo preostalih promenljivih.

Svaka glavna komponenta opisana je svojstvenim vektorom (eng. *eigenvector*), koji je određen svojstvenom vrednošću (eng. *eigenvalue*). Svojstvena vrednost određuje količinu varijacije opisanu pomoću faktorskih koordinata, pri čemu najveći uticaj ima prva komponenta (Arfken, 1985). Prva glavna komponenta uvek ima najveću svojstvenu vrednost. Prilikom analize neophodno je odrediti broj svojstvenih vrednosti. Broj značajnih komponenti se može odrediti primenom kriterijuma koji je postavio Kajzer (Kaiser, 1960) po kome su bitne glavne komponente one, čija je svojstvena vrednost veća od jedinice. Glavne komponente sa malom svojstvenom vrednošću najčešće objašnjavaju grešku pri merenju.

Pošto je jedan od ciljeva PCA metode lakša interpretacija podataka onda je mogućnost grafičkog prikazivanja dobijenih podataka od velike važnosti. PCA dijagram se sastoji od većeg ili manjeg broja tačaka koje predstavljaju ispitivane varijable koje ukoliko su blizu jedna drugoj ukazuju na sličnost ispitivanog uzorka ili na različitost ukoliko su udaljene.

Vektori koji opisuju promenljivu svojom orijentacijom u prostoru ukazuju na rastuću vrednost te promenljive, dok ugao vektora između promenljivih pokazuje stepen korelacije koja je veća što je ugao manji.

Takođe, na osnovu kvadrata kosinusa ugla između dva vektora varijabli može se odrediti njihova međusobna korelacija. Kada je ova vrednost $> 0,8$ smatra se da su najbolje predstavljena svojstva, između $0,8$ i $0,6$ – svojstva koja su dobro prezentovana, između $0,6$ i $0,4$ – svojstva osrednje prezentovana i vrednosti $< 0,4$ slabo prezentovana svojstva.

2.6.3. Klaster analiza (*Cluster Analysis* – CA)

Klaster analiza je statistička tehnika u okviru multivarijacione analize koja se primenjuje u cilju smanjenja obima analiziranih podataka (npr. eksperimentalnih rezultata), a čija je primarna svrha grupisanje podataka u klaster na osnovu karakteristika koje poseduju (Apostolov, 2014). Grupisanje podataka zavisi od odabrane metode, pa je moguće klasifikovati podatke na osnovu njihove sličnosti ili različitosti. Izbor metode isključivo zavisi od istraživača i od toga šta želi da prikaže klaster analizom. Bez obzira na odabir metode krajnji cilj je uvek isti a to je objedinjavanje objekata u veće, homogene grupe ili klaster.

Prema primenjenim algoritmima na osnovu kojih se vrši grupisanje, klaster analiza se može podeliti na hijerarhijsku i nehijerarhijsku analizu. Razlika između ova dva modela ogleda se u načinu povezivanja. Hijerarhijska metoda se zasniva na izračunavanju udaljenosti između objekata, nakon čega sledi tehnika spajanja tih objekata u grupe, pa zatim spajanje bliskih grupa dok se svi ne spoje u jednu veliku grupu koja se prikazuje grafički u obliku dendrograma (Mrmošanin, 2019).

Hijerarhijske metode grupisanja mogu biti aglomerativne i divizione. Najčešće korišćena metoda grupisanja jeste aglomerativna kod koje se svaka jedinica posmatra kao posebna grupa koja se na osnovu sličnosti povezuje u veći klaster, dok se ne dobije jedan jedinstven klaster. Divizionna tehnika je tehnika razdvajanja i kod nje se od jednog klastera u kome su sadržani svi podaci dobija grupa manjih klastera.

Metode povezivanja pod-klastera mogu se razlikovati i zavise od ispitivanih podataka i posebne svrhe njegove primene. Mogu biti:

Metoda jednostrukog povezivanja (eng. *Single linkage clustering – nearest neighbor*) se zasniva na najvećoj sličnosti među posmatranim objektima, tj. na njihovoj najmanjoj udaljenosti. Formira se klaster i upoređuje se njihova sličnost sa sledećim objektom posmatranja i na taj način se dobijaju klasteri „dugih lanaca”. Metoda potpunog povezivanja

(eng. *Complet linkage clustering*) se zasniva na najmanjoj sličnosti, tj. povezuju se najrazličitiji objekti sa najvećom distancom.

Metoda varijansi (*Ward's method*) se zasniva na analizi varijanse i kod nje se razdaljina između dva klastera određuje kao suma kvadrata između svih varijabli koje čine taj klaster. Dva klastera se povezuju u jedan ukoliko je njihovim udruživanjem došlo do minimalnog povećanja sume kvadrata unutar klastera u odnosu na povećanje sume kvadrata koje bi se javilo da je došlo do udruživanja ma koja dva druga klastera.

Nehijerarhijska analiza je manje zastupljena u prirodnim naukama i koristi se kada broj podataka koji se analizira prelazi 200. Princip ovog grupisanja je suprotan od hijerarhijskog. Najpre se određuje centralni klaster u kome se nalaze sve jedinice posmatranja, a zatim se određuje drugi klaster i ukoliko su objekti posmatranja bliži njemu, raspoređuju se u drugi klaster (Nikolić, 2018).

Kada se želi povezivanje objekata bitno je odrediti stepen rastojanja između objekata. To se može izračunati primenom različitih matematičkih proračuna ali je najzastupljenija Euklidova (jednačina broj 10).

$$\text{rastojanje } (x, y) = \sqrt{(x - y)' \cdot (x - y)} = \sqrt{\sum_{i=1}^p (x_i - y_i)^2} \quad (10)$$

Eksperimentalni deo

3.1. PRIKUPLJANJE UZORAKA GLJIVA

Sve gljive proučavane u okviru ove doktorske disertacije su samonikle i jestive, sakupljane u šumama Nišavskog okruga u periodu od 2014–2018. godine, tabela 3.1.

Prikupljeni materijal je očišćen od zemlje i insekata, nakon čega je pregledan i determinisan od strane mikološkog udruženja Naissus – Niš pod supervizijom Marjana Kuštere. Plodonosna tela (drška i šeširić) su isečena na tanke listiće i liofilizirana 24h do konstantne mase. Osušeni uzorci su čuvani na sobnoj temperaturi i mračnom mestu do analize kada su samleveni do finog praha.

3.2. INSTRUMENTACIJA

Spisak korišćenih aparata za analizu hemijskih karakteristika i antioksidativne aktivnosti odabranih vrsta gljiva je sledeći:

Za analizu mineralnog sastava gljiva: ISP-OES spektrometar, model 6500 Duo, proizvođača Thermo Scientific, UK, i ISP-MS spektrometar iCAP Q, proizvođača Thermo Scientific X series 2, UK.

Za analizu fenolnih kiselina: HPLC Agilent Technologies 1200 Series, proizvođača Agilent Technologies, SAD, sa Zorbax-Eclipse XDB-C18 kolonom, dimenzija 4,6×150 mm, G1354A pumpom, G1329A automatskim injektorom, G1316A termostatiranim kolonskim delom i G1315D UV/VIS detektorom.

Za određivanje antioksidativne aktivnosti: spektrofotometar tipa Lambda 15, proizvođača Perkin Elmer, dvoznačni sa dužinom optičkog puta 1cm.

-Uzorci gljiva za određivanje mineralnog sastava su pripremani pomoću: mikrotalasne peći Ethos 1, Advanced Microwave Digestion System, proizvođača Milestone, Italija, koja poseduje 10 mesta za teflonske kivete.

-Aparat za dobijanje dejonizovane vode: MicroMed, proizvođača Thermo Fisher Scientific Inc, Nemačka.






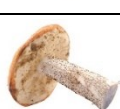







-Za sušenje uzoraka: liofilizator, Christ tip, Nemačka.

-Za ekstrakciju uzoraka: ultrazvučno kupatilo proizvođača Maget Bela Palanka.

-Za centrifugiranje: Centrifuga Z306, proizvođača Hermle LaborTechnik GmbH, Nemačka.

-Za uparavanje ekstrakata: vakuum uparivač IKA RV 05 basic, proizvođača Werke, Nemačka.

Tabela 3.1 Podaci o proučavanim vrstama gljiva

Vrsta	Slika	Porodica	Rod	Stanište	Lokacija
<i>Boletus edulis</i> Bull.		Boletaceae	Boletus	Listopadne, jelove i smrekine šume	Ploče
<i>Xerocomellus chrysenteron</i> (Bull.) Šutara		Boletaceae	Xerocomellus	Hrastova i bukova šuma	Ploče
<i>Imperator rhodopurpureus</i> (Smotl.)		Boletaceae	Imperator	Listopadne šume	Ploče
<i>Rubroboletus rhodoxanthus</i> (Krombh.) Blanco-Dios		Boletaceae	Rubroboletus	Hrastova i bukova šuma	Ploče
<i>Butyriboletus appendiculatus</i> (Schaeff.) D. Arora & J.L. Frank		Boletaceae	Butyriboletus	Hrastova i bukova šuma	Ploče
<i>Leccinum aurantiacum</i> (Bull.) Gray		Boletaceae	Leccinum	Listopadne šume	Ploče
<i>Leccinum albostipitatum</i> den Bakker & Noordel.		Boletaceae	Leccinum	Topoline šume	Ploče
<i>Hemileccinum impolitum</i> (Fr.) Šutara		Boletaceae	Hemileccinum	Hrastova šuma	Ploče
<i>Lactarius semisanguifluus</i> R. Heim & Leclair		Russulaceae	Lactarius	Jeline i borove šume	Sićevačka klisura
<i>Lactarius sanguifluus</i> (Paulet) Fr.		Russulaceae	Lactarius	Borove šume	Sićevačka klisura
<i>Lactarius deliciosus</i> (L.) Gray		Russulaceae	Lactarius	Borove šume	Sićevačka klisura
<i>Lactifluus volemus</i> (Fr.) Kuntze. 1891		Russulaceae	Lactifluus	Listopadne i četinarske šume	Ploče
<i>Lactarius piperatus</i> (L.) Pers.		Russulaceae	Lactifluus	Listopadne i četinarske šume	Ploče

3.3. REAGENSI

Za analizu gljiva u ovom radu korišćene su sledeće hemikalije:

- Multielementarni osnovni rastvor–Merck®, Nemačka;
- Internal Standard Mix rastvora–VHG standardi, UK;
- Argon, čistoće 99,999%–Messer, Sebia;
- CRM--sertifikovan referentni materijal (ERM-CD281 (ražana trava), As, Cd, Cr, Cu, Hg, Mn, Ni, Pb i Zn)-JRC-IRMM, Belgija;
- dejonizovana voda, dobijena Milli-Q sistemom, izmerene provodljivosti (18 MΩ) sa sadržajem ukupnog organskog ugljenika manjim od 10 µg/dm³.
- *p*-hidroksibenzoeva kiselina–Sigma-Aldrich, Nemačka
- Hlorogena kiselina–Sigma-Aldrich, Nemačka
- Vanilinska kiselina–Sigma-Aldrich, Nemačka
- Kafena kiselina–Sigma-Aldrich, Nemačka;
- Siringinska kiselina–Sigma-Aldrich, Nemačka
- *p*-kumarna kiselina–Sigma-Aldrich, Nemačka
- Ferulna kiselina–Sigma-Aldrich, Nemačka;
- DPPH–Sigma-Aldrich, Nemačka;
- Troloks–Sigma Aldrich, SAD;
- ABTS–Sigma-Aldrich, Nemačka;
- K₂S₂O₈–Merck®, Nemačka;
- FeSO₄×6H₂O–Acros Organics, SAD;
- TPTZ–Sigma-Aldrich, Nemačka;
- Hloridna kiselina–Merck®, Nemačka;
- FeCl₃×6H₂O–Merck®, Nemačka;
- CH₃COONa·3H₂O–Merck®, Nemačka;
- K₃[Fe(CN)₆]–Merck®, Nemačka;
- CH₃COOCl₃–Merck®, Nemačka;
- Askorbinska kiselina–Merck®, Nemačka;
- Na₂HPO₄–Merck®, Nemačka;
- NaH₂PO₄–Merck®, Nemačka;
- Na₂CO₃–Merck® Nemačka;
- Galna kiselina–Mallinckrodt, Nemačka;
- Folin-Ciocalteu reagens–Merck®, Nemačka;
- AlCl₃–Merck®, Nemačka;
- NaNO₂–Merck®, Nemačka;
- NaOH–Merck®, Nemačka);
- Katehin–Sigma-Aldrich, Nemačka;
- Rutin–Fluka, Nemačka;
- Kvercetin–Sigma Aldrich, Nemačka;
- CuCl₂–Merck®, Nemačka;
- CH₃COONH₄–Merck®, Nemačka;
- Neokuproin–Merck®, Nemačka;
- Metanol–J. T. Baker, Holandija;

- Etanol–J. T. Baker, Holandija;
- Etil-acetat–Merck®, Nemačka;
- Acetonitril–Sigma Aldrich, Nemačka;
- Heksan–J. T. Baker, Holandija;
- Dimetil-sulfoksid–Merck®, Nemačka;
- Hloroform–Sigma Aldrich, Nemačka;
- Mravlja kiselina–Merck®, Nemačka;
- Sirćetna kiselina–Merck®, Nemačka;
- KOH–Merck®, Nemačka;
- 12% BF₃ u metanolu–Sigma Aldrich, Nemačka;
- MgSO₄–Sigma Aldrich, Nemačka;

3.4. POSTUPAK PRIPREME UZORAKA

3.4.1. Postupak mineralizacije gljiva

Mineralizacija gljiva vršena je postupkom mikrotalasne digestije i to na sledeći način: na analitičkoj vagi je odmeravano po 0,2500 g sprasenog uzorka gljive. Uzorci su zatim prenešeni u teflonske kivete, i u svaku je dodavano po 7 mL 65% HNO₃ i 1 mL 30% H₂O₂. Digestija je vršena po sledećem programu: temperatura je u prvih 10 minuta postepeno povećavana do 200 °C, da bi u narednih 15 minuta držana konstantnom. Nakon digestije, uzorci su hlađeni, kvantitativno prenošeni u normalne sudove od 25 mL i razblaživani dejonizovanom vodom do crte.

3.4.2. Priprema metanolnog ekstrakta za HPLC analizu

Uzorci od po 3 g liofilizirane i fino samlevene gljive ekstrahovani su ultrazvučno sa 40 mL metanola (80%, v/v) četiri puta po 15 minuta, na 25 °C. Ekstrakti su zatim spajani i centrifugirani 15 minuta na 12 000 rpm. Dobijeni supernatanti su filtrirani i upareni do suva na rotacionom vakuum uparivaču (40 °C).

3.4.2.1. Hidroliza fenolnih kiselina

Hidroliza dobijenih ekstrakata vršena je sa 5 mL H₂SO₄ u metanolu (koncentracije 0,05 mol/L) uz mešanje i zagrevanje na magnetnoj mešalici na 80 °C (uz refluks) 2 sata. Nakon hidrolize, smeša je ostavljena da se ohladi, a zatim je neutralisana NaOH (koncentracije 1 mol/L) do pH=7.

Ekstrakcija fenolnih kiselina rađena je etil-acetatom, 5×10 mL, uz dodavanje zasićenog rastvora NaCl radi boljeg raslojavanja. Etil-acetatni sloj je osušen bezvodnim MgSO₄ i uparen do suva na rotacionom vakuum uparivaču (40 °C). Suvi ostatak je rastvoren u dimetil-sulfoksidu (100 mg suvog ekstrakta/1 mL DMSO).

3.4.3. Priprema metanolnog, etanolnog i vodenog ekstrakta za određivanje antioksidativne aktivnosti

Nakon finog usitnjavanja odmerene su porcije od po 1 g suve gljive i prelivane sa 30 mL odgovarajućeg rastvarača (metanol, etanol i dejonizovana voda). Ekstrakcija je izvršena ultrazvučno na 25 °C, četiri puta po 15 minuta, nakon čega su uzorci ostavljeni u mraku na sobnoj temperaturi. Nakon dvadesetčetvoročasovne maceracije dobijeni ekstrakti su filtrirani kroz Whatman no. 42 filter papir, a zatim upareni na rotacionom vakuum uparivaču na 45 °C. Suvi ostatak je izmeren i rastvoren u dimetil-sulfoksidu (20 mg suvog ekstrakta/1 mL DMSO).

3.5. METODE

3.5.1. ISP-MS i ISP-OES analize

Određivanje makro elemenata (Ca, Fe, K, Na i P) izvršeno je na optičkom emisionom spektrometru sa indukovano spregnutom plazmom, ICAP-6500 Duo, dok su koncentracije svih ostali elementa određivane ISP-MS spektrometrom. Instrumentalni i radni uslovi snimanja dati su u tabeli 3.2.

Tabela 3.2 Uslovi snimanja na ISP-MS-u i ISP-OES-u

ISP OES (iCAP 650)	
Snaga generatora (W)	1150
Raspršivač	koncentričan
Komora za raspršivanje	ciklonska
Protok argona (L/min)	12
Pomoćni protok argona (L/min)	0,5
Brzina protoka raspršivača (L/min)	0,5
Brzina unošenja uzorka (mL/min)	1
Detektor	CID86
Izabrane talasne dužine (nm)	Fe (259,9); Al (167,0); Cr(27,0); Mn (259,3); Co (228,6); Ni (231,6); Cu (324,7); Zn (213,8); Sr (407,7); Ti (334,9); Cd (226,5); Ba (455,4); Pb (216,9); Ca (373,6); Mg (279,5); Na (589,5); K (766,4)
ISP MS (iCAP Q MS)	
Snaga generatora (W)	1548
Protok gasa (L/min)	13,9; 1,09; 0,8
Acquisition time	3 x 50 s
Points per peak	3
Dwell time (ns)	10
Detector mod	Pulsni
Ponavljanja	3
Mereni izotopi	⁷ Li, ²⁷ Al, ⁵² Cr, ⁵⁵ Mn, ⁵⁹ Co, ⁶⁰ Ni, ⁶⁵ Cu, ⁶⁶ Zn, ⁷¹ Ga, ⁷⁵ As, ⁷⁸ Se, ⁸⁵ Rb, ⁸⁸ Sr, ¹¹¹ Cd, ¹³⁷ Ba, ²⁰² Hg, ²⁰⁸ Pb, ²⁰⁹ Bi

Multielementni osnovni rastvor koji je korišćen za pravljenje serije standardnih rastvora za ISP-OES merenja sadržao je Ca, Fe, K, Na i P koncentracije 1,000 g/L, dok je multielementni osnovni rastvor korišćen za ISP-MS merenja sadržao 22 elementa koncentracije 10 mg/L. Interni standardi Li, Sc (koncentracije 50 µg/L) i Bi, Ga, Y, Tb, In (koncentracije 10 µg/L) su pripremljeni od Internal Standard Mix rastvora.

Tačnost analitičke metode određena je korišćenjem referentnog materijala ERM-CD281 (ražana trava) za koje je sertifikovan sadržaj sledećih elemenata: As, Cd, Cr, Cu, Hg, Mn, Ni, Pb i Zn i koji je pripremljen na isti način kao i sami uzorci. Svi eksperimenti su rađeni u tri ponavljanja i rezultati određivanja prikazani u tabeli 3.3.

Tablela 3.3 Tačnost određivanja elemenata ISP-MS metodom (srednja vrednost±SD)

Element	Sertifikovana vrednost (mg/kg)	Nađena vrednost (mg/kg)	Tačnost (%)
As	0,042±0,010	0,04±0,010	95,24
Cd	0,12±0,007	0,117±0,031	97,50
Cr	24,8±1,3	24,2±1,5	97,58
Cu	10,2±0,5	9,8±0,8	96,08
Hg	0,0164±0,0022	0,010±0,005	60,98
Mn	82±4	78± 8	95,12
Ni	15,2±0,6	14,9±0,7	98,03
Pb	1,67±0,11	1,6±0,10	95,81
Zn	30,5±1,1	29,1± 0,5	95,41

3.5.2. Analiza fenolnih kiselina

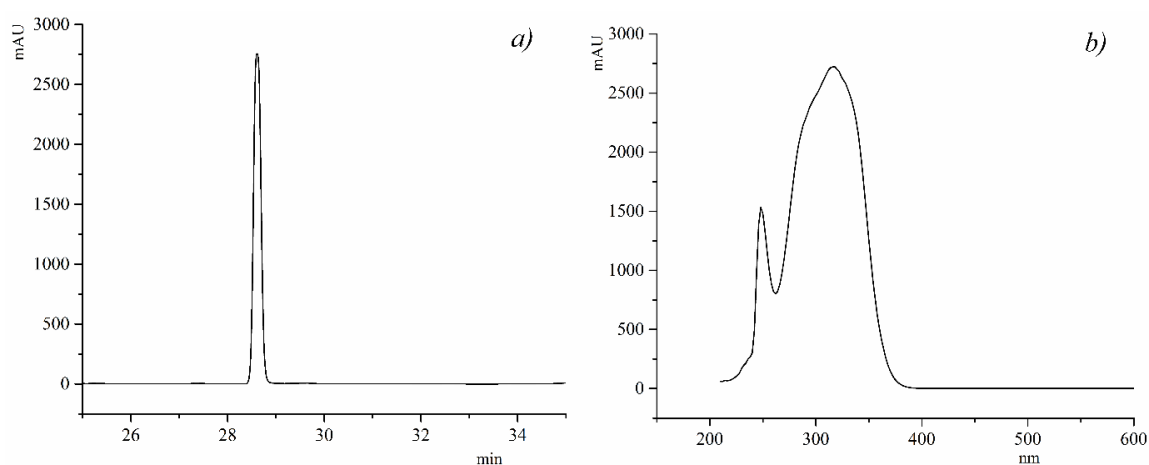
Sadržaj fenolnih kiselina (*p*-hidroksibenzoeva, kafena, vanilinska, hlorogena, siringinska, *p*-kumarna i ferulna kiselina) u hidrolizatima analiziranih vrsta gljiva utvrđen je primenom tečne hromatografije visoke efikasnosti prema metodi Mitić i sar. (2012). Za ovu analizu korišćen je HPLC aparat, Agilent-1200 serije, sa ZORBAX Eclipse XDB-C18 kolonom (4,6×150 mm) koja je korišćena za razdvajanje komponenata a detekcija razdvojenih pikova je vršena pomoću detektora sa serijom dioda (Diode Array Detector, DAD), snimljenih na 280 i 320 nm.

Razdvajanje komponenata vršeno je sledećim sistemom rastvarača: A – 5% rastvor mravlje kiseline i B – 80% acetonitril, 5% mravlje kiseline i 15% voda, sa brzinom protoka

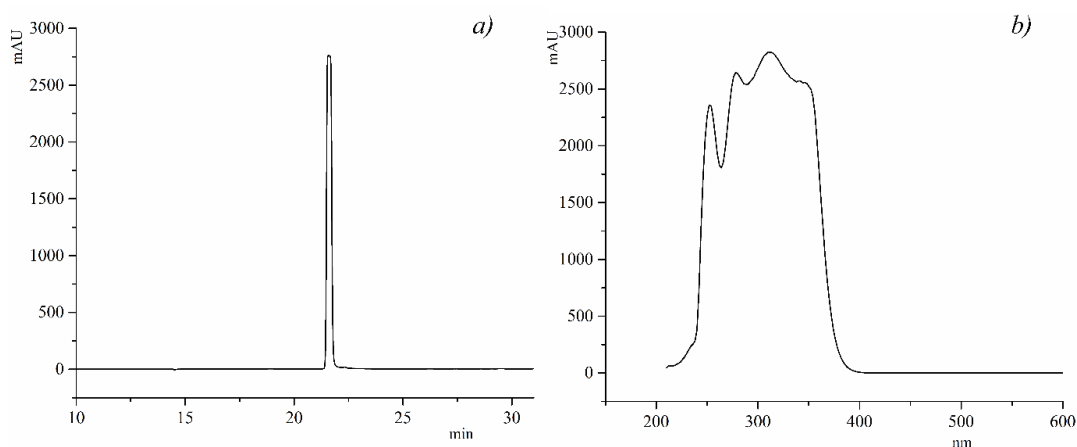
eluenta od 0,8 mL/min. Radi što boljeg razdvajanja komponenata korišćen je gradijentni mod sa sledećim odnosima rastvarača : 0–10 minuta 0% B, 10–28 minuta 0–25% B, od 28 do 30 minuta 25% B, od 30 do 35 minuta povećanje sa 25 na 50% B, od 35 do 40 minuta povećanje sa 50 na 80% B. U poslednjih 5 minuta dolazi do smanjenja rastvora A sa 80 na 0%. Za analizu je injektovano 5 μ L rastvora uzorka primenom autosemplera.

Kvalitativna analiza urađena je poređenjem retencionih vremena pikova uzoraka gljiva i izgleda UV spektara sa retencionim vremenima i UV spektrima standarda.

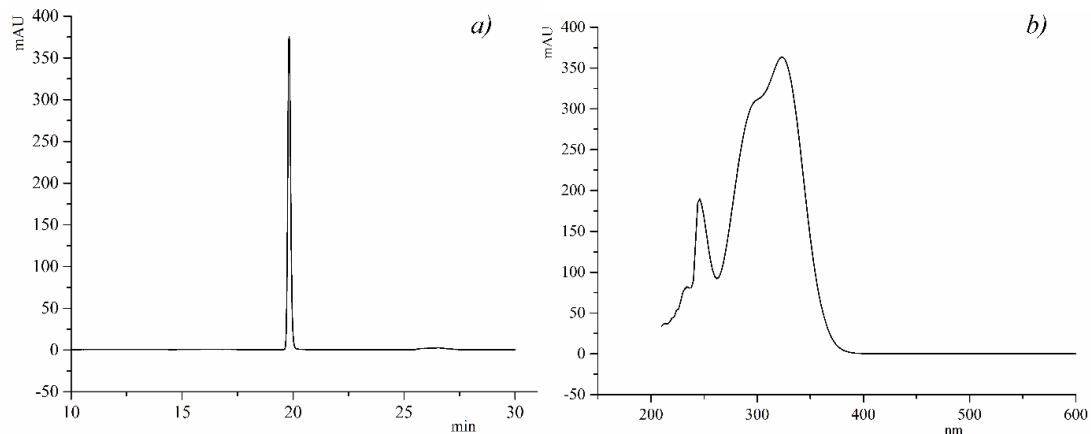
Na slikama 3.1–3.7 su prikazani hromatogrami i UV-VIS spektri korišćenih standarda fenolnih kiselina.



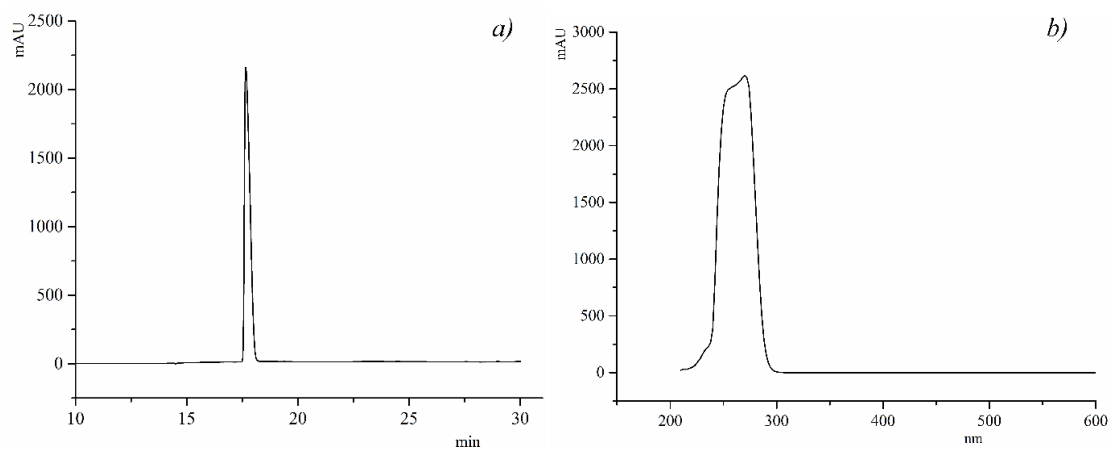
Slika 3.1 Standard ferulne kiseline a) HPLC hromatogram b) UV/Vis spektar



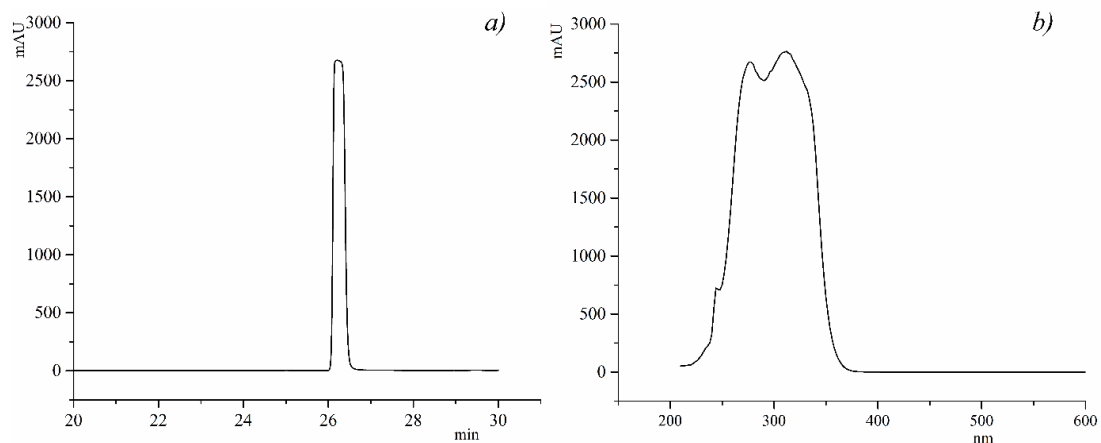
Slika 3.2 Standard chlorogene kiseline a) HPLC hromatogram b) UV/Vis spektar



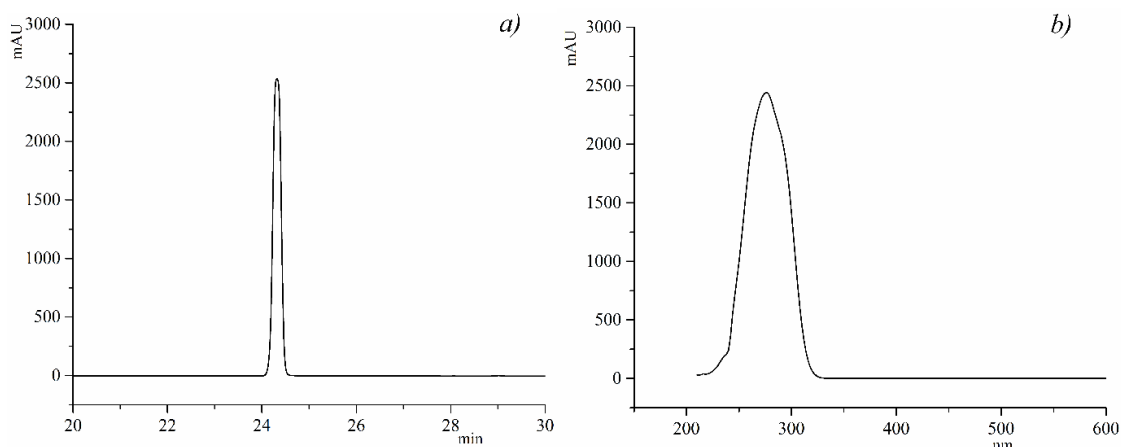
Slika 3.3 Standard kafene kiseline a) HPLC hromatogram b) UV/Vis spektar



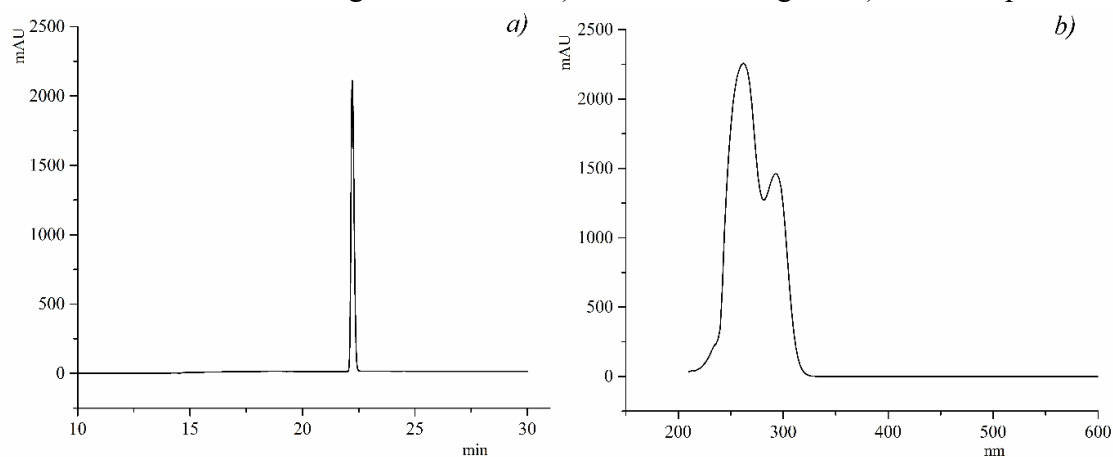
Slika 3.4 Standard *p*-hidroksibenzoeve kiseline a) HPLC hromatogram b) UV/Vis spektar



Slika 3.5 Standard *p*-kumarne kiseline a) HPLC hromatogram b) UV/Vis spektar



Slika 3.6 Standard siringinske kiseline a) HPLC hromatogram b) UV/Vis spektar



Slika 3.7 Standard vanilinske kiseline a) HPLC hromatogram b) UV/Vis spektar

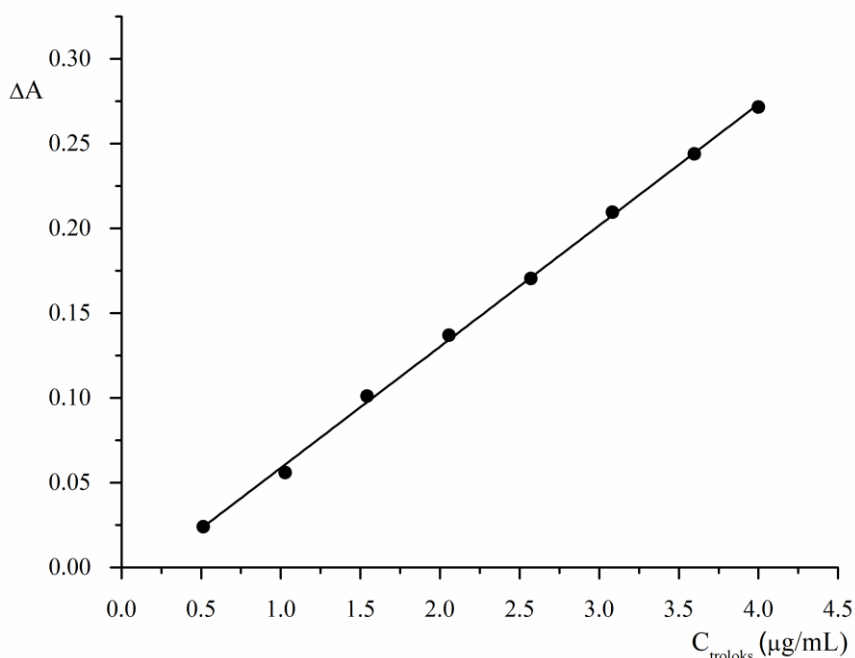
Kvantitativna analiza je izvršena na osnovu hromatografske analize, metodom kalibracione prave. Pripremljen je osnovni rastvor svakog standarda pojedinačno, koncentracije 1 mg/mL i od njega serija razblaženih rastvora (0,1–1 mg/mL) standarda svake od fenolnih kiselina. Kalibraciona prava je dobijena kao zavisnost površine pikova od koncentracije standarda, na osnovu koje su kasnije izračunate masene koncentracije komponenata u analiziranim uzorcima gljiva.

3.5.3. Spektrofotometrijske metode za određivanje antioksidativne aktivnosti primenom različitih testova, ukupnog sadržaja polifenolnih jedinjenja i flavonoida

3.5.3.1. Određivanje antioksidativne aktivnosti primenom DPPH testa

Određivanje antioksidativne aktivnosti primenom DPPH radikala rađeno je po metodi Brand-Wiliams i sar., 1995, uz male modifikacije. U 100 μL svakog ispitivanog ekstrakta (koncentracije 20 mg/mL) dodat je 1,5 mL metanolnog rastvora DPPH radikala (koncentracije 100 $\mu\text{mol/L}$) a zatim je metanolom dopunjeno do ukupne zapremine od 4 mL. Uzorci su dobro promešani i ostavljeni u mraku, na sobnoj temperaturi sat vremena. Nakon inkubacije apsorbancija dobijenog rastvora je merena na talasnoj dužini od 515 nm. Manja apsorbancija ukazuje na veću antioksidativnu aktivnost uzoraka.

Antioksidativna aktivnost uzoraka da neutrališu slobodan DPPH radikal određen je na osnovu kalibracione prave sintetičkog antioksidansa-troloksa. Napravljena je serija standardnih rastvora (koncentracije 0,5–4 $\mu\text{g/mL}$) (slika 3.8) iz koje je izračunata antioksidativna aktivnost ispitivanih ekstrakata i izražena kao μg troloks ekvivalenta po mg suvog ekstrakta ($\mu\text{g TE/mg se}$).

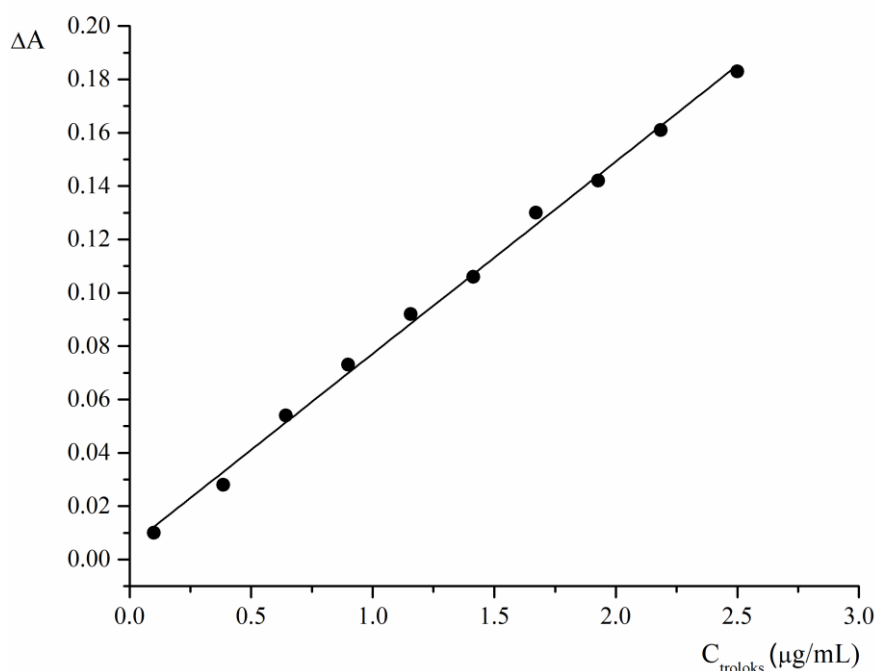


Slika 3.8 Kalibraciona prava za određivanje antioksidativne aktivnosti prema DPPH radikalu

3.5.3.2. Određivanje antioksidativne aktivnosti primenom ABTS testa

Određivanje antioksidativne aktivnosti primenom ABTS radikala rađeno je prema metodi Dimitrijević i sar. (2015). Najpre je potrebno napraviti radni rastvor ABTS u metanolu, koji se dobija mešanjem sveže napravljenih rastvora ABTS (koncentracije 7 mmol/L) i $K_2S_2O_8$ (koncentracije 2,4 mmol/L) u odnosu 1:1 (v/v). Dobijeni rastvor stoji u mraku, na sobnoj temperaturi, najmanje 16 h a zatim se razblažuje metanolom tako da na talasnoj dužini od 734 nm vrednost apsorbancije iznosi $0,700 \pm 0,050$. Ovako pripremljen rastvor predstavlja radni rastvor koji se dalje koristi za određivanje antioksidativne aktivnosti.

U ispitivane ekstrakte zapremine 100 μ L (koncentracije 20 mg/mL) dodato je 1,8 mL radnog rastvora ABTS i dopunjeno metanolom do zapremine od 4 mL. Nakon mešanja dobijeni rastvori su ostavljeni na tamnom mestu 6 minuta, a zatim je apsorbancija merena na talasnoj dužini od 734 nm. Manja apsorbancija ukazuje na veću antioksidativnu aktivnost uzoraka. Za izračunavanje antioksidativne aktivnosti korišćena je kalibraciona prava dobijena pravljenjem serije rastvora standarda troloks (koncentracije 0,1–2,5 μ g/mL) (slika 3.9) i rezultati su izraženi kao μ g troloks ekvivalenta po mg suvog ekstrakta (μ g TE/mg se).

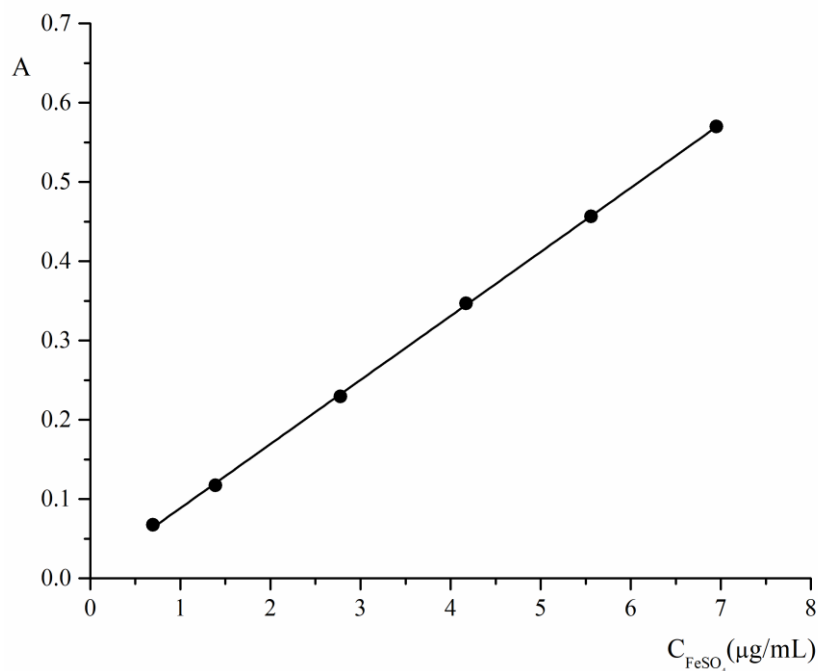


Slika 3.9 Kalibraciona prava za određivanje antioksidativne aktivnosti prema ABTS radikal katjonu

3.5.3.3. Određivanje antioksidativne aktivnosti merenjem redukcionne moći primenom FRAP testa

Određivanje redukcionne moći antioksidanasa primenom FRAP testa rađeno je prema metodi koju su dali Benzie i Strain (1996). Pre same analize neophodno je pripremiti svež FRAP reagens koji se sastoji od acetatnog pufera (pH=3,6), rastvora TPTZ-a (koncentracije 10 mmol/L, rastvoren u 40 mmol/L HCl) i rastvora FeCl₃ (koncentracije 20 mmol/L) u odnosu 10:1:1 (v/v/v). 1 mL ovako pripremljenog FRAP reagensa je dodat u 50 µL ekstrakta (koncentracije 20 mg/mL) i dopunjen je vodom do zapremine od 4 mL. Uzorci su inkubirani 5 minuta na 37 °C nakon čega je apsorbancija merena na talasnoj dužini od 595 nm. Manja apsorbancija ukazuje na veću antioksidativnu aktivnost ispitivanih uzoraka.

Kalibraciona prava je konstruisana na osnovu serije standardnih rastvora FeSO₄ (koncentracije 0,7–7 µg/mL) (slika 3.10) iz koje je određena antioksidativna aktivnost ekstrakata izražena kao µg Fe²⁺ ekvivalenata po mg suvog ekstrakta (µg Fe/mg se).

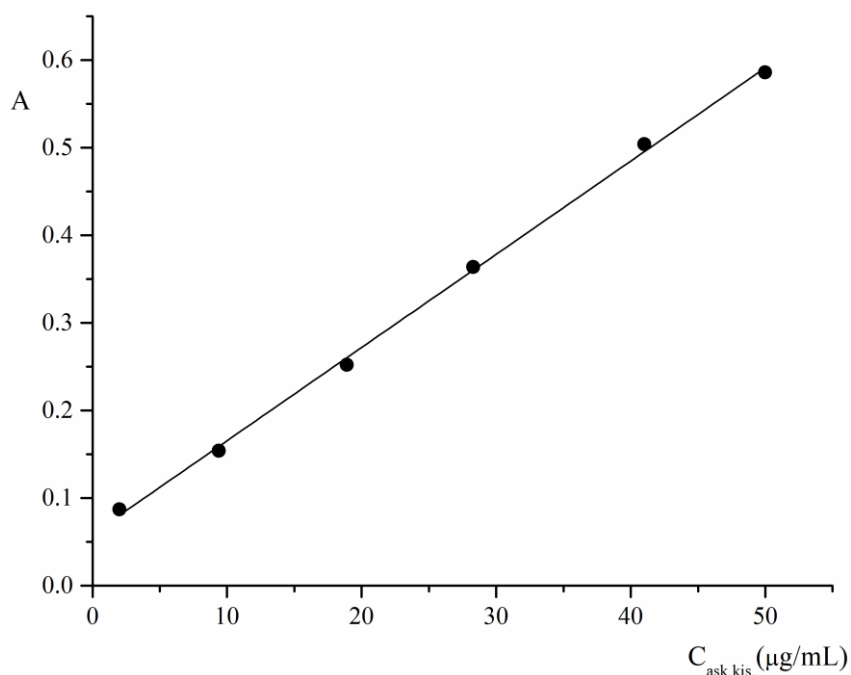


Slika 3.10 Kalibraciona prava za određivanje antioksidativne aktivnosti primenom FRAP metode

3.5.3.4. Određivanje antioksidativne aktivnosti merenjem ukupne redukcionne moći

Određivanje antioksidativne aktivnosti na osnovu sposobnosti antioksidanasa da redukuju jone gvožđa rađena je prema metodi koju je opisao Oyaizu (1986). Reakcionu smešu čini 10 μL ekstrakta (koncentracije 20 mg/mL) u koju je dodato 1 mL fosfatnog pufera (pH=6,6), 1 mL rastvora $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ (koncentracije 1%, m/v) i dopunjeno vodom do 3,7 mL. Nakon inkubacije na temperaturi od 50 °C, 30 minuta, smeši je dodato 1 mL rastvora CCl_3COOH (koncentracije 10%, m/v) i 0,6 mL FeCl_3 (0,1%, m/v). Apsorbancija dobijene smeše je merena na talasnoj dužini od 700 nm.

Na osnovu serije standardnih rastvora askorbinske kiseline (koncentracije 2–50 $\mu\text{g/mL}$) konstruisana je kalibraciona prava (slika 3.11) na osnovu koje je određena redukciona moć ekstrakata izražena kao μg ekvivalent askorbinske kiseline po mg suvog ekstrakta (μg AAE/mg se).

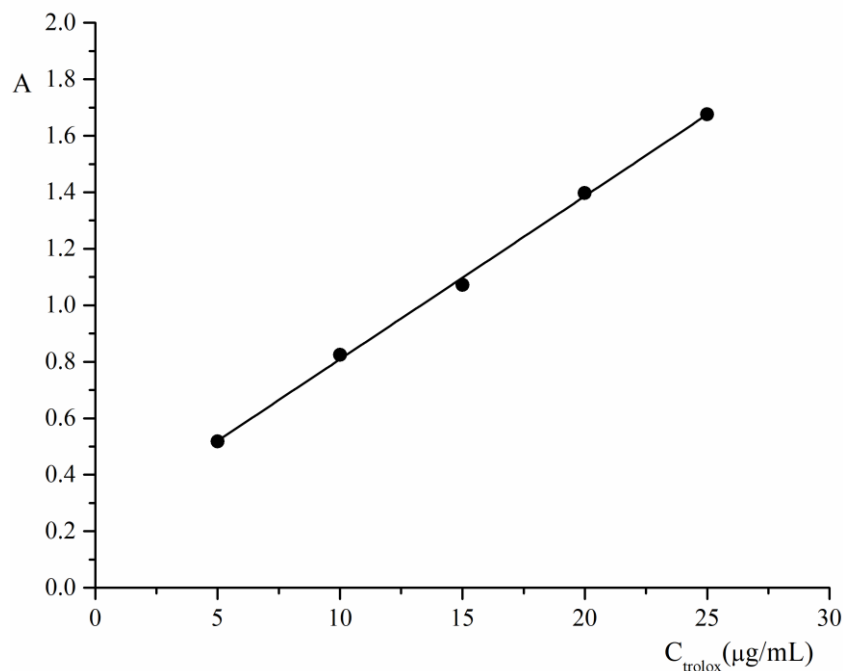


Slika 3.11 Kalibraciona prava za određivanje antioksidativne aktivnosti primenom TRP metode

3.5.3.5. Određivanje antioksidativne aktivnosti merenjem redukcionne moći primenom CUPRAC testa

Određivanje antioksidativne aktivnosti na osnovu sposobnosti antioksidanasa da redukuju jone bakra rađena je prema metodi koju su dali Apak i sar. (2008). 50 μL svakog od ispitivanih ekstrakata (koncentracije 20 mg/mL) je pomešan sa 1 mL rastvora neokuproina (koncentracije 7,5 $\mu\text{mol/L}$), 1 mL $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ pufera (pH=7), 1 mL rastvora CuCl_2 (koncentracije 0,01 mol/L) i etanolom dopunjeno do ukupne zapremine od 4,1 mL. Reakciona smeša je dobro promešana i ostavljena 30 minuta na sobnoj temperaturi. Reakcija redukcije se prati merenjem promene apsorbancije na 450 nm.

Seriya standardnih rastvora troloksa (koncentracije 5–25 $\mu\text{g/mL}$) korišćena je za dobijanje kalibracione prave (slika 3.12) iz koje je izračunata antioksidativna aktivnost uzoraka izražena kao μg troloks ekvivalenta po mg suvog ekstrakta ($\mu\text{g TE/mg se}$).

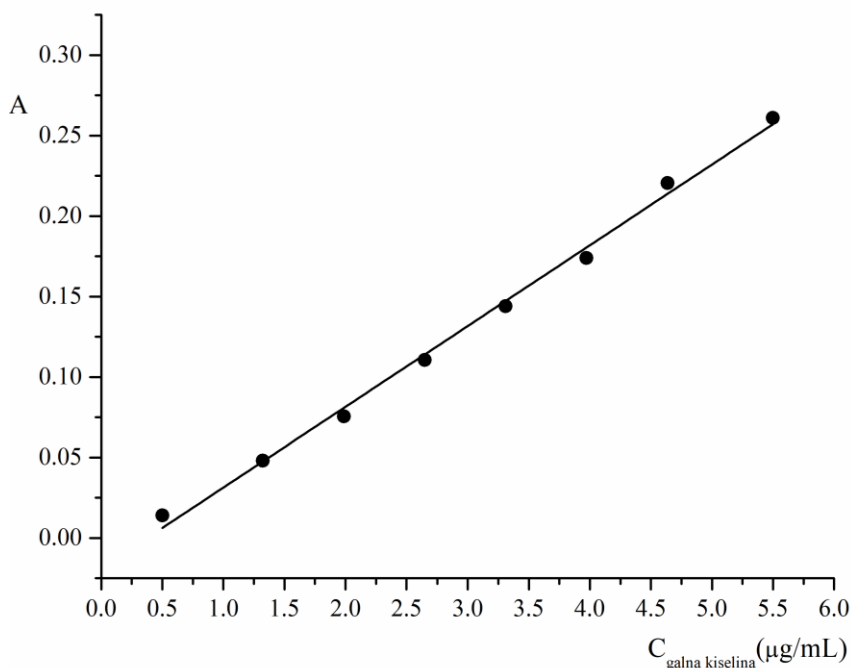


Slika 3.12 Kalibraciona prava za određivanje antioksidativne aktivnosti primenom CUPRAC metode

3.5.4. Određivanje sadržaja ukupnih fenolnih jedinjenja po Folin-Ciocalteu metodi

Ukupan sadržaj fenola u ekstraktima gljiva je određen primenom Folin-Ciocalteu reagensa, prema metodi koju su definisali Singleton i sar. (1999). U 50 μL ekstrakta (koncentracije 20 mg/mL) dodato je 2 mL rastvora Na_2CO_3 (koncentracije 20%, *m/v*), 0,5 mL Folin-Ciocalteu reagensa i destilovanom vodom dopunjeno do ukupne zapremine od 7,55 mL. Ovako pripremljeni uzorci su ostavljeni 30 minuta u mraku, nakon čega je merena apsorbancija na talasnoj dužini od 750 nm. Veća apsorbancija ukazuje na veći sadržaj fenolnih jedinjenja u ispitivanim uzorcima.

Ukupan sadržaj fenolnih jedinjenja određen je iz kalibracione prave (slika 3.13) koja je dobijena na osnovu merenja standardne serija rastvora galne kiseline (koncentracije 0,5–5,5 $\mu\text{g/mL}$) i rezultati su izraženi kao μg ekvivalent galne kiseline po mg suvog ekstrakta (μg GAE /mg se).

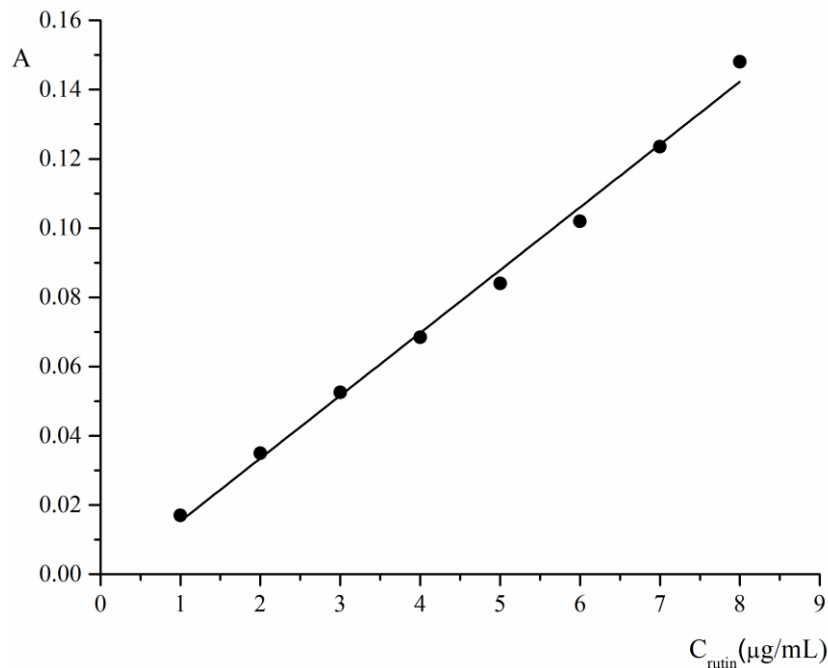


Slika 3.13 Kalibraciona prava za određivanje sadržaja ukupnih fenolnih jedinjenja

3.5.5. Određivanje ukupnog sadržaja flavonoida

Ukupan sadržaj flavonoida u ispitivanim uzorcima gljiva rađen je prema metodi koju su dali Zhishen i sar. (1999). U 50 μL ekstrakt (koncentracije 20 mg/mL) je dodato 2 mL destilovane vode i 150 μL rastvora NaNO_2 (koncentracije 5%, m/v). Nakon 5 minuta stajanja na sobnoj temperaturi dodato je 0,75 mL AlCl_3 (koncentracije 2%, m/v) i nakon 5 minuta dodato je 1 mL NaOH (koncentracije 1 mol/L). Reakciona smeša je dopunjena destilovanom vodom do 5 mL. ApSORBANCija ispitivanih ekstrakata je merena na talasnoj dužini od 520 nm.

Kao standard za određivanja flavonoida korišćen je rutin od kojeg je napravljena serija standardnih rastvora (koncentracije 1–10 $\mu\text{g/mL}$) (slika 3.14). Na osnovu dobijene kalibracione prave izračunat je sadržaj flavonoida koji je izražen kao μg ekvivalent rutina po mg suvog ekstrakta ($\mu\text{g RuE /mg se}$).



Slika 3.14. Kalibraciona prava za određivanje sadržaja ukupnih flavonoida

Rezultati i diskusija

4.1. HEMIJSKI SASTAV GLJIVA

4.1.1. Elementni sastav gljiva

Elementni sastav gljiva pre svega zavisi od vrste i starosti plodonosnog tela. Neke vrste gljiva pokazuju veću tendenciju akumulacije elemenata što je veoma važno sa ekološkog aspekta (Stefanović, 2016). Na sadržaj elemenata utiče i sastav zemljišta na kome gljive rastu kao i zagađenje životne sredine.

Kako bi se procenio kvalitet gljiva određen je sadržaj 22 elementa u njima pri čemu su svi analizirani elementi podeljeni u tri grupe: biološki važni elementi (Ca, K, Na, P, Zn, Fe, Cu, Mn, Co, Se, Cr i Ni), toksični elementi (As, Cd, Hg i Pb) i neesencijalni elementi koji se mogu naći u gljivama (Ag, Al, Rb, Bi, Sr i Ba). Dobijeni rezultati (mg/kg sm) predstavljaju srednju vrednost tri merenja \pm SD i prikazani su u tabelama 4.1, 4.3, 4.5 i 4.7. Sadržaj elemenata u odabranim vrstama gljiva preračunato na 300 g svežih gljiva izražen je kao procenat dnevnog unosa, a dobijen je korišćenjem srednje vrednosti tri merenja za svaki element i rezultati su prikazani u tabelama 4.2, 4.4 i 4.6.

U većini istraživanja sadržaj elemenata u gljivama izražava se kao mg/kg sm i usvojeno je da je prosečan sadržaj suve mase u gljivama 10% (Kalač i Svoboda, 2000).

4.1.1.1. Biološki važni elementi prisutni u gljivama

4.1.1.1.1. Esencijalni makroelementi koji se mogu naći u gljivama

Dobijeni rezultati za biološki važne makroelemente dati su u tabeli 4.1.

Uočeno je da gljive akumuliraju velike količine kalijuma (sadržaj u gljivama je 20–40 puta veći u odnosu na sadržaj u supstratu), dok je akumulacija natrijuma i kalcijuma veoma mala, takoreći zanemarljiva (Kalač, 2009). Doprinos jedne porcije gljiva naziva se značajnim ukoliko obezbeđuje 15% preporučenog dnevnog unosa (PDU) elemenata (*Recommended Daily Intake–RDI*) (Stefanović, 2016).

Kalijum je treći najzastupljeniji mineral u čovekovom telu i ima važnu ulogu u mnogim metaboličkim procesima, uključujući pravilno funkcionisanje mozga, srca i mišića. Sadržaj kalijuma u mnogim vrstama gljiva je znatno viši nego u hrani biljnog porekla (Kalač, 2001), ali je i uporediv sa određenim vrstama povrća koje su bogate kalijumom poput spanaća, karfiola, kupusa, zelene salate ili paradajza (Kalač, 2019). Seeger (1978) je objavio da se

sadržaj kalijuma u 410 samoniklih vrsta gljiva kreće u opsegu od 1,5–117 g/kg sm. Gljive se zbog toga mogu koristiti u ishrani kod osoba sa hroničnim nedostatkom kalijuma.

Tabela 4.1 Sadržaj biološki važnih makroelemenata u odabranim vrstama gljiva (srednja vrednost tri merenja±SD; mg/kg sm)

Vrsta	K (mg/kg sm)	Na (mg/kg sm)	Ca (mg/kg sm)	P (mg/kg sm)
Boletaceae				
<i>B. edulis</i>	11781±430	69±6	113±10	4387±180
<i>X. chrysenteron</i>	14136±499	198±9	316±23	4387±188
<i>I. rhodopurpureus</i>	10092±421	916±54	111±9	6496±193
<i>R. rhodoxanthus</i>	10518±512	64±5	212±12	3858±158
<i>B. appendiculatus</i>	15323±513	99±8	123±10	7898±199
<i>L. aurantiacum</i>	45257±801	13,5±0,7	317±24	6287±199
<i>L. albostipitatum</i>	37223±787	32±2	226±12	7712±195
<i>H. impolitum</i>	15872±502	58±5	255±12	10078±205
Russulaceae				
<i>L. semisanguifluus</i>	17278±550	<LOD	77±4	2876±151
<i>L. sanguifluus</i>	17426±555	41±3	422±28	3647±155
<i>L. deliciosus</i>	14431±517	35±2	299±15	5922±195
<i>L. volemus</i>	15999±521	57±4	314±22	4791±190
<i>L. piperatus</i>	16845±531	52±5	388±25	5398±181

Među analiziranim vrstama gljiva, najveću koncentraciju kalijuma ima vrsta *L. aurantiacum* (45257 mg/kg sm), a najnižu vrsta *I. rhodopurpureus* (10092 mg/kg sm).

Prema literaturnim podacima, za vrstu *L. aurantiacum* sadržaj kalijuma se kretao u sledećem rasponu: 20000–25000 mg/kg sm (Brzezicha-Cirocka i sar., 2016) i 30000–35000 mg/kg sm (Mleczek i sar., 2013) u nezagađenim oblastima, dok je za vrstu *L. piperatus* 30000–35000 mg/kg sm (Cvetkovic i sar., 2015). Prema ranijim podacima, sadržaj kalijuma u vrsti *B. edulis* je između 14000–41000 mg/kg sm (Falandysz i sar., 2008).

PDU za kalijum za odrasle osobe je 2000 mg (EEC, 2008). Iz tabele 4.2 se može uočiti da svi analizirani uzorci gljiva kroz konzumiranje porcije od 300 g svežih gljiva imaju značajan doprinos kalijuma jer prelazi 15% dnevnog unosa. Posebnu pažnju treba posvetiti konzumaciji vrsta *L. aurantiacum* i *L. albostipitatum* jer samo konzumiranjem porcije od 300 g ovih gljiva obezbeđuje se 67,9% i 55,8% dnevnih potreba za kalijumom. Iz tog razloga prilikom

komzumcije tih gljiva potreban je dodatni oprez sa unosom ostalih namirnica bogatih kalijumom.

U poređenju sa kalijumom, sadržaj natrijuma je značajno niži u proučavanim gljivama, što je vrlo važno jer konzumiranje hrane bogate natrijumom može dovesti do pojave visokog krvnog pritiska. Prosečan nivo natrijuma u gljivama se kreće od 50–750 mg/kg sm (Kalač, 2019).

Među testiranim uzorcima gljiva, *I. rhodopurpureus* se izdvojila sa povišenim sadržajem natrijuma, čak 916 mg/kg, dok su sve ostale gljive pokazale znatno niži sadržaj natrijuma, od 13,5 mg/kg sm (*L. aurantiacum*) do 198 mg/kg sm (*X. chrysenteron*) (tabela 4.1). Literaturni podaci koji se odnose na sadržaj natrijuma u vrsti *L. aurantiacum* su veći nego rezultati dobijeni u ovom istraživanju, 50–100 mg/kg sm (Brzezicha-Cirocka i sar., 2016), 200–300 mg/kg sm (Mleczek i sar., 2013). Jedidi i sar. (2017) su dobili vrednosti za sadržaj natrijum za vrstu *L. deliciosus* u opsegu 100-200 mg/kg sm, dok su Mleczek i sar. (2013) dobili vrednosti za sadržaj natrijuma veće od 750 mg/kg sm za istu vrstu.

PDU za natrijum iznosi 1500 mg (EFSA, 2019) tako da se konzumiranjem porcije od 300 g svežih gljiva obezbeđuje od 0,03% (*L. aurantiacum*) do 1,8% (*I. rhodopurpureus*) potreba za Na dnevno, što gljive kvalifikuje kao hranu čija konzumacija ne predstavlja opasnost za pojavu hipertenzije (tabela 4.2).

Prosečan sadržaj kalcijuma u gljivama kreće se između 0,1 i 0,5 g/kg sm (Seeger i Huttner, 1981). Na osnovu dobijenih vrednosti može se zaključiti da su gljive siromašnije kalcijumom nego povrće.

U analiziranim gljivama, sadržaj kalcijuma je neznatno viši u odnosu na sadržaj natrijuma. Gljiva *L. sanguifluus* se izdvojila sa najvećim sadržajem kalcijuma (422 mg/kg sm), dok je kod *L. semisanguifluus* utvrđena najmanja koncentracija koja iznosi 77 mg/kg sm. Prema Falandysz i sar. (2008) opseg u kome se kretala koncentracija kalcijuma u gljivi *B. edulis* bio je 5,6–420 mg/kg sm. Prema literturnim podacima sadržaj kalcijuma u gljivi *L. deliciosus* kretao se u intervalu od 100–200 mg/kg sm (Jedidi i sar., 2017) i 200–300 mg/kg sm (Mleczek i sar., 2013), što je u skladu sa prikazanim rezultatima.

S obzirom na to da PDU za kalcijum iznosi 800 mg (EEC, 2008), a najveća koncentracija kalcijuma utvrđena u ovom istraživanju iznosi 12,72 mg/300 g svežih gljiva (što je 1,6% PDU), može se zaključiti da gljive predstavljaju mali izvor kalcijuma u ishrani, ali kako se kalcijum generalno ne svrstava među elemente deficitarne u čovekovo ishrani onda se ovaj deficit može zanemariti.

Fosfor je drugi najzastupljeniji element u jestivim i samoniklim gljivama koje su u stanju

da ga bioakumuliraju u velikim količinama iz podloge. Koncentracija fosfora se u analiziranim gljivama kreće od 2876 mg/kg sm (*L. semisanguifluus*) do 10078 mg/kg sm (*H. impositum*).

Literaturni podaci (Quinche, 1997), ukazuju na to da se prosečan sadržaj fosfora kod gljiva porodice Boletaceae kreće između 5000–7000 mg/kg sm. Koncentracija fosfora u vrsti *B.edulis* može biti 3003,1 mg/kg sm (Turfan i sar., 2018) a u vrsti *L. deliciosus* nešto manji, 2162,9 (Turfan i sar., 2018). Na osnovu toga, gljive se mogu oceniti kao relativno bogat izvor fosfora, ali i dalje nedostaju informacije o bioraspoloživosti elementa iz obroka pripremljenih od gljiva (Kalač, 2019).

PDU za fosfor iznosi 550 mg (EFSA, 2017). Iz tabele 4.2 se može uočiti da svi analizirani uzorci gljiva imaju značajan doprinos (>15%) dnevnog unosa fosfora, za neke vrste čak veoma visok: *H. impositum* (55%), *B. appendiculatus* (43,1%) i *L. albobipitatum* (42,1%).

Pregledom dostupne literature utvrđeno je da je sadržaj makroelemenata u gljivama *I. rhodopurpureus*, *R. rhodoxanthus*, *L. albobipitatum*, *H. impositum*, *L. sanguifluus* i *L. semisanguifluus* po prvi put prikazan u ovom istraživanju.

Tabela 4.2 Sadržaj biološki važnih makroelemenata u odabranim vrstama gljiva preračunato na 300 g svežih gljiva; % dnevnog unosa

Vrste	mg K/300g sg	% dnevnog unosa	mg Na/300g sg	% dnevnog unosa	mg Ca/300g sg	% dnevnog unosa	mg P/300g sg	% dnevnog unosa
Boletaceae								
<i>B. edulis</i>	353,44	17,7	2,11	0,1	3,40	0,4	131,65	23,9
<i>X. chrysenteron</i>	424,16	21,2	5,95	0,4	9,52	1,2	131,63	23,9
<i>I. rhodopurpureus</i>	302,89	15,1	27,53	1,8	3,35	0,4	194,98	35,4
<i>R. rhodoxanthus</i>	315,65	15,8	1,98	0,1	6,47	0,8	115,79	21,0
<i>B. appendiculatus</i>	459,73	22,9	3,65	0,2	3,74	0,5	236,93	43,1
<i>L. aurantiacum</i>	1357,78	67,9	0,42	0,03	9,56	1,2	188,67	34,3
<i>L. albobipitatum</i>	1116,72	55,8	1,86	0,06	6,83	0,9	231,43	42,1
<i>H. impositum</i>	476,18	23,8	1,74	0,12	7,72	1,1	302,38	55,0
Russulaceae								
<i>L. semisanguifluus</i>	518,36	25,9	<LOD	/	2,33	0,3	86,33	15,7
<i>L. sanguifluus</i>	522,84	26,1	1,22	0,08	12,72	1,6	109,48	19,9
<i>L. deliciosus</i>	432,90	21,7	1,08	0,07	9,45	1,1	177,74	32,3
<i>L. volemus</i>	480,08	24	1,74	0,1	9,48	1,2	143,78	26,1
<i>L. piperatus</i>	505,35	25,3	1,62	0,1	11,73	1,5	161,98	29,4

4.1.1.1.2. Esencijalni mikroelementi koji se mogu naći u gljivama

Dobijeni rezultati za biološki važne mikroelemente dati su u tabeli 4.3.

Bakar je esencijalni mikronutrijent koji je potreban za procese prenosa elektrona (EFSA NDA Panel, 2015). Njegova biohemijska uloga je pre svega katalitička, jer enzimi koji sadrže bakar deluju kao oksidaze i redukuju molekularni kiseonik. Bakar ima veoma važnu ulogu u imunom sistemu. Prilikom infekcije dolazi do mobilizacije superoksid-dismutaze i ceruloplazmina, dva jedinjenja koja sadrže bakarni jon (Arsić i sar., 2016). Bakar je neophodan za kontrolu cirkulacije krvi, kontrakciju srčanog mišića, sintezu melanina kao i rad mišića.

Prosečna koncentracija bakra u samoniklim gljivama se kreće od 10 do 75 mg/kg sm, dok je u kultivisanim vrstama ona manja, sa iznosom približno 30 mg/kg sm (Kalač, 2019). Među analiziranim uzorcima gljiva, najveći sadržaj bakra ima gljiva *L. piperatus* (47 mg/kg sm), dok se vrsta *L. semisanguifluus* izdvojila najmanjim sadržajem bakra (0,26 mg/kg sm). *B. appendiculatus* je vrsta koja takođe ima veći sadržaj bakra u odnosu na ostale gljive (34,2 mg/kg sm), dok su (Turkekul i sar., 2004) utvrdili za ovu vrstu dvostruko manju koncentraciju, 18 mg/kg sm. Prema literaturnim podacima, za vrstu *B. edulis* sadržaj bakra se kretao u sledećem rasponu: 11–77 mg/kg sm (Giannaccini i sar., 2012), 51,99–85,76 mg/kg sm (Alonso i sar., 2003), 109 mg/kg sm (u zagađenom području) (Kalač i sar., 1991) i 18,3 mg/kg sm (Yağız i sar., 2008).

Institut za medicinu Američke nacionalne akademije (U.S. National Academies, Institute of Medicine, 2001) preporučuje dnevni unos od 0,90 mg bakra i za muškarce i žene. Konzumiranjem porcije od 300 g analiziranih gljiva obezbeđuje se od 0,9% (za *L. semisanguifluus*) do 155% (za *L. piperatus*) dnevnih potreba za bakrom (tabela 4.4).

Cink je važna komponenta velikog broja (> 300) enzima i učestvuje u sintezi i razgradnji ugljenih hidrata, lipida, proteina i nukleinskih kiselina kao i u metabolizmu drugih mikronutrijenata (WHO, 2004). Osim toga, pored bakra, deo je enzima superoksid-dismutaza koji pomaže u zaštiti ćelija i nekih jedinjenja od štetnih efekata izazvanih slobodnim radikalima (Plum i sar., 2010). Budući da učestvuje u stvaranju antitela i leukocita, može se smatrati jednim od važnijih komponenti imunog sistema. Ovaj esencijalni element često nedostaje u ljudskoj ishrani pa je konzumiranje hrane bogate cinkom poželjno kako ne bi došlo do poremećaja i razvoja bolesti.

Cink je antagonist nekih metala kao što su olovo, kadmijum i nikl i njegovo prisustvo u određenim gljivama utiče na manju koncentraciju drugih toksičnih metala. Poznato je da gljive akumuliraju cink i da se koncentracija može kretati od 25 do 200 mg/kg sm u samoniklim i u

kultivisanim vrstama (Kalač, 2019).

U analiziranim uzorcima gljiva koncentracija cinka je u granicama od 18 mg/kg sm za vrstu *X. chrysenteron* do 302 mg/kg sm za vrstu *I. rhodopurpureus* (tabela 4.3). Literaturni podaci su sledeći: 43–35 mg/kg sm za *B. edulis* (Giannaccini i sar., 2012) i 63,7–133,4 mg/kg sm (Alonso i sar., 2003); 111,9–162,3 mg/kg sm za *X. chrysenteron* (Alonso i sar., 2003), 39–136,4 mg/kg sm za *L. semisanguifluus* (Aloupi i sar., 2012), 57,4–179 mg/kg sm za *L. sanguifluus* (Aloupi i sar., 2012), 62,8–120,8 mg/kg sm za *L. deliciosus* (Aloupi i sar., 2012).

Konзумiranjem porcije od 300 g svežih gljiva unese se 0,53–9,05 mg cinka, što čini od 5,3–90,5% dnevnog unosa (tabela 4.4).

Gvožđe se smatra esencijalnim mikronutrijentom jer ima vitalnu funkciju u organizmu. Neophodan je za prenos kiseonika iz pluća do tkiva i čini sastavni deo važnih enzimskih sistema u različitim tkivima (EFSA NDA Panel, 2015b). Hrana životinjskog porekla glavni je izvor gvožđa i prema podacima SZO deficit gvožđa kod ljudi se najčešće javlja u siromašnim zemljama. Kako bi se ovaj problem rešio rade se istraživanja na temu obogaćivanja kultivisane gljive *Pleurotus ostreatus* gvožđem sa ciljem da se ovaj deficit smanji (Kalač, 2019).

Sadržaj gvožđa se u samoniklim gljivama kreće u granicama od 50 do 1000 mg/kg sm (Kalač, 2019). U analiziranim uzorcima gljiva najmanja koncentracija gvožđa je uočena kod vrste *L. deliciosus* (27 mg/kg sm), a najveća kod *L. semisanguifluus* (307 mg/kg sm). Vrsta *L. sanguifluus* se takođe izdvaja većim sadržajem gvožđa (202 mg/kg sm). *R. rhodoxanthus* je vrsta koja pripada porodici Boletaceae, a koja se izdvojila po većem sadržaju gvožđa (74 mg/kg sm) u odnosu na ostale vrste iste porodice. U poređenju sa literaturnim podacima, ispitivane vrste se mogu svrstati u grupu sa niskim do umerenim sadržajem gvožđa jer je za *B. appendiculatus* pronađeno 1040 mg/kg sm (Turkekul i sar., 2004), za *B. edulis* 664,6 mg/kg sm (Yağız i sar., 2008), za *H. impolitum* 672–1831 mg/kg sm (Wang i sar., 2017) za *X. chrysenteron* 160 mg/kg sm (Sarikurkcui i sar., 2011).

Institut za medicinu Američke nacionalne akademije (U.S. National Academies, Institute of Medicine, 2001) preporučuje dnevni unos gvožđa od 8 mg za muškarce i 18 mg za žene. Konзумiranjem vrste *I. rhodopurpureus* i *L. deliciosus* (porcija 300 g svežih gljiva) sa ispitivanog područja daje mali doprinos dnevnog unosa gvožđa, 8,7% i 8%. Porcija od 300 g *L. semisanguifluus* sadrži 9,21 mg gvožđa što predstavlja 92,1% PDU.

Mangan je esencijalni element svih sisara. Uključen je u sintezu i aktivaciju mnogih enzima, učestvuju u metabolizmu glukoze i masti, sintezi proteina, vitamina C i B, regulaciji endokrinog sistema, kao i u poboljšanju imunoloških funkcija (Aschner i Aschner, 2005).

Tabela 4.3 Sadržaj biološki važnih mikroelemenata u odabranim vrstama gljiva (srednja vrednost tri merenja±SD; mg/kg sm)

Vrste	Cu (mg/kg sm)	Zn (mg/kg sm)	Fe (mg/kg sm)	Mn (mg/kg sm)	Co (mg/kg sm)	Se (mg/kg sm)	Cr (mg/kg sm)	Ni (mg/kg sm)
Boletaceae								
<i>B. edulis</i>	16±1	70±7	55±4	5,1±0,5	0,72±0,05	2,3±0,1	1,0±0,2	1,2±0,3
<i>X. chrysenteron</i>	8±1	18,1±0,2	46±3	2,9±0,1	0,15±0,01	0,04±0,00	0,53±0,03	0,50±0,04
<i>I. rhodopurpureus</i>	5,6±0,4	302±12	29±2	2,9±0,1	0,12±0,01	0,33±0,03	0,17±0,02	0,68±0,07
<i>R. rhodoxanthus</i>	16±1	84±7	74±6	13,9±0,5	0,07±0,00	0,48±0,03	0,30±0,02	0,40±0,03
<i>B. appendiculatus</i>	34,2±0,8	113±9	60±6	13±1	0,33±0,02	0,84±0,05	0,24±0,01	0,82±0,07
<i>L. aurantiacum</i>	31±2	125±9	48±3	14,7±0,9	1,0±0,1	0,41±0,04	0,169±0,009	0,76±0,06
<i>L. albobstipitatum</i>	28±1	125±9	63±5	9,3±0,8	0,85±0,08	0,43±0,04	0,26±0,01	22±1
<i>H. impolitum</i>	11,9±0,9	173±10	46±3	20±1	0,15±0,01	0,23±0,01	0,27±0,02	0,68±0,07
Russulaceae								
<i>L. semisanguifluus</i>	0,26±0,01	43±3	307±12	11,5±0,4	0,05±0,00	0,005±0,000	0,063±0,004	0,12±0,01
<i>L. sanguifluus</i>	5,7±0,2	32±3	202±10	9,4±0,4	0,18±0,01	0,87±0,06	0,61±0,07	6,0±0,4
<i>L. deliciosus</i>	5,0±0,5	150±9	27±2	7,5±0,4	0,1±0,01	0,40±0,03	0,19±0,01	0,57±0,06
<i>L. volemus</i>	34±2	50±4	34±3	10,8±0,5	0,52±0,03	0,45±0,03	0,37±0,02	2,9±0,1
<i>L. piperatus</i>	47±3	91±7	114±9	9,8±0,5	0,05±0,00	0,11±0,01	0,56±0,06	1,49±0,09

Tabela 4.4 Sadržaj biološki važnih mikroelemenata u odabranim vrstama gljiva preračunato na 300 g svežih gljiva; % dnevnog unosa

Vrste	mg Zn/300g sg	% dnevnog unosa	mg Fe/300g sg	% dnevnog unosa	mg Cu/300g sg	% dnevnog unosa	mg Mn/300g sg	% dnevnog unosa	mg Co/300g sg	% dnevnog unosa	mg Se/300g sg	% dnevnog unosa	mg Cr/300g sg	% dnevnog unosa	mg Ni/300g sg
Boletaceae															
<i>B. edulis</i>	2,21	21,0	1,66	16,6	0,46	51,6	0,15	7,6	0,022	126,6	0,070	0,0313	104,3	0,035	
<i>X. chrysenteron</i>	0,53	5,3	1,37	13,7	0,24	26,4	0,09	4,4	0,004	2,0	0,001	0,0158	52,7	0,015	
<i>I. rhodopurpureus</i>	9,05	90,5	0,87	8,7	0,17	18,7	0,09	4,4	0,004	18,1	0,010	0,0051	17,0	0,020	
<i>R. rhodoxanthus</i>	2,51	25,1	2,22	22,2	0,48	53,2	0,42	20,9	0,002	26,1	0,014	0,0089	29,8	0,012	
<i>B. appendiculatus</i>	3,39	33,9	1,80	18,0	1,03	114,2	0,39	19,5	0,010	45,7	0,025	0,0071	23,8	0,025	
<i>L. aurantiacum</i>	3,75	37,5	1,43	14,3	0,92	102,4	0,44	22,1	0,030	22,6	0,012	0,0051	16,9	0,023	
<i>L. albosipitatum</i>	3,74	37,4	1,89	18,9	0,85	94,8	0,28	13,9	0,026	23,5	0,013	0,0079	26,3	0,672	
<i>H. impolitum</i>	5,20	52,0	1,39	13,9	0,36	39,6	0,60	30,1	0,005	12,3	0,007	0,0079	26,5	0,020	
Russulaceae															
<i>L. semisanguifluus</i>	1,28	12,8	9,21	92,1	0,01	0,9	0,35	17,3	0,001	0,3	0,000	0,0019	6,3	0,004	
<i>L. sanguifluus</i>	0,95	9,5	6,06	60,6	0,17	19,1	0,28	14,1	0,005	47,3	0,026	0,0184	61,2	0,179	
<i>L. deliciosus</i>	4,49	44,9	0,80	8,0	0,15	16,7	0,22	11,2	0,003	21,9	0,012	0,0057	19,1	0,017	
<i>L. volemus</i>	1,49	14,9	1,02	10,2	1,03	114,6	0,33	16,3	0,016	24,4	0,013	0,0112	37,4	0,086	
<i>L. piperatus</i>	2,73	27,3	3,43	34,3	1,40	155,0	0,29	14,7	0,002	6,1	0,003	0,0167	55,8	0,045	

Antioksidativni enzim, superoksid-dismutaza, u svom sastavu sadrži mangan i kao takav štiti od slobodnih radikala i Alchajmerove bolesti.

Raspon uobičajenog sadržaja mangana u samoniklim gljivama kreće se između 25 i 75 mg/kg sm, a za uzgajane vrste je sadržaj niži do 25 mg/kg sm (Kalač 2019). Sadržaj mangana u analiziranim uzorcima je u intervalu od 2,9 mg/kg sm do 14,7 mg/kg sm. Sličnu studiju radili su Yağız i sar. (2008) i dobiči su rezultat da je srednja koncentracija mangana 27,9 mg/kg sm za *B. edulis*. Nešto malo manje vrednosti za mangan u odnosu na prikazane dobijene su za *L. semisanguifluus* (1,9–7,8 mg/kg sm) i *L. sanguifluus* (3,0–7,8 mg/kg sm) (Aloupi i sar., 2012), a malo veće za *H. impolitum* (16,2–41,5 mg/kg sm) (Wang i sar., 2017).

Dnevni unos mangana koji se preporučuje za muškarce je 2,3 mg a za žene 1,8 mg (U.S. National Academies, Institute of Medicine, 2001). Doprinos mangana iz porcije od 300 g svežih gljiva iznosi 4,4–30,1% (tabela 4.4).

Kobalt, pored toga što je sastavni deo vitamina B12, ima bitnu ulogu u biološkim sistemima kao kofaktor malog broja važnih enzima (Chivers, 2014). Sadržaj kobalta u samoniklim gljivama varira i kreće se od 0,2 do 10 mg/kg sm (Kalač, 2019). Međutim, u nekim gljivama je primećena i veća koncentracija kobalta. Wang i sar. (2017) su odredili 25,9 i 7,2 mg/kg sm kobalta u vrsti *Xerocomus spadiceous*, i 12,7 i 5,2 mg/kg sm u vrsti *Boletus impolitus*. U ispitivanim uzorcima se sadržaj kobalta kretao od 0,05 mg/kg sm (*L. semisanguifluus*, *L. piperatus*) do 1 mg/kg sm kod vrste *L. aurantiacium*. Ne postoji jasna preporučena količina kobalta, već samo preporuke za vitamin B12 (EFSA, 2015).

Selen je izuzetno važan esencijalni metaloid koji se pojavljuje u približno 30 selenoenzima i selenoproteina sisara koji su uključeni u antioksidativni odbrambeni sistem (Kalač, 2019). Prosečan sadržaj selena u gljivama se kreće od 0,5 do 5 mg/kg sm, a gljive koje se izdvajaju po visokom sadržaju su *Boletus edulis*, *Boletus pinophilus*, *Bovista aestivalis*, *Agaricus bisporus* i *Agaricus bitorquis* (Kalač, 2019). Među testiranim uzorcima gljiva najveći udeo selena pokazala je vrsta *B. edulis* (2,3 mg/kg sm), dok se minimalni sadržaj uočava kod gljive *L. semisanguifluus* (0,005 mg/kg sm). Institut za medicinu Američke nacionalne akademije (U.S. National Academies, Institute of Medicine, 2001) preporučuje dnevni unos Se od 0,055 mg, što kada preračunamo na analizirane uzorke dobijamo da porcija od 300 g svežih gljiva obezbeđuje od 0,3% do 126,6% dnevnog unosa selena.

Smatra se da je trovalentni hrom (Cr^{+3}) esencijalan mikronutrijent jer je neophodan za normalan metabolizam holesterola, masti, ugljenih hidrata, a njegov nedostatak dovodi do narušavanja tolerancije na glukozu, dok se šestovalentni hrom (Cr^{+6}) smatra toksičnim. Prosečan sadržaj hroma u gljivama je od 0,5–10 mg/kg sm. Masena koncentracija hroma u

ispitivanim uzorcima gljiva je manja od prosečnih vrednosti, kreće se od 0,06–0,612 mg/kg sm izuzev kod vrste *B. edulis* koja ima vrednost 1,04 mg/kg sm. Vetter (1997) je ispitivao sadržaj hroma i nikla u 25 raznovrsnih gljiva među kojima su se našle i vrste *L. deliciosus*, sa prosečnom sadržajem hroma 4,51 mg/kg sm, i *X. chrysenteron* sa prosečnim sadržajem hroma 0,72 mg/kg sm.

Prema preporuci Instituta za medicinu Američke nacionalne akademije PDU hroma iznosi 0,035 mg za muškarce i 0,025 mg hroma za žene. Na osnovu ovih vrednosti, konzumiranjem porcije od 300 g svežih gljiva obezbedio bi se unos hroma od 6,3% do 104,3%, zavisno od vrste (tabela 4.4).

Nikl se potencijalno smatra esencijalnim mikroelementom jer njegova funkcija u ljudskom organizmu još uvek nije u potpunosti razjašnjena. Iako je nikl uglavnom podjednako raspoređen u organizmu, nešto veća količina prisutna je u nukleinskim kiselinama, posebno ribonukleinskoj kiselini i smatra se da nikl ima uticaj na strukturu ili funkciju proteina povezanih u nukleinskim kiselinama (Arsić i sar., 2016). S obzirom na to da još uvek nisu potvrđene sve funkcije nikla u organizmu Institut za medicinu Američke nacionalne akademije nije definisao preporučeni dnevni unos nikla.

U samoniklim gljivama sadržaj nikla može biti od 0,5 mg/kg sm do 20 mg/kg sm, ali je uobičajeno da se vrednosti nikla u gljivama nalaze u intervalu 0,5–5 mg/kg sm. Većina analiziranih gljiva sadrži nikl u ovom intervalu, osim vrsta *L. albostipitatum* i *L. sanguifluus*, čije su vrednosti 22 mg/kg sm i 6 mg/kg sm. Literaturni podaci za sadržaj nikla u gljivama vrste *L. deliciosus* i *X. chrysenteron* su pet i deset puta veći nego dobijeni u ovom istraživanju (Vetter, 1997). Yamaç i sar. (2007) su pronašli veoma visok sadržaj nikla u gljivi *Coprinus comatus* (58,6 mg/kg sm), kao i Sarikurkcü i sar. (2018) u gljivi *Lycoperdon perlatum* (55 mg/kg sm).

Na osnovu dosadašnjih literaturnih podataka može se zaključiti da je ovo prvi prikaz sadržaja mikroelemenata u vrstama *I. rhodopurpureus*, *R. rhodoxanthus*, *L. albostipitatum*, kao i sadržaj gvožđa u vrsti *B. appendiculatus* i sadržaj kobalta u *L. semisanguifluus*.

4.1.1.2. Toksični elementi koji se mogu naći u gljivama

Dobijeni rezultati za toksične elemente su dati u tabeli 4.5.

Elementi poput arsena, kadmijuma, žive i olova se u životnoj sredini najčešće mogu naći kao posledica antropogenih aktivnosti. Njihova visoka koncentracija u namirnicama može imati toksično dejstvo. Mnoga istraživanja ukazuju na to da se praćenjem koncentracije elemenata u zemljišnom supstratu i gljivama može proceniti pogodnost gljiva kao potencijalnih bioindikatora zagađenja zemljišta toksičnim metalima (Sesli i Tüzen, 1999). U poređenju sa biljkama koje se koriste za bioremedijaciju, gljive se mogu smatrati superiornijim jer pored toga što pokazuju veću sposobnost akumulacije toksičnih materija, one lakše preživljavaju u lošim uslovima.

Arsen je element koji ima poluživot od svega nekoliko nedelja, ali se njegov toksičan efekat može videti i nakon više godina nakon izlaganja (ATSDR, 2007). Toksični efekat arsena je posledica njegovog velikog afiniteta prema sumporu koji ulazi u sastav mnogih enzima u vidu sulfhidrilnih grupa (-SH). Takođe, kada dospe u organizam učestvuje u reakciji fosforilacije pri čemu gradi nestabilne estere. Budući da arsen nema biološku funkciju i da je toksičan, njegova koncentracija u hrani bi trebalo da bude što manja. Evropska unija nije propisala maksimalno dozvoljenu koncentraciju arsena u gljivama. U Srbiji je pravilnikom utvrđeno da je 0,3 mg ukupnog arsena na kilogram svežih gljiva maksimalno dozvoljena koncentracija (Službeni glasnik Republike Srbije 29/2014). U ovom istraživanju ukupna koncentracija arsena u različitim uzorcima gljiva kreće se između 0,09 mg/kg sm (*L. semisanguifluus*) i 1,7 mg/kg sm (*B. appendiculatus*) (tabela 4.5). Za razliku od prikazanih rezultata koji se odnose na sadržaj arsena u vrsti *B. appendiculatus*, Alaimo i sar. (2018) su ustanovili da je sadržaj arsena manji od 0,5 mg/kg sm za pomenutu vrstu, dok se kod vrste *H. impolitum* kreće u intervalu 1–2 mg/kg sm (Zhang, i sar., 2015). Literaturni podaci koji se odnose na vrste koje pripadaju porodici Russulaceae, ukazuju da je kod njih je sadržaj arsena znatno viši 10–50 mg/kg sm za vrstu *L. deliciosus* (Turfan i sar., 2018) i 1–2 mg/kg sm za vrstu *L. volemus* (Zhang i sar., 2010).

Dobijene vrednosti izražene su po kilogramu suve gljive. Međutim, kako se u ishrani uglavom koriste sveže gljive, a i svetske regulative definišu prihvatljiv nedeljni unos (PNU) (*Provisional Tolerable Weekly Intake* (PTWI)) na kilogram svežih gljiva, u tabeli 4.6 date su vrednosti preračunate na 300 g svežih gljiva, kao i procenat nedeljnog unosa kozumiranjem 300 g svežih gljiva.

The Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA, 2010) koja čini zajednički ekspertski komitet Organizacije za hranu i poljoprivredu (FAO – Food and Agriculture Organization) i SZO za prehrambene aditive, propisala je PNU arsena i on iznosi 15 µg/kg telesne mase nedeljno. Ako se 70 kg uzme kao prosečna težina konzumenata (EFSA 2012) onda je PNU za arsen 1050 µg nedeljno. Sadržaj arsena koji se unese konzumiranjem porcije od 300 g svežih gljiva kreće se u intervalu od 3,1 do 49,8 µg. Upoređivanjem dobijenih vrednosti (tabela 4.6) sa dozvoljenim količinama arsena može se zaključiti da se konzumiranjem porcije od 300 g svežih gljiva neće prekoračiti prihvatljiv nedeljni unos arsena kao i da procenat arsena na nedeljnom nivou ne prelazi 5% konzumiranjem ispitivanih vrsta.

Tabela 4.5 Sadržaj toksičnih elemenata u odabranim vrstama gljiva (srednja vrednost tri merenja±SD; mg/kg sm)

Vrsta	As (mg/kg sm)	Cd (mg/kg sm)	Hg (mg/kg sm)	Pb (mg/kg sm)
Boletaceae				
<i>B. edulis</i>	0,73±0,09	1,8±0,1	2,1±0,2	10,6±0,5
<i>X. chrysenteron</i>	0,17±0,01	1,5±0,1	0,14±0,01	2,6±0,2
<i>I. rhodopurpureus</i>	0,32±0,02	2,4±0,1	0,39±0,02	0,61±0,05
<i>R. rhodoxanthus</i>	0,39±0,03	0,87±0,06	0,98±0,09	0,49±0,05
<i>B. appendiculatus</i>	1,7±0,1	1,2±0,1	1,1±0,1	0,48±0,05
<i>L. aurantiacum</i>	0,15±0,01	0,22±0,02	0,46±0,05	0,92±0,09
<i>L. albostipitatum</i>	0,24±0,05	0,27±0,02	0,72±0,06	1,4±0,1
<i>H. impolitum</i>	0,33±0,03	0,68±0,05	0,76±0,06	0,31±0,02
Russulaceae				
<i>L. semisanguifluus</i>	0,09±0,00	0,08±0,00	0,24±0,02	0,59±0,05
<i>L. sanguifluus</i>	0,25±0,03	0,39±0,03	0,27±0,02	0,80±0,06
<i>L. deliciosus</i>	0,53±0,05	1,9±0,2	0,69±0,05	0,40±0,04
<i>L. volemus</i>	0,10±0,01	1,9±0,2	3,8±0,3	3,8±0,3
<i>L. piperatus</i>	/	1,9±0,2	0,51±0,05	1,1±0,1

Velika mobilnost i biodostupnost kadmijuma, kao i povećano prisustvo u zemljištu, mogu dovesti do uvećanog sadržaja kadmijuma u gljivama. Iz tog razloga, kao i zbog njegovog štetnog dejstva po ljudsko zdravlje, kadmijum je element čiji se sadržaj najčešće prati kod gljiva.

Agencija za istraživanja raka (International Agency for Research on Cancer) je kadmijum

Tabela 4.6 Sadržaj toksičnih elemenata u proučanim vrstama gljiva iz porodica Boletaceae i Russulaceae (preračunato na 300 g svežih gljiva; % nedeljnog unosa)

Vrste	μg As/300g sg	% dnevno unosa	μg Cd/300g sg	% dnevno unosa	μg Hg/300 g	% dnevno unosa	μg Pb/300g sg	% dnevno unosa
Boletaceae								
<i>B. edulis</i>	21,8	2,1	54,8	11,2	61,6	17,6	317,4	18,7
<i>X. chrysenteron</i>	5,2	0,5	45,7	9,3	4,3	1,2	77,8	4,6
<i>I. rhodopurpureus</i>	9,6	0,9	72,4	14,8	11,8	3,4	18,3	1,1
<i>R. rhodoxanthus</i>	12,0	1,1	26,0	5,3	29,4	8,4	14,6	0,9
<i>B. appendiculatus</i>	49,8	4,7	37,4	7,6	32	9,1	14,3	0,8
<i>L. aurantiacum</i>	4,4	0,4	6,7	1,4	13,7	3,9	27,5	1,6
<i>L. albobipitatum</i>	7,2	0,7	8,1	1,7	21,7	6,2	42,0	2,5
<i>H. impolitum</i>	9,9	0,9	20,3	4,1	22,9	6,5	9,4	0,6
Russulaceae								
<i>L. semisanguifluus</i>	2,6	0,2	2,4	0,5	7,2	2,0	17,6	1,0
<i>L. sanguifluus</i>	7,6	0,7	11,6	2,4	8,2	2,3	23,9	1,4
<i>L. deliciosus</i>	15,8	1,5	56,9	11,6	20,8	5,9	11,9	0,7
<i>L. volemus</i>	3,1	0,3	58,3	11,9	114,8	32,8	113,7	6,7
<i>L. piperatus</i>	/	/	57,7	11,8	15,4	4,4	31,6	1,9

i jedinjenja kadmijuma definisala kao humani karcinogen prve grupe. Toksični efekat kadmijuma se ogleda u činjenici da ima veliki afinitet vezivanja za sumpor u makromolekulima kao što su proteini, DNK i RNK. Toksično dejstvo kadmijuma se može smanjiti povećanim unosom selena, cinka i bakra.

Veliki broj vrsta gljiva ima sposobnost da akumulira kadmijum iz supstrata (Gast i sar., 1988). Pregledom literature može se uočiti da sadržaj kadmijuma u gljivama može biti veoma visok. Sadržaj kadmijuma u srednje akumulirajućim vrstama gljiva koje rastu na zagađenim mestima može biti nekoliko desetina mg/kg sm, a u visoko akumulirajućim vrstama stotine mg/kg sm (Kalač, 2019).

Collin-Hansen i sar. (2002) odredili su 126 mg/kg sm kadmijuma u vrsti *Boletus edulis* koja je sakupljena u blizini Norveškog rudnika cinka. Petkovsek i Pokorny (2013) dobili su 23,5 mg/kg sm kadmijuma u vrsti *Boletus edulis* koja je sakupljena u blizina napuštene topionice olova. Zimmermanova i sar. (2001) dobili su vrednosti za kadmijum 10,3 mg/kg sm za vrstu *Boletus edulis* i 10,0 mg/kg sm za vrstu *Xerocomus chrysenteron* koje su sakupljane u blizini topionice žive i bakra. Ekstremno visok nivo od 600 mg/kg sm utvrđen je u nejestivoj vrsti gljive *Cystoderma carcharias*, koja se može smatrati hiperakumulatorom kadmijuma (Borovicka i sar., 2019). Benbrahim i sar. (2006) analizirali su nivo kadmijuma u gljivama koje su sakupljene u nezagađenim mestima (kontrolne parcele) i koncentracija je varirala između 1–12 mg/kg sm. Prema literaturnim podacima sadržaj kadmijuma u vrsti *L. aurantiacium* je do 1 mg/kg sm (Brzezicha-Cirocka i sar., 2016) i u intervalu od 1 do 2 mg/kg sm (Mleczek i sar., 2013). Veći sadržaj kadmijuma u gljivama iz nezagađenih područja može biti rezultat visokih kumulativnih svojstava iste vrste gljiva, što je dokaz za *Xerocomus chrysenteron* (Svoboda i sar., 2000).

Iz tabele 4.5 može se videti da se koncentracija kadmijuma u ispitivanim vrstama kreće u opsegu od 0,08 mg/kg sm (*L. semisanguifluus*) do 2,4 mg/kg sm (*I. rhodopurpureus*). Sadržaj kadmijuma u ispitivanim vrstama gljiva nešto je manji nego u istraživanju Michelot i sar. (1998) koji su za *Boletus edulis* odredili 1,39–1,7 mg/kg sm a za *Butyriboletus appendiculatus* 3,34 mg/kg sm. Turkekul i sar. (2004) utvrdili su da je sadržaj kadmijuma u vrsti *Butyriboletus appendiculatus* 1,8 mg/kg sm, što je u saglasnosti sa prikazanim rezultatima, 1,2 mg/kg sm.

PNU za kadmijum prema JECFA (2010) iznosi 7 µg/kg telesne mase, tj. 490 µg nedeljno. Porcija od 300 g svežih gljiva sadrži od 2,4 µg do 72,4 µg kadmijuma, što ne premašuje prihvatljiv nedeljni unos propisan regulativom (tabela 4.6).

Živa u atmosferu dospeva prirodnim ili antropogenim putem i može se prenositi na velike udaljenosti od mesta nastanka, što je veliki problem za životnu sredinu. Iz tog razloga,

samonikle gljive koje rastu na lokacijama daleko od industrijskih i urbanih oblasti mogu biti kontaminirane živom. Gornji sloj šumskog zemljišta bogat je organskom materijom koja apsorbuje živu iz atmosfere i na taj način ulazi u lanac ishrane.

Sadržaj žive u zemljištu je važan faktor koji utiče na koncentraciju ovog elementa u biljkama i jestivim gljivama (Falandysz i sar., 2012), jer mnoge gljive efikasno prihvataju ovaj element iz zemlje. *Macrolepiota procera* i *Boletus edulis* su vrste čiji micelijum efikasno apsorbuje živu iz supstrata tla i akumulira živu u koncentraciji većoj od 3,0 mg/kg sm u slučaju kada je koncentracija žive u gornjem sloju zemljišta znatno ispod 0,05 mg/kg sm (Falandysz i sar., 2015).

Sva jedinjenja žive su visoko toksična za mikroorganizme, životinje i ljude, ali se organska jedinjenja žive smatraju opasnijim. Metil-živa je lipofilno organsko jedinjenje koje se akumulira u živim organizmima i pokazuje veću toksičnost od neorganskih jedinjenja žive pa je i njena PNU vrednost manja. Toksični efekat žive je posledica formiranja veza sa sumporom i na taj način inaktivacije enzima pri čemu dolazi do poromećaja metabolizma i intenzivnog procesa peroksidacije lipida. Posledica ovih reakcija jeste oštećenje ćelijskih membrana.

Prosečne vrednosti za sadržaj žive u gljivama koje rastu na nezagađenim područjima kreću se od 0,5–5 mg/kg sm (Kalač, 2019). Dobijene vrednosti za analizirane vrste su u ovom intervalu, što je i očekivano jer su gljive sakupljane na nezagađenom području. Gljiva *L. volemus* se izdvojila najvećim sadržajem žive (3,8 mg/kg sm), što kada se preračuna na porciju od 300 g svežih gljiva iznosi 114,8 µg žive.

Da bi zaštitili ljude od izloženosti živi koja se nalazi u hrani, JECFA, (2010) je propisala PNU za živu od 5 µg/kg telesne težine što za konzumenta od 70 kg iznosi 350 µg nedeljno. Konzumiranjem 300 g porcije gljiva *L. volemus* unosi se 32,8% žive na nedeljnom nivou. Cocchi i sar. (2006) su za vrste *Butyriboletus appendiculatus*, *Boletus edulis* i *Xerocomellus chrysenteron* utvrdili sledeći sadržaj žive: 1,05; 2,67 i 0,23 mg/kg sm. Ove vrednosti su veoma slične dobijenim: 1,1; 2,1 i 0,14 mg/kg sm.

Sklonost gljiva da akumuliraju toksične elemente važna je i sa aspekta ekotoksikologije, jer se na osnovu prisustva toksikanata može utvrditi uzrok zagađenja i mogu se pratiti promene u životnoj sredini. Olovo se akumulira u površinskim slojevima zemljišta što ima veliki ekološki značaj jer ovaj metal u velikoj meri utiče na biološku aktivnost tla. Njegov ulazak u lanac ishrane izaziva hronične zdravstvene probleme.

Toksičnost olova po čoveka ogleda se u činjenici da nema biološku funkciju u telu, ali da stimuliše unos kadmijuma (Kabata–Pendias, 2011). Takav uticaj dovodi do toksičnosti za

brojne organe. Kada dospe u organizam, olovo se putem krvi transportuje do organa tako što se oko 90% Pb vezuje za hemoglobin eritrocita (Silva i sar., 2015). Njegovo toksično delovanje se ogleda u inhibiciji enzima koji regulišu stvaranje hema.

Uobičajeni sadržaj olova u gajenim ili samoniklim vrstama gljiva je do 5 mg/kg sm (Kalač, 2019). Veoma visok sadržaj olova, između 100 i 300 mg/kg sm može se naći u nekim vrstama gljiva koje su ubrane u blizini topionica olova (Kalač i sar., 1991; Petkovsek i Pokorny, 2013; Lepšová i Král, 1988).

Kada je u pitanju olovo u ovom istraživanju, njegov sadržaj kreće se od 0,31 mg/kg sm u vrsti *H. impolitum* sve do 10,6 mg/kg sm u vrsti *B. edulis*, i u poređenju sa rezultatima odgovarajućih istraživanja, dobijene vrednosti su značajno niže, što ukazuje da je sredina gde su gljive ubrane nezagađena olovom (tabela 4.5). Prema literaturnim podacima, Mirończuk–Chodakowska i sar. (2013), utvrđen je visok sadržaj olova za vrstu *Butyriboletus appendiculatus* i on iznosi 34,2 mg/kg sm i 20,3–21,2 mg/kg sm za vrstu *Boletus edulis*.

PNU za olovo, koji je propisala JECFA, (2010), iznosi 25 µg/kg telesne mase, tj. 1750 µg nedeljno. Preračunat nedeljni unos olova pri konzumiranju porcije od 300 g svežih gljiva dat je u tabeli 4.6, odakle se može videti da konzumiranje bilo koje od analiziranih vrsta ne predstavlja rizik po zdravlje ljudi jer procenat nedeljnog unosa ne prelazi 20%.

Prema podacima iz literature, sadržaj toksičnih elemenata u vrstama *R. rhodoxanthus*, *L. albstipitatum* i *I. rhodopurpureus* (osim sadržaja žive) nisu do sada određeni.

4.1.1.3. Neesencijalni elementi koji se mogu naći u gljivama

Dobijeni rezultati za neesencijalne elemente dati su u tabeli 4.7.

Srebro je element koji nema biološku ulogu u ljudskom organizmu i smatra se otrovnim. Izlaganje visokim dozama može dovesti do poremećaja na koži kao što su trajno sivo-plavkasta boja kože. Ispitivani uzorci pokazali su širok interval koncentracije, od 0,14 mg/kg sm kod vrste *X. chrysenteron*, do 223 mg/kg sm kod vrste *L. volemus*. Brzezicha-Cirocka i sar. (2016)) su ispitivali sadržaj srebra u vrsti *Leccinum aurantiacum* sa nezagađenog područja i dobili vrednosti u intervalu od 0,5–1 mg/kg sm, što je u skladu sa našim rezultatom za ovu vrstu (0,31 mg/kg sm).

Aluminijum je metal koji u manjim koncentracijama ne izaziva velike zdravstvene probleme, ali česta i uvećana izloženost aluminijuma može dovesti do većih zdravstvenih problema. Istraživanja su pokazala povezanost između povećanog sadržaja aluminijuma u vodovodnoj mreži Engleske i Velsa i učestaliju pojavu Alchajmerove bolesti kod ljudi koji su tu

vodu konzumirali (Martyn i sar., 1989). Najveći sadržaj aluminijuma od ispitivanih vrsta imaju gljive *R. rhodoxanthus* (164 mg/kg sm) i *L. piperatus* (188 mg/kg sm). Najmanju koncentraciju ima vrsta *L. albstipitatum* (9,8 mg/kg sm) što je u skladu sa podacima u literaturi (Pelkonen i sar., 2008).

Tabela 4.7 Sadržaj neesencijalnih elemenata u odabranim vrstama gljiva (srednja vrednost tri merenja±SD; mg/kg sm)

Vrsta	Ag (mg/kg sm)	Al (mg/kg sm)	Rb (mg/kg sm)	Bi (mg/kg sm)	Sr (mg/kg sm)	Ba (mg/kg sm)
Boletaceae						
<i>B. edulis</i>	2,1±0,1	67±3	58±6	0,44±0,05	2,1±0,2	1,19±0,2
<i>X. chrysesteron</i>	0,14±0,03	68±2	47±3	0,072±0,006	2,5±0,3	1,90±0,1
<i>I. rhodopurpureus</i>	2,3±0,2	28±1	91±8	0,027±0,003	0,98±0,08	/
<i>R. rhodoxanthus</i>	6,1±0,7	164±5	118±10	1,40±0,06	0,51±0,04	0,91±0,06
<i>B. appendiculatus</i>	3,1±0,2	83±2	24±3	0,038±0,003	0,72±0,07	0,33±0,02
<i>L. aurantiacum</i>	0,31±0,04	11±0,9	11,8±0,9	0,011±0,001	0,79±0,08	0,31±0,03
<i>L. albstipitatum</i>	0,79±0,08	9,8±0,9	13±1	0,036±0,003	0,35±0,01	0,79±0,04
<i>H. impolitum</i>	1,88±0,09	56±4	85±6	0,049±0,003	0,68±0,03	0,67±0,05
Russulaceae						
<i>L. semisanguifluus</i>	0,039±0,007	265±11	8±1	0,006±0,000	0,46±0,05	0,039±0,003
<i>L. sanguifluus</i>	0,57±0,04	253±9	14±2	0,021±0,001	0,36±0,02	0,57±0,04
<i>L. deliciosus</i>	4,3±0,2	26±1	24±3	0,18±0,02	0,81±0,06	/
<i>L. volemus</i>	223±10	62±3	17±1	0,40±0,03	0,75±0,06	9,8±0,8
<i>L. piperatus</i>	1,29±0,08	188±9	22±3	0,117±0,009	0,82±0,09	0,82±0,06

Rubidijum je često određivan element u gljivama i njegova koncentracija se kreće u rasponu od 25 do 500 mg/kg sm (Kalač, 2019). Prema literaturnim podacima rubidijum se može naći u mnogim vrstama gljiva u različitoj koncentraciji, ali se vrste koje pripadaju porodici Boletaceae ističu povećanim vrednostima. Prosečan sadržaj rubidijuma u vrstama: *B. appendiculatus* kreće se od 25 mg/kg sm pa do 200 mg/kg sm (Alaimo i sar., 2018), *B. edulis* od 5 mg/kg sm do 500 mg/kg sm (Giannaccini i sar., 2012; Turfan i sar., 2018), *L. deliciosus* od 50 mg/kg sm do 500 mg/kg sm (Campos i Tejera, 2011; Turfan i sar., 2018), i *L. sanguifluus* od 25 do 50 mg/kg sm (Campos i Tejera, 2011; Turfan i sar., 2018). Tyler (1982) je zaključio da postoji visoka pozitivna korelacija između sadržaja rubidijuma u gljivama i supstrata na kome rastu i negativna korelacija sa pH vrednošću. Vrednosti prikazane u ovom radu su u

intervalu vrednosti literaturnih podataka pri čemu se jedino vrsta *R. rhodoxanthus* ističe sa nešto većim sadržajem rubidijuma, 118 mg/kg sm.

Bizmut nije često proučavan element u gljivama, i nema mnogo podataka o sadržaju bizmuta u različitim vrstama gljiva. Njegov sadržaj u samoniklim i kultivisanim gljivama kreće se u koncentracijama manjim od 0,1 mg/kg sm. Među ispitivanim vrstama može se uočiti da tri od pet vrsta gljiva iz porodice Russulaceae ima veće vrednosti od 0,1 mg/kg sm: *L. deliciosus* (0,18 mg/kg sm), *L. volemus* (0,4 mg/kg sm) i *L. piperatus* (0,117 mg/kg sm). Iz porodice Boletaceae jedino se ističu vrsta *R. rhodoxanthus* sa dosta uvećanom vrednošću 1,40 mg/kg sm i *B. edulis* sa koncentracijom 0,44 mg/kg sm.

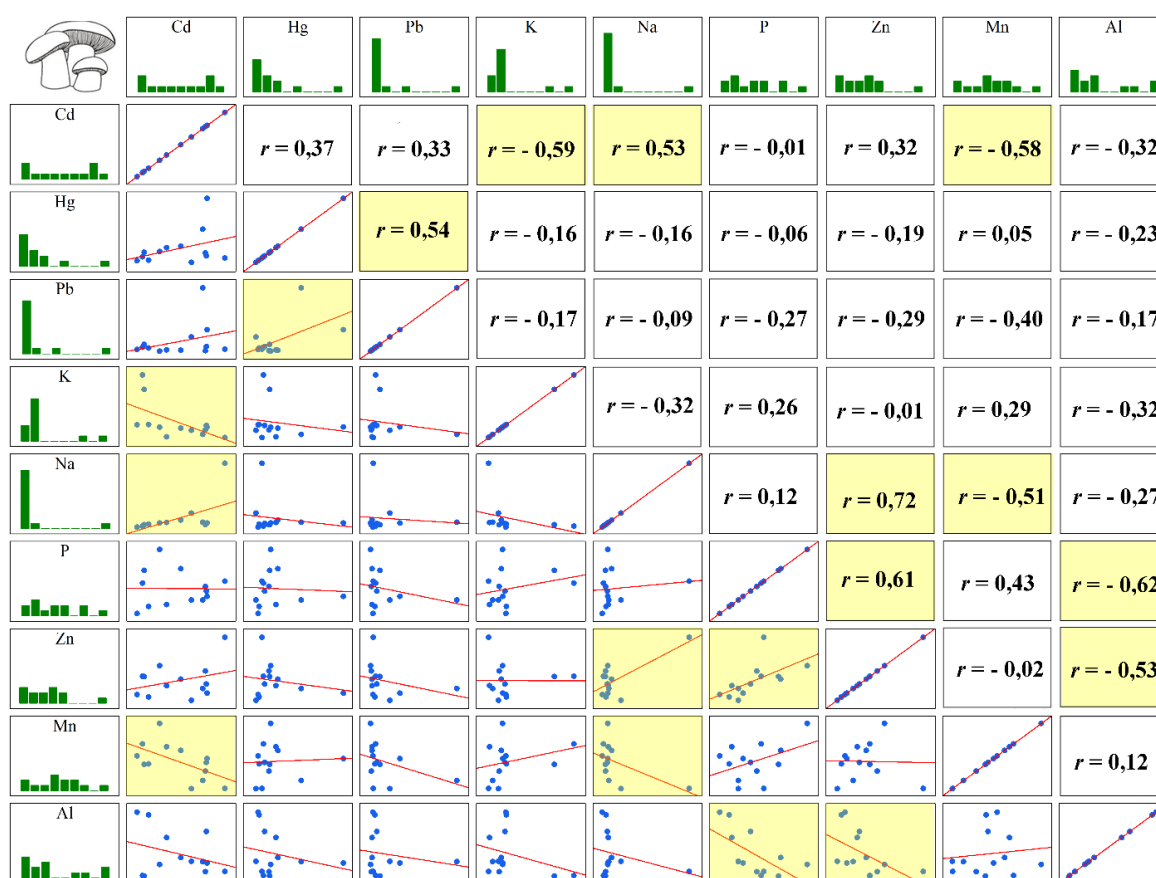
Prosečna koncentracija barijuma i stroncijuma je u samoniklim gljivama koje su rasle u nezagađenim područjima je manja od 2 mg/kg sm, dok je koncentracija barijuma u gljivama koje su brane u geografski specifičnim područjima veća od 10 mg/kg sm. Vrednosti koje se odnose na sadržaj barijuma su prema naučnim izvorima raznolike i zavise od vrste gljiva: *L. piperatus* (1,2 mg/kg sm) (Cvetkovic i sar., 2015), *L. sanguifluus* (10–25 mg/kg sm) (Campos i Tejera, 2011), *L. aurantiacium* (2 mg/kg sm) (Mleczek i sar., 2013) i *L. deliciosus* (2–25 mg/kg sm) (Campos i Tejera, 2011; Mleczek i sar., 2013). Rezultati prikazani u ovom istraživanju su u saglasnosti sa podacima iz literature. Od svih analiziranih vrsta, po visokoj koncentraciji barijuma ističe se gljiva *L. volemus* sa vrednošću od 9,8 mg/kg sm, dok je sadržaj barijuma u ostalim analiziranim gljivama manji od 2 mg/kg sm, što ukazuje na nezagađenost staništa. Za razliku od barijuma, stroncijum se u gljivama nalazi u nešto većoj koncentraciji: *L. piperatus* (2–5 mg/kg sm) (Cvetkovic i sar., 2015), *L. sanguifluus* (10–20 mg/kg sm) (Campos i Tejera, 2011), *L. aurantiacium* (2 mg/kg sm) (Golubkina i Mironov, 2018), *L. deliciosus* (2–30 mg/kg sm) (Campos i Tejera, 2011; Mleczek i sar., 2013) i *B. appendiculatus* (2 mg/kg sm) (Alaimo i sar., 2018). Vrednosti za ispitivane vrste gljiva su nešto manje od literaturnih (1 mg/kg sm), osim za vrste *B. edulis* i *X. chrysenteron* čije vrednosti prelaze 2 mg/kg sm (2,1 mg/kg sm i 2,5 mg/kg sm).

U dostupnoj literaturi mnogo je manje podataka o sadržaju neesencijalnih elemenata u gljivama. Vrste u kojima je prvi put određen sadržaj elemenata su: *X. chrysenteron* (Bi), *I. rhodopurpureus* (Ag, Al, Rb, Bi, Sr i Ba), *R. rhodoxanthus* (Ag, Al, Rb, Sr i Ba), *B. appendiculatus* (Bi), *L. aurantiacium* (Rb i Bi), *L. albostipitatum* (Ag, Al, Rb, Bi, Sr i Ba), *H. impolitum* (Al i Bi), *L. deliciosus* (Bi), *L. sanguifluus* (Ag i Bi), *L. semisanguifluus* (Ag, Al, Rb, Bi, Sr i Ba), *L. piperatus* (Rb, Bi i Ba) i *L. volemus* (Rb i Bi).

4.1.2. Hemometrijska analiza sadržaja elemenata u gljivama

4.1.2.1. Korelaciona analiza

Rezultati koji se odnose na elementni sastav gljiva bili su osnov za statističku obradu kako bi se utvrdilo da li postoji korelacija između sadržaja elemenata i odabranih vrsta gljiva. U ovom istraživanju određen je sadržaj 22 elementa u odabranim vrstama gljiva. Najpre je određena korelacija svih elemenata, pri čemu su za dalju analizu uzeti samo oni elementi koji su pokazivali značajnu međusobnu korelaciju (Cd, Hg, Pb, Na, K, P, Zn, Mn i Al). Dobijeni rezultati su prikazani na slici 4.1.



Slika 4.1 Korelaciona analiza elementnog sadržaja u odabranim vrstama gljiva i Pirsonov koeficijent linearne korelacije (r) ($p < 0,05$)

Ukoliko je koeficijent korelacije manji od 0,5 smatra se da je korelacija loša, vrednosti koeficijenta korelacije između 0,5 i 0,7 ukazuju na srednju korelaciju, a ukoliko je koeficijent korelacije veći od 0,7 onda je korelacija između varijabli odlična (Lanjwani i Channa, 2019). Sa slike 4.1 se može videti da postoje više značajnih korelacija ($r > 0,5$) među izdvojenim elementima.

Najveći korelacioni koeficijent javlja se između sadržaja Na i Zn ($r=0,72$). Pošto je koeficijent korelacije pozitivan znači da se uz povećanje sadržaja jednog može očekivati porast sadržaja i drugog elementa, odnosno da jedna varijabla može da predvidi drugu. Podaci iz literature potvrđuju ovu zavisnost (Lanjwani i Channa, 2019).

4.1.2.2. Analiza glavnih komponenata (PCA)

Kako bi se objasnila veza između elemenata i odabranih vrsta gljiva urađena je analiza glavnih komponenti. PCA analiza primenjena je na rezultate sadržaja sledećih elemenata u gljivama: Cd, Hg, Pb, Na, K, P, Zn, Mn i Al.

Najpre je utvrđen broj svojstvenih vrednosti koje treba uzeti u razmatranje pri PCA analizi kao i njihov udeo u varijansi (tabela 4.8).

Tabela 4.8 Promena svojstvene vrednosti u funkciji njenog broja

Glavna komponenta	Svojstvena vrednost	Ukupna varijansa (%)	Kumulativna varijansa (%)
PC1	<u>4,30</u>	<u>50,8</u>	<u>50,8</u>
PC2	<u>2,91</u>	<u>31,5</u>	<u>82,3</u>
PC3	0,87	7,1	89,4
PC4	0,32	4,2	93,6
PC5	0,25	3,5	97,0
PC6	0,14	1,0	98,0
PC7	0,10	1,1	99,2
PC8	0,08	0,6	99,8
PC9	0,03	0,2	100

Podvučene vrednosti pokazuju najveći doprinos ukupnoj varijansi

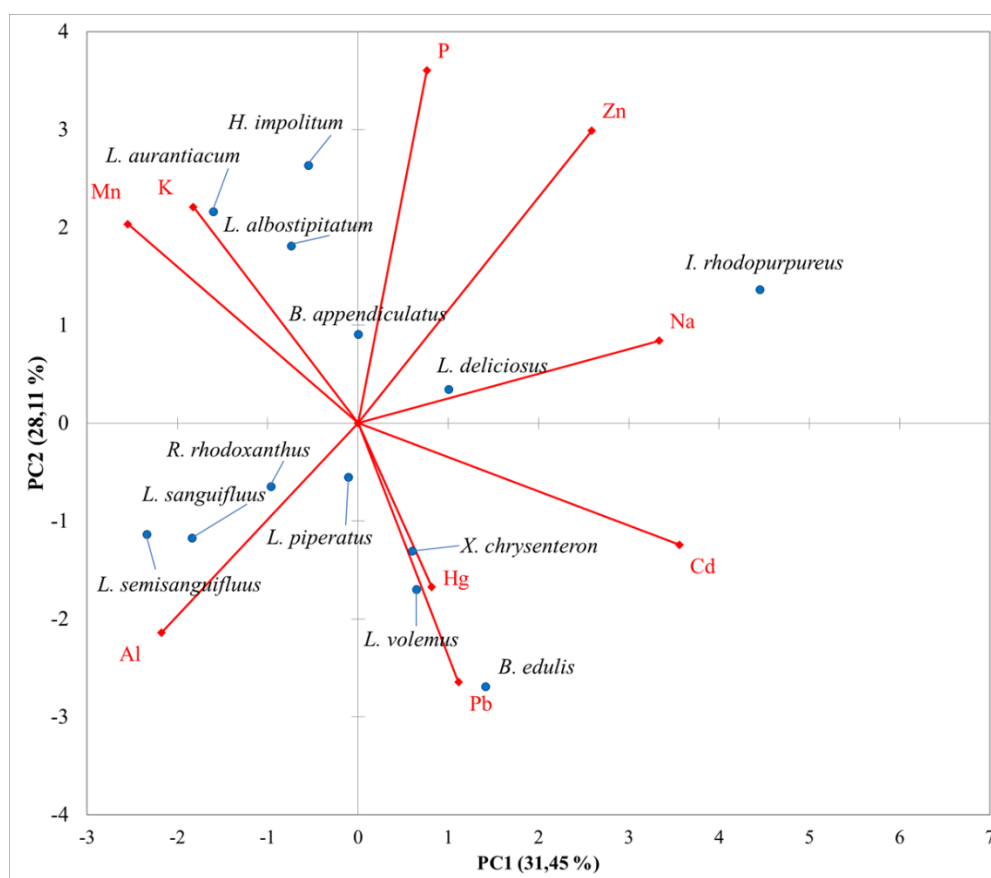
Ova statistička analiza kao rezultat dala je dvokomponentni model koji objašnjava 82,3% ukupne varijanse između dobijenih rezultata. Svojstvena vrednost prve glavne komponente je najveća i ukazuje na njen najveći udeo u ukupnoj varijansi. S obzirom na to da samo prve dve komponente imaju svojstvenu vrednost veću od 1 (Kaiser, 1960) i čine 82,3%, za dalje razmatranje će se one koristiti, jer informacije koje su sadržane u preostalim varijablama nemaju veliki značaj za analizu. Iz tabele 4.8 se može uočiti da prva glavna komponenta (PC1) objašnjava 50,8% ukupne varijanse i da najveći doprinos ovoj komponenti daju kadmijum (26,7%) i natrijum (23,4%) (tabela 4.9). Druga glavna komponenta (PC2) objašnjava 31,45% ukupne varijanse i fosfor ima najveći doprinos ovoj komponenti.

Tabela 4.9 Doprinos svake varijable ukupnoj varijabilnosti i faktorske koordinate varijabli

Varijable	Doprinos sadržaja elemenata (%)		Faktorske koordinate varijabli	
	PC 1	PC 2	PC 1	PC 2
Cd	<u>26,7</u>	3,2	0,869	-0,287
Hg	1,4	5,9	0,199	-0,386
Pb	2,6	14,7	0,272	-0,610
K	7,0	10,2	-0,445	0,509
Na	<u>23,4</u>	1,5	0,814	0,194
P	1,2	<u>27,3</u>	0,186	0,831
Zn	14,1	18,8	0,632	0,690
Mn	13,7	8,7	-0,622	0,469
Al	9,9	9,6	-0,530	-0,494

Podvučene vrednosti pokazuju najveći doprinos ukupnoj varijansi

Na slici 4.2 prikazana je podela gljiva na osnovu sadržaja elemenata, dobijena analizom glavnih komponenti.



Slika 4.2 PCA dijagram dobijen na osnovu sadržaja elemenata u ispitivanim vrstama gljiva

Varijable kadmijum (0,869) i natrijum (0,814) imaju najveće pozitivno opterećenje na PC1 i najviše doprinose prvoj glavnoj komponenti (26,7% i 23,4%). Vrsta *I. rhodopurpureus* ima najveće pozitivno opterećenje na PC1 (4,450) i najveći doprinos 53,8%, što se moglo i očekivati zbog visokog sadržaja kadmijuma i natrijuma. Svi ostali elementi (K, Na, P, Zn i Mn) imaju pozitivno opterećenje na PC2 i smešteni su u gornjem delu dijagrama. Najveći doprinos drugoj glavnoj komponenti daje fosfor (27,3%) i vrsta *H. impositum* (21%), što je i očekivano obzirom na visoku koncentraciju ovog elementa u pomenutoj vrsti.

Sa slike 4.2 se takođe može uočiti da su svi toksični elementi (Cd, Hg, Pb i Al) smešteni u donjem delu dijagrama. Svi navedeni elementi imaju negativno opterećenje na PC2 (-0,287; -0,386; -0,610 i -0,494).

Iz tabele 4.10 se može uvideti da vrste: *B. edulis*, *X. chrysenteron*, *R. rhodoxanthus*, *L. semisanguifluus*, *L. sanguifluus*, *L. volemus* i *L. piperatus* imaju negativno opterećenje na PC2 (-2,69; -1,309; -0,65; -1,138; -1,173; -1,698; -0,555), dok najveći doprinos ima gljiva *B. edulis* (22%). Na osnovu dobijenih rezultata za sadržaj elemenata u gljivama i PCA analize može se zaključiti da sve pomenute vrste imaju visok sadržaj toksičnih elemenata i da su se zato izdvojile u donjem delu dijagrama, dok je vrsta *B. edulis* predstavnik ovog klastera jer ima najveći doprinos na PC2, kao i visok sadržaj toksičnih elemenata.

Tabela 4.10 Doprinos svake vrste gljiva ukupnoj varijabilnosti

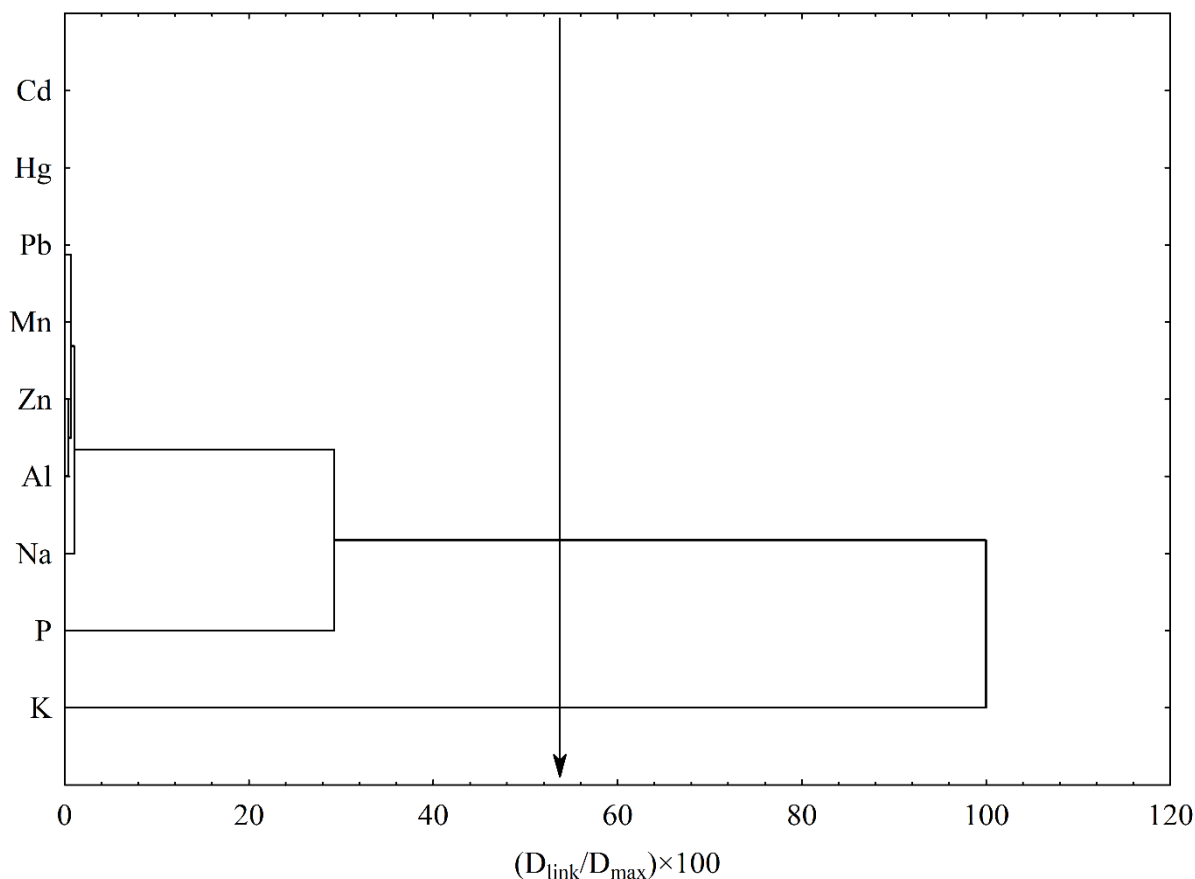
Vrste	Doprinos svake vrste (%)		Faktorske koordinate uzoraka	
	PC 1	PC 2	PC 1	PC 2
<i>B. edulis</i>	5,5	<u>22,0</u>	1,416	-2,690
<i>X. chrysenteron</i>	1	5,2	0,601	-1,309
<i>I. rhodopurpureus</i>	<u>53,8</u>	5,7	4,450	1,365
<i>R. rhodoxanthus</i>	2,5	1,3	-0,962	-0,650
<i>B. appendiculatus</i>	0,000	2,5	0,003	0,907
<i>L. aurantiacum</i>	6,9	14,2	-1,599	2,159
<i>L. albobstipitatum</i>	1,5	9,9	-0,739	1,807
<i>H. impositum</i>	0,8	<u>21,0</u>	-0,548	2,631
<i>L. semisanguifluus</i>	14,9	3,9	-2,340	-1,138
<i>L. sanguifluus</i>	9,2	4,2	-1,838	-1,173
<i>L. deliciosus</i>	2,8	0,4	1,006	0,346
<i>L. volemus</i>	1,2	8,8	0,651	-1,698
<i>L. piperatus</i>	0,0	0,9	-0,102	-0,555

Podvučene vrednosti pokazuju najveći doprinos ukupnoj varijansi

4.1.2.3. Klaster analiza

Kako se primenom PCA analize nisu dobile jasno definisane grupe uzoraka, urađena je klaster analiza. Ona za cilj ima razdvajanje uzoraka tako što grupiše slične uzorke u homogene podskupove na osnovu kojih se mogu otkriti obrasci koji se odnose na fenomen koji se ispituje (Boccard i Rudaz, 2013). Vardova metoda je korišćena kako bi se se klasifikovale vrste gljiva na osnovu sadržaja odabranih elemenata, a Euklidova rastojanja prikazana su kao odnos $(D_{link}/D_{max}) \times 100$, gde je D_{link} rastojanje između varijabli koje se grupišu, a D_{max} maksimalno rastojanje između varijabli (Nikolić, 2018). Za dalju obradu korišćeno je Euklidovo rastojanje, jer se na osnovu njega se može videti koji parovi pokazuju najveću sličnost.

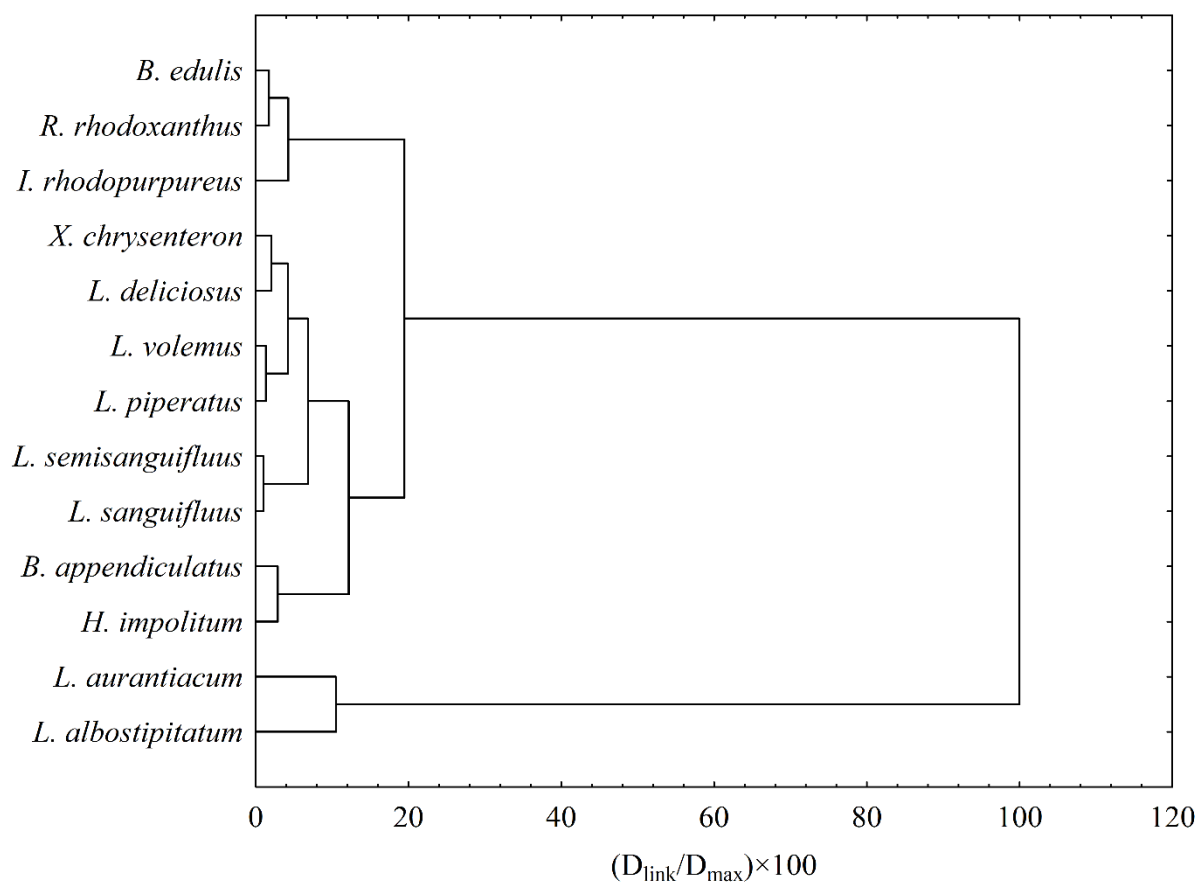
Za klaster analizu korišćeni su samo elementi koji su pokazivali značajnu međusobnu korelaciju (Cd, Hg, Pb, Na, K, P, Zn, Mn i Al) i rezultat ove analize prikazan je na slikama 4.3 i 4.4 u vidu dendrograma. Sa dendrograma se može videti da su analizirani elementi podeljeni u dva značajna klastera, $((D_{link}/D_{max}) \times 100 = 50)$.



Slika 4.3 Dendrogram grupisanja elemenata na osnovu njihovog sadržaja u ispitivanim uzorcima gljiva

Prvi klaster čini kalijum, element koji je nađen u svim gljivama u značajno većoj koncentraciji nego ostali elementi. Drugi klaster sastoji se od preostalih elemenata (Cd, Hg, Pb, Na, P, Zn, Mn i Al) i može se podeliti u dva potklastera, pokazujući grupisanje svih toksičnih elemenata zajedno sa Al, Zn, Na i Mn u jednom potklasteru i P kao zaseban potklaster.

Drugi dendrogram (slika 4.4) predstavlja povezivanje vrste gljiva na osnovu sadržaja elemenata u njima. Na osnovu klaster analize analizirane gljive su podeljene u dva značajna klastera, ($(D_{\text{link}}/D_{\text{max}}) \times 100 = 50$).



Slika 4.4 Dendrogram grupisanja gljiva na osnovu sadržaja elemenata

Prvi klaster čine gljive: *B. edulis*, *R. rhodoxanthus*, *I. rhodopurpureus*, *X. chrysenteron*, *L. deliciosus*, *L. volemus*, *L. piperatus*, *L. semisanguifluus*, *L. sanguifluus*, *B. appendiculatus* i *H. impolitum*. Ovaj klaster ima dva potklastera: prvi koji čine vrste gljiva porodice Boletaceae (*B. edulis*, *R. rhodoxanthus* i *I. rhodopurpureus*) i drugi koji uglavnom čine gljive porodice Russulaceae (*X. chrysenteron*, *L. deliciosus*, *L. volemus*, *L. piperatus*, *L. semisanguifluus*, *L. sanguifluus*, *B. appendiculatus* i *H. impolitum*). Drugi potklaster se dalje može sagledati kao

skup četiri potpotklastera koji jasno odvajaju gljive iz različitih porodica. Na osnovu Euklidovog rastojanja, koje se dobija primenom klaster analize uočava se da je najveća sličnost između vrsta *L. semisanguifluus* i *L. sanguifluus* (786–Euklidovo rastojanje), što je i očekivano jer ove dve vrste imaju sličan sadržaj elemenata. Zatim sledi grupisanje vrsta *L. volemus* i *L. piperatus* (1049–Euklidovo rastojanje) koje takođe imaju sličan sadržaj elemenata koji se međusobno razlikuje od prethodnog podpotklastera. Vrste *X. chrysenteron* i *L. deliciosus* ne pripadaju istoj porodici gljiva, ali su se grupisale zajedno zbog sličnog sastava (1578–Euklidovo rastojanje). Vrste *B. appendiculatus* i *H. impolitum* čine četvrti potpotklaster (2250–Euklidovo rastojanje). Drugi klaster čine vrste *L. aurantiacum* i *L. allostipitatum* (8159–Euklidovo rastojanje). Ove dve vrste razlikuju se od ostalih analiziranih gljiva po sadržaju kalijuma, koji je znatno veći nego kod ostalih gljiva.

4.1.3. Sadržaj fenolnih kiselina u gljivama

4.1.3.1. HPLC analiza fenolnih kiselina

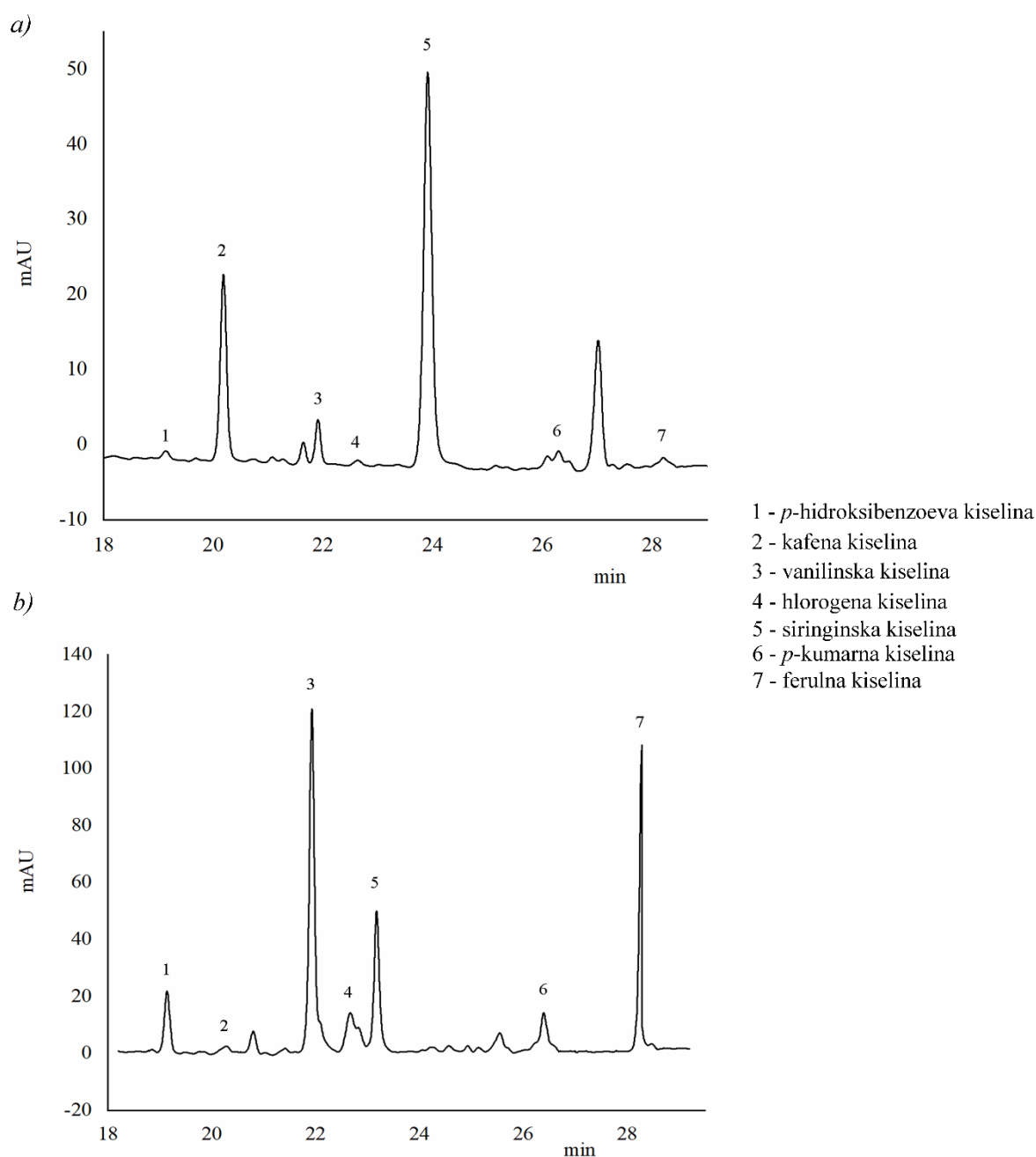
Iako su gljive bile predmet mnogih naučnih istraživanja, sadržaj fenolnih kiselina u porodicama Boletaceae i Russulaceae vrlo je retko ispitivan.

U cilju određivanja kvalitativnog i kvantitativnog sastava fenolnih kiselina u metanolnim ekstraktima gljiva korišćena je HPLC analiza, kojom je utvrđeno prisustvo sledećih fenolnih kiselina: *p*-hidroksibenzoeva, kafena, vanilinska, hlorogena, siringinska, *p*-kumarna i ferulna kiselina. Poznato je i da pomenuta jedinjenja utiču na čvrstinu ćelijskog zida i štite od patogena tako što se oslobađaju enzimskom hidrolizom kao signalna ili odbrambena jedinjenja koja imaju funkciju zaštite od napada patogena ili pak služe za inkorporiranje u ćelijski zid (Dey i sar., 2005).

Prethodna istraživanja su pokazala da se većina fenolnih kiselina ne može ekstrahovati vodenim rastvorom metanola, već da je neophodno uraditi hidrolizu kako bi se ova jedinjenja oslobodila iz strukture ćelijskog zida (Malešević, 2016). Kvalitativno i kvantitativno određivanje fenolnih kiselina u gljivama izvršeno je nakon kisele hidrolize jer je poznato da se ova grupa jedinjenja u prirodi uglavnom nalazi u vidu derivata- estara i glikozida. Hidroliza je važna prilikom analize zbog stabilnosti fenolnih kiselina u ekstraktima (Haghi i Hatami, 2010).

Na slici 4.5 prikazani su HPLC hromatogrami metanolnih ekstrakata gljive *L. allostipitatum* iz porodice Boletaceae i gljive *L. volemus* koja pripada porodici Russulaceae a rezultati HPLC analize fenolnih kiselina dati su u tabeli 4.11. Ove dve vrste gljiva su odabrane

kao predstavnici svojih porodica jer su kod njih detektovane sve fenolne kiseline.



Slika 4.5 HPLC hromatogrami metanolnih ekstrakata: a) *L. volemus*, b) *L. albostipitatum*

Fenolne kiseline su glavna fenolna jedinjenja prisutna u gljivama (Ferreira i sar., 2009). Literaturni podaci ukazuju da su u gljivama najčešće identifikovani derivati cimetine kiseline: *p*-kumarna, kafena, hlorogena i ferulna kiselina dok su derivati benzoeve kiseline: vanilinska, siringinska i *p*-hidroksibenzoeva kiselina manje prisutne (Puttaraju i sar., 2006; Heleno i sar., 2011), što je u skladu sa ovim istraživanjem. HPLC analizom metanolnih ekstrakata gljiva utvrđen je različit sastav i količina fenolnih kiselina.

Tabela 4.11 Sadržaj fenolnih kiselina (mg/kg se) u metanolnim ekstraktima gljiva iz porodice Boletaceae i Russulaceae

Vrste	<i>p</i> -hidroksi benzoeva (mg/kg se)	Kafena kiselina (mg/kg se)	Vanilinska kiselina (mg/kg se)	Hlorogena kiselina (mg/kg se)	Siringinska kiselina (mg/kg se)	<i>p</i> -kumarna kiselina (mg/kg se)	Ferulna kiselina (mg/kg se)	Σ
Boletaceae								
<i>B. edulis</i>	n.d.	4,8±0,2	n.d.	1,37±0,02	n.d.	1,71±0,03	n.d.	7,878
<i>X. chrysenteron</i>	n.d.	n.d.	8,5±0,3	0,954±0,009	20,4±0,9	7,4±0,2	n.d.	37,313
<i>I. rhodopurpureus</i>	n.d.	0,66±0,05	13,0±0,5	n.d.	5,92±0,07	0,90±0,02	0,801±0,009	21,309
<i>R. rhodoxanthus</i>	n.d.	0,54±0,02	5,89±0,07	2,12±0,04	n.d.	0,60±0,01	0,432±0,005	9,591
<i>B. appendiculatus</i>	0,43±0,03	0,78±0,04	48±1	1,15±0,04	n.d.	0,59±0,01	0,71±0,02	51,447
<i>L. aurantiacum</i>	1,32±0,08	0,27±0,01	10,0±0,4	2,69±0,07	n.d.	1,17±0,03	0,94±0,03	16,402
<i>L. albobstipitatum</i>	9,2±0,3	0,67±0,05	39,5±0,9	6,2±0,2	11,1±0,6	1,39±0,04	14,1±0,9	82,118
<i>H. impolitum</i>	4,0±0,1	9,9±0,2	156±3	n.d.	n.d.	2,21±0,05	4,73±0,08	176,761
Russulaceae								
<i>L. semisanguifluus</i>	1,59±0,09	n.d.	0,99±0,04	3,0±0,1	0,813±0,005	0,320±0,004	1,32±0,05	8,069
<i>L. sanguifluus</i>	3,19±0,03	n.d.	0,259±0,007	2,45±0,06	10,4±0,7	0,176±0,001	3,65±0,09	20,161
<i>L. deliciosus</i>	0,553±0,002	n.d.	3,55±0,04	n.d.	0,517±0,006	1,21±0,02	n.d.	5,834
<i>L. volemus</i>	0,349±0,003	2,13±0,07	1,37±0,02	0,315±0,007	12,4±0,3	0,183±0,002	0,210±0,003	16,937
<i>L. piperatus</i>	n.d.	0,184±0,006	1,40±0,03	n.d.	6,05±0,1	0,045±0,001	0,094±0,001	7,777

Kako ove fenolne komponente imaju različitu biološku aktivnost, smatra se da one mogu biti odgovorne za manju ili veću antioksidativnu aktivnost gljiva. Na osnovu prikazanih rezultata, može se uočiti da su gljive koje pripadaju porodici Boletaceae bogatije fenolnim kiselinama, pa se može očekivati da pokazuju veću antioksidativnu aktivnost.

Fenolne kiseline svoju antioksidativnu aktivnost ispoljavaju tako što otpuštaju vodonikov atom ili učestvuju u reakcijama „hvatanja” slobodnih radikala, a njihova efikasnost je u vezi sa brojem i pozicijom hidroksilnih grupa u molekulu (Bajić-Ljubičić, 2018).

Derivati hidroksicimetne kiseline (*p*-kumarinska, kafena, ferulna i sinapinska kiselina) efikasniji su antioksidansi od derivata hidroksibenzojeve kiseline zbog prisustva dvostruke veze koja učestvuje u stabilizaciji nastalog aroksil radikala rezonancijom (Pereira i sar., 2009).

Ispitivane vrste sadrže od tri do sedam fenolnih kiselina (tabela 4.11). *p*-kumarna kiselina je jedina fenolna kiselina koja je identifikovana u svim uzorcima i prisutna je u koncentracionom opsegu od 0,045 mg/kg se kod vrste *L. piperatus* do 7,4 mg/kg se kod vrste *X. chrysenteron*. *p*-kumarna kiselina je fenolno jedinjenje koje se osim u gljivama može pronaći i u žitaricama (kukuruz, pirinač, zob i pšenica), voću (jabuke, kruške) i povrću (šargarepa, krompir, pasulj, luk i paradajz) (El-Seedi i sar., 2012). Ova fenolna kiselina poseduju niz farmakoloških aktivnosti kao što su antioksidativna (Zang i sar., 2000), antimikrobna (Pragasam i sar., 2013), antiinflamatorna (Pragasam i sar., 2013) i antivirusna aktivnost (Tanida i sar., 2015). Pregled dostupne literature ukazuje na sličan sadržaj *p*-kumarne kiseline u gljivama. Navodi u literaturi (Heleno i sar., 2011) ukazuju da je sadržaj *p*-kumarne kiseline u vrsti *B. edulis* 1,17 mg/kg se što je približno vrednosti 1,71 mg/kg se do koje se došlo u ovom radu, dok u vrstama *B. purpureus* i *B. rhodoxanthus* pomenuti istraživači nisu identifikovali ovu kiselinu. Ova razlika u sadržaju *p*-kumarne kiseline može se objasniti različitom ekstrakcijom i primenom različitih rastvarača. Putaraju i sar. (2006) u svom radu navode da je sadržaj *p*-kumarne kiseline u vrsti *L. sanguifluus* 0,04 mg/kg se dok se u vrsti *B. edulis* i *L. deliciosus* nalazi u tragovima. Vrednost od 5,5 mg/kg se za *p*-kumarnu kiselinu u vrsti *X. chrysenteron* (Heleno i sar., 2012) u potpunosti je saglasna sa rezultatom prezentovanim u ovom radu. Iako je prisutna u svim vrstama, ova kiselina nema veliki doprinos ukupnom sadržaju fenolnih kiselina (manje od 10% ukupnih fenolnih kiselina) izuzev kod vrsta *B. edulis* (21,4%), *L. deliciosus* (20,7%) i *X. chrysenteron* (19,9%).

Upoređivanjem identifikovanih fenolnih kiselina u ispitivanim uzorcima gljiva, može se uočiti da je kafena kiselina detektovana u svim uzorcima vrsta porodice Boletaceae, izuzev kod vrste *X. chrysenteron*, u koncentracionom opsegu do 0,27 mg/kg se do 9,9 mg/kg se. Takođe, kod vrste *B. edulis*, može se uočiti da 61,2% od ukupne količine fenolnih kiselina čini kafena

kiselina. Međutim, ovo fenolno jedinjenje nije prisutno u svim ispitivanim uzorcima gljiva porodice Russulaceae već samo u *L. volemus* (2,13 mg/kg se) i *L. piperatus* (0,184 mg/kg se). Zaključuje se da je sadržaj kafene kiseline mali, manji od 6% u svim uzorcima, osim kod vrste *B. edulis* (61,2%) i *L. volemus* (12,6%). Rezultati Heleno i sar. (2011), koji su vezani za sadržaj kafene kiseline u ekstraktima vrste *L. deliciosus* i *L. sanguifluus*, u saglasnosti su sa rezultatima dobijenim u ovom istraživanju. Natella i sar. (1999) su ustanovili da kafena kiselina ima manju antioksidativnu aktivnost u poređenju sa sinapinskom kiselinom. Chen i sar. (1999) dokazali su da najaktivnije uklanja DPPH radikale.

Hlorogena kiselina štiti domaćina od napada patogena tako što se u organizmu parazita konvertuje u toksični hlorogenohinon koji reaguje sa $-SH$ i $-NH_2$ grupama vezanim za protein i na taj način narušava funkciju proteina i aminokiselina samog patogena (Francišković, 2015). U ispitivanim uzorcima koncentracija hlorogene kiseline je najveća kod vrste *L. albobipatatum* (6,2 mg/kg se) a najmanji kod *L. volemus* (0,315 mg/kg se), dok u vrstama *I. rhodopurpureus*, *H. impolitum*, *L. deliciosus* i *L. piperatus* nije identifikovana. U vrsti *L. semisanguifluus*, 37,7% od ukupnog sadržaja fenolnih kiselina čini hlorogena kiselina, što je ujedno i najveći pojedinačni sadržaj neke fenolne kiseline za ovu gljivu. Hlorogena kiselina ispoljava visoku antioksidativnu aktivnost (Kayano i sar., 2002), delujući na heliranje metalnih jona, inhibirajući oksidaciju lipida i peroksidativne enzime i eliminišući slobodne radikale (Kim i sar., 2003).

Za antioksidativnu aktivnost ferulne kiseline i njenih estara odgovorne su tri funkcionalne karakteristike molekula, pre svega prisustvo elektron-donorskih grupa na aromatičnom prstenu, zatim karboksilna grupa sa susednom nezasićenom C-C vezom koja može da predstavlja dodatno mesto za napad slobodnih radikala čime se sprečava njihov napad na membranu i na kraju karboksilna grupa koja služi kao sidro kojim se vezuje za lipidni dvosloj pružajući zaštitu od lipidne peroksidacije (Jakovetić-Tanasković, 2016). Pomoću DPPH metode ispitana je antioksidativna aktivnost estara ferulne kiseline, jer se smatra da je glavni mehanizam njihovog antioksidativnog delovanja upravo hvatanje slobodnih radikala (Nenadis i sar., 2003). Sadržaj ferulne kiseline u vrsti *L. albobipatatum* je najveći i iznosi 14,1 mg/kg se što predstavlja 17,2% od ukupnog sadržaja fenolnih kiselina. Iz porodice Russulaceae najveći sadržaj ferulne kiseline ima *L. sanguifluus* (3,65 mg/kg se) dok u vrstama *B. edulis*, *X. chrysenteron* i *L. deliciosus* nije identifikovana ova fenolna kiselina. Iskazano u procentima, ferulna kiselina nema veliki doprinos na ukupan sadržaj fenolnih kiselina i kreće se od 1,2% kod vrste *L. piperatus* do 18,1% kod vrste *L. sanguifluus*. Pored *p*-kumarne kiseline, koja je identifikovana u svim ispitivanim uzorcima, vanilinska kiselina je takođe sveprisutna izuzev

kod vrste *B. edulis*. Ova kiselina je dominantna kod svih vrsta gljiva iz porodice Boletaceae, najveća vrednost je zabeležena kod vrste *H. impolitum* 156 mg/kg se, što čini 88,2% ukupnog sadržaja fenolnih kiselina. Vrsta *B. appendiculatus* se takođe izdvojila po visokom sadržaju fenolnih kiselina (48 mg/kg se), i zbog činjenice da od ukupnog sadržaja fenolnih kiselina čak 92,9% čini vanilinska kiselina. Pored pomenutih gljiva porodice Boletaceae, treba izdvojiti i vrste *R. rhodoxanthus*, *I. rhodopurpureus* i *L. aurantiacium* sa preko 60% vanilinske kiseline. Vrste gljiva koje pripadaju porodici Russulaceae imaju manji sadržaj ove kiseline i on se kreće u opsegu koncentracije od 0,259 mg/kg se kod vrste *L. sanguifluus* do 3,55 mg/kg se kod vrste *L. deliciosus*, ali njen doprinos ukupnoj količini fenolnih kiselina nije zanemarljiv i kreće se od 1,3% do 60,9%. Vanilinska kiselina pokazuje antioksidativna, antimikrobna i antibakterijska svojstva (Rasheeda i sar., 2018) i smanjuje oksidativni stres prouzrokovan kardiovaskularnim bolestima (Delaquis i sar., 2005).

Pored vanilinske kiseline veliki doprinos ukupnoj količini fenolnih kiselina ima i siringinska kiselina koja nije identifikovana u svim uzorcima, ali u uzorcima u kojima jeste ima značajan doprinos koji se kreće od 8,9% (*L. deliciosus*) do 77,8% (*L. piperatus*). Može se uočiti da je ova kiselina prisutna u svim vrstama gljiva porodice Russulaceae i to u koncentraciji od 0,517 mg/kg se do 12,4 mg/kg se, dok je kod vrsta porodice Boletaceae prisutna samo kod *I. rhodopurpureus* (5,92 mg/kg se), *L. albostipatum* (11,1 mg/kg se) i *X. chrysenteron* (20,4 mg/kg se). Fenolna jedinjenja poput vanilinske i siringinske kiseline su proizvodi biljaka i gljiva i imaju kardiozaštitnu ulogu (Bharathy i sar., 2017).

p-hidroksibenzoeva kiselina kao i *p*-kumarna kiselina imaju OH grupu u para položaju koji obično daje biološku aktivnost (Taofiq i sar., 2015). Od ispitivanih vrsta, *L. albostipatum* ima najveći sadržaj *p*-hidroksibenzoeve kiseline (9,2 mg/kg se), kao i *L. sanguifluus* (3,19 mg/kg se) iz porodice Russulaceae. Doprinos ove kiseline ukupnom sadržaju fenolnih kiselina manji je za vrste koje pripadaju porodici Boletaceae i kreće se u opsegu od 0,8% do 11,2%, dok je u vrstama porodice Russulaceae dominantniji i ide do 19,6% za vrstu *L. semisanguifluus*. U vrstama *B. edulis*, *X. chrysenteron*, *I. rhodopurpureus*, *R. rhodoxanthus* i *L. piperatus* nije identifikovana *p*-hidroksibenzoeva kiselina. Heleno i sar. (2011) su objavili da je sadržaj *p*-hidroksibenzoeve kiseline u ekstraktima vrste *B. edulis* i *B. rhodoxanthus* 6,55 mg/kg se i 22,57 mg/kg se, dok u vrsti *B. purpureus* nije detektovana ova kiselina. Rezultati dobijeni za *p*-hidroksibenzoevu kiselinu u ovom istraživanju nisu u potpunosti u skladu sa navedenom literaturom. U literaturi je prikazano da vrsta *X. chrysenteron* sadrži *p*-hidroksibenzoevu kiselinu (0,98 mg/kg se) (Helleno i sar., 2012).

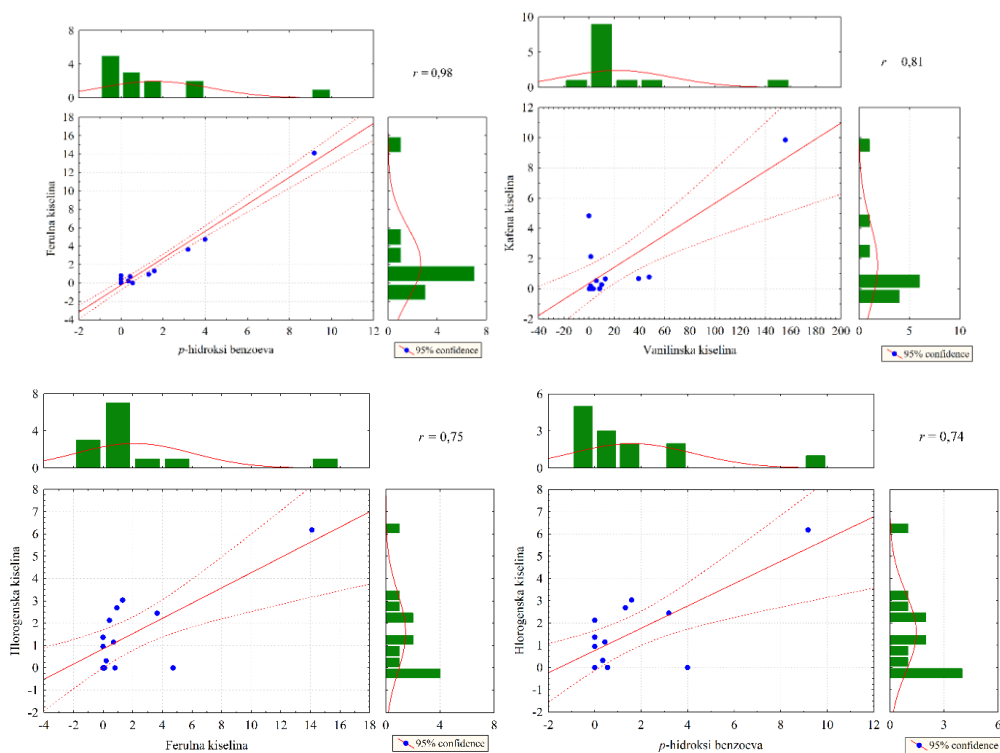
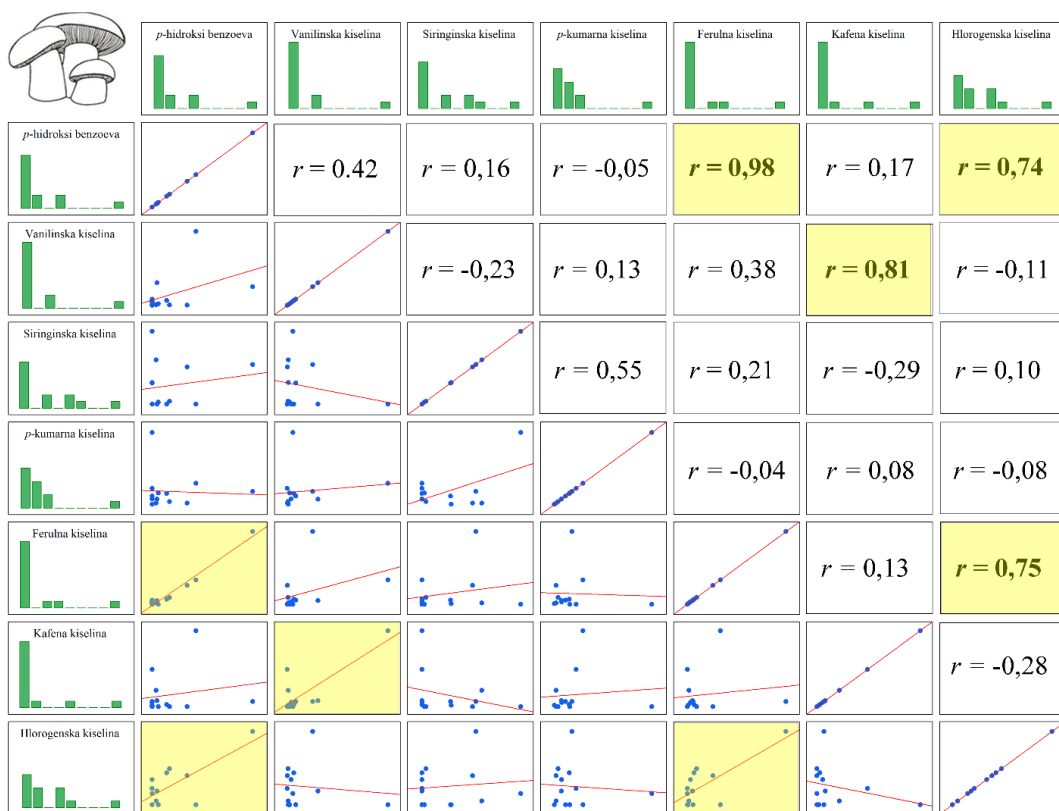
4.1.4. Hemometrijska analiza sadržaja fenolnih kiselina u gljivama

4.1.4.1. Korelaciona analiza sadržaja fenolnih kiselina u gljivama

Kako bi se odredila jačina i smer linearne veze između sadržaja ispitivanih fenolnih kiselina u odabranim vrstama gljiva, urađena je korelaciona analiza i kao rezultat dobijeni su koeficijenti Pirsonove linearne korelacije (r). Rezultati su prikazani na slici 4.6.

Korelaciona analiza sadržaja fenolnih kiselina u odabranim vrstama gljiva porodice Boletaceae i Russulaceae pokazuje da postoji više statistički značajnih korelacija ($p < 0,05$). Značajne vrednosti Pirsonovog koeficijenta korelacije su u rasponu od 0,74 do 0,98.

Najveći stepen korelacije javlja se između sadržaja ferulne i p -hidroksibenzoeve kiseline, $r = 0,98$; kafene i vanilinske kiseline, $r = 0,81$; ferulne i hlorogene kiseline, $r = 0,75$; i hlorogene i p -hidroksibenzoeve kiseline, $r = 0,74$. U ovom istraživanju su sve značajne korelacije pozitivne, što ukazuje na povezanost sadržaja kiselina u uzorcima ispitivanih gljiva na način da povećanje sadržaja jedne dovodi i do povećanja sadržaja druge kisleine. Tako, poznavanjem vrednosti jedne varijable može se sa većom ili manjom sigurnošću predvideti vrednost druge. Dijagram rasipanja omogućava, pogotovo kada je linija prava, tj. kada su varijable raspoređene tako da se može formirati prava linija, da se sa velikom sigurnošću tačno utvrdi vrednost druge, nepoznate, varijable. Dijagrami rasipanja za značajne korelacije prikazani su na slici 4.6.



Slika 4.6 Korelaciona analiza sadržaja fenolnih kiselina u odabranim vrstama gljiva i Pirsonov koeficijent linearne korelacije (r) ($p < 0,05$)

4.1.4.2. Analiza glavnih komponenti (PCA) sadržaja fenolnih kiselina u gljivama

Nakon utvrđene korelacije između varijabli, sledeći korak u statističkoj obradi i prikazu rezultata jeste analiza glavnih komponenti. Klasifikacija i prepoznavanje gljiva prema hemijskoj sličnosti prisutnih fenolnih kiselina urađena je primenom PCA analize. Vrednosti kolone polazne matrice podataka predstavljaju koncentracije fenolnih kiselina, a vrednosti reda odgovaraju vrsti gljiva. Analiza glavnih komponenti se svodi na pronalaženje svojstvene vrednosti, matrice kovarijansi uzorka (Apostolov, 2014). PCA pruža mogućnost da se podaci originalne matrice razlože na tzv. *loading* i *score* vektore (Csomós i sar., 2002), pri čemu se dobijaju nove promenljive tzv. glavne komponente, PC.

U tabeli 4.12 je data promena svojstvene vrednosti i njenog broja. Na osnovu datih vrednosti može se uočiti da prve tri glavne komponente imaju značajan udeo pri modelovanju varijabli i doprinose 90,63% ukupne varijanse originalnih podataka (40,15%, 28,97% i 21,52%). Preostale glavne komponente, sa svojstvenim vrednostima manjim od jedinice imaju mali doprinos ukupnoj varijansi originalnih podataka i smatra se da te vrednosti objašnjavaju greške pri analizi.

Table 4.12 Promena svojstvene vrednosti u funkciji njenog broja

Glavna komponenta	Svojstvena vrednost	Ukupna varijansa (%)	Kumulativna varijansa (%)
PC1	<u>2,810</u>	<u>40,148</u>	<u>40,148</u>
PC2	<u>2,028</u>	<u>28,967</u>	<u>69,115</u>
PC3	<u>1,506</u>	<u>21,515</u>	<u>90,630</u>
PC4	0,401	5,725	96,355
PC5	0,181	2,588	98,943
PC6	0,061	0,865	99,808
PC7	0,013	0,192	100,000

Podvučene vrednosti pokazuju najveći doprinos ukupnoj varijansi

Procentni udeo svake glavne komponente pokazuje koliki doprinos, duž date ose, data varijabla ima na varijabilnost uzorka.

Na osnovu PCA dijagrama (slika 4.7) i tabele 4.13 može se zaključiti da najveći doprinos prvoj glavnoj komponenti daju *p*-hidroksibenzoeva (34,7%), ferulna (34,3%) i hlorogena kiselina (20,3%), drugoj glavnoj komponenti kafena (39,8%) i vanilinska kiselina (32,7%) a trećoj *p*-kumarna (55,9%) i siringinska kiselina (34,5%).

Kosinus na kvadrat za prve tri komponente veći od 0,5 daje uvid u doprinos variable

i pokazuje kvalitet prezentovanja promenljive na PCA osama. Sabiranjem vrednosti za kosinus na kvadrat za odabranu varijablu, po glavnim komponentama, dobija se vrednost 1. Dakle, posmatrana varijabla je dobro objašnjena glavnim komponentama u zavisnosti od toga koliki je njen doprinos glavnoj komponenti.

Tabela 4.13 Doprinos svake varijable ukupnoj varijabilnosti

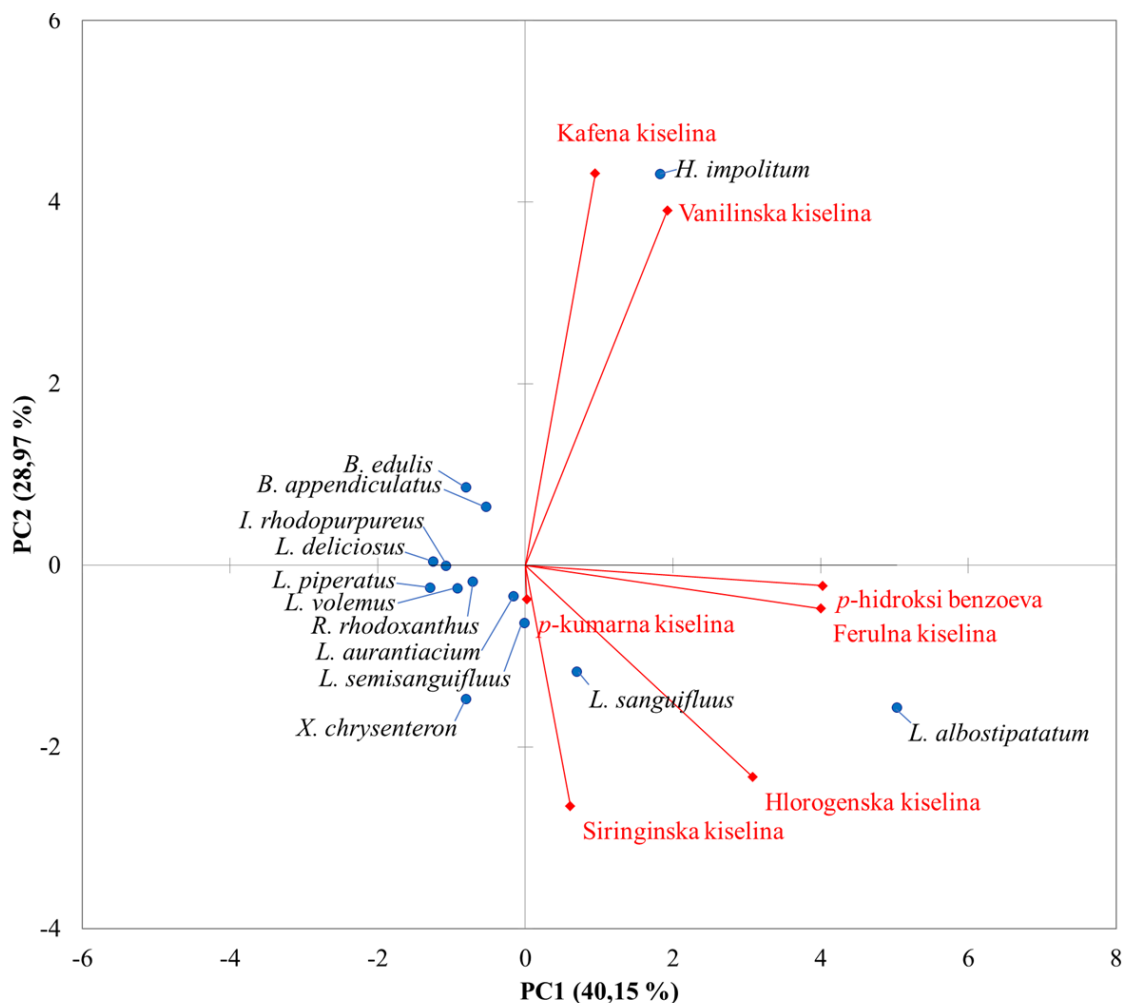
Varijable	Doprinos svake varijable (%)			cos ² za varijable		
	PC1	PC2	PC3	PC1	PC2	PC3
<i>p</i> -hidroksibenzoeva kiselina	<u>34,7</u>	0,1	0,1	<u>0,976</u>	0,002	0,002
Vanilinska kiselina	7,9	<u>32,7</u>	2,9	0,222	<u>0,662</u>	0,044
Siringinska kiselina	0,8	15,0	<u>34,5</u>	0,022	0,304	<u>0,520</u>
<i>p</i> -kumarna kiselina	0,00	0,3	<u>55,9</u>	0,000	0,006	<u>0,841</u>
Ferulna kiselina	<u>34,3</u>	0,5	0,0	<u>0,964</u>	0,010	0,001
Kafena kiselina	1,9	<u>39,8</u>	2,4	0,054	<u>0,808</u>	0,037
Hlorogena kiselina	<u>20,3</u>	11,6	4,1	<u>0,572</u>	0,236	0,062

Podvučene vrednosti pokazuju najveći doprinos ukupnoj varijansi

Ako se fiksiraju komponente i porede vrednosti kosinusa na kvadrat po varijablama, primećuje se da veće vrednosti odgovaraju varijablama koje se pružaju približno u pravcu tih komponenti, a manje vrednosti odgovaraju varijablama koje nisu sličnog pravca (<http://www.matf.bg.ac.rs/p/files/69-pca.html>).

Sa slike 4.7 se uočava da su vektori varijable *p*-hidroksibenzoeve i ferulne kiseline međusobno paralelni sa malim uglom između njih što ukazuje na jaku međusobnu korelaciju. To znači da nose iste informacije te je za karakterizaciju uzorka dovoljno koristiti bilo koju od njih (Krimmer-Malešević, 2016). Ove dve kiseline određuju prvu glavnu komponentu. Vrsta *L. albobostipatum* se odlikuje najvećim sadržajem *p*-hidroksibenzoeve i ferulne kiseline, tako da ona sa 69,4% ima najveći doprinos od svih vrsta. Ova vrsta gljive se odlikuje i najvećom koncentracijom hlorogene kiseline, što se i očekivalo, s obzirom na to da je hlorogena sa ferulnom kiselinom u dobroj korelaciji ($r = 0,75$).

Vrsta *H. impositum* se izdvojila u prvom kvadrantu zbog visokog sadržaja kafene i vanilinske kiseline, koje svojim učešćem daju najveći doprinos drugoj glavnoj komponenti (39,8% i 32,7%).



Slika 4.7 PCA dijagram zavisnosti PC1 i PC2 za analizirane vrsta gljiva od sastava fenolnih kiselina

Slika 4.8 predstavlja PCA dijagram zavisnosti prve i treće glavne komponente. Svojstvena vrednosti za PC3 je manja u odnosu na vrednosti za PC1 i PC2, ali se ipak ne sme zanemariti jer pruža informacije o malim razlikama. Na osnovu slike 4.8 i tabele 4.14 može se uočiti da najveći doprinos trećoj glavnoj komponenti imaju *p*-kumarna (55,9%) i siringinska kiselina (34,5%), sa visokim vrednostima kosinusa na kvadrat ($> 0,5$), kao i jasno odvajanje vrste *X. chrysenteron* koja je okarakterisana velikim doprinosom za PC3 (74%) i $\cos^2=0,821$.

Podvučene vrednosti u tabeli 4.14 pokazuju koje varijable su dobro prezentovane.

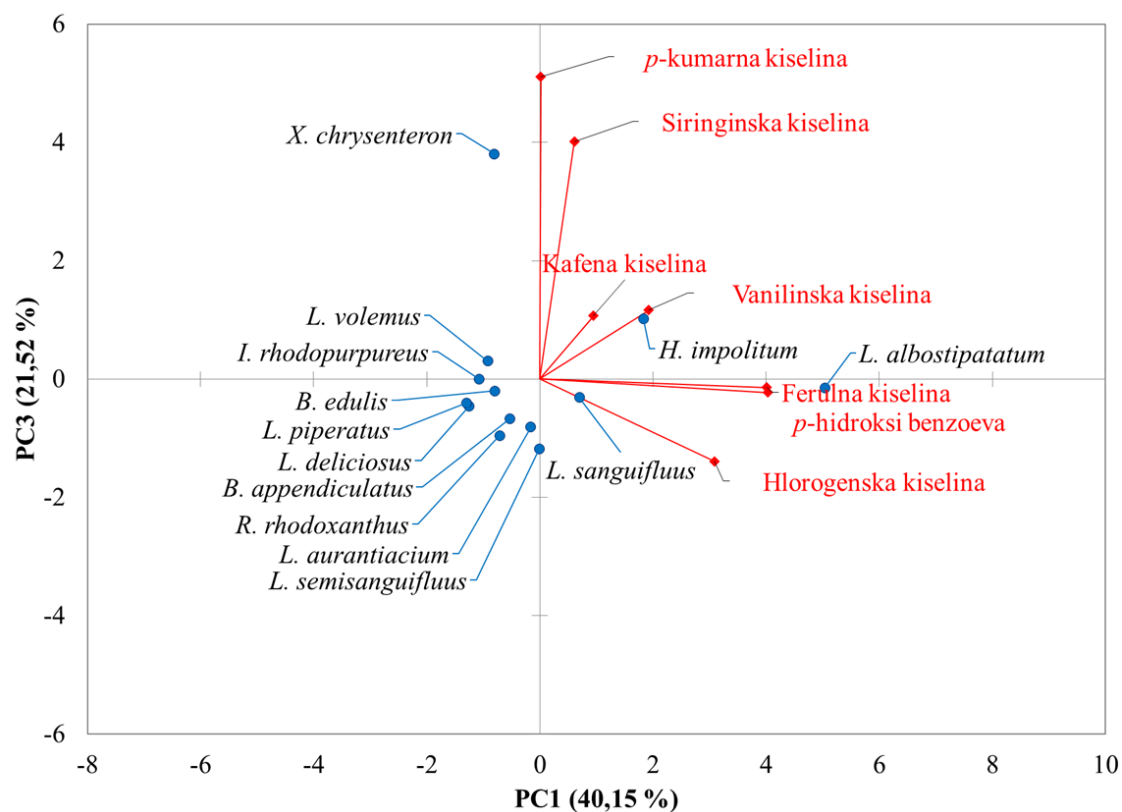
Tabela 4.14 Doprinos svake vrste gljiva ukupnoj varijabilnosti

Vrste	Doprinos svake vrste (%)			cos ² za vrste		
	PC1	PC2	PC3	PC1	PC2	PC3
<i>B. edulis</i>	1,8	2,8	0,2	0,203	0,235	0,013
<i>X. chrysenteron</i>	1,8	8,2	<u>74,0</u>	0,037	0,122	<u>0,821</u>
<i>I. rhodopurpureus</i>	3,2	0,0	0,0	<u>0,739</u>	0,000	0,000
<i>R. rhodoxanthus</i>	1,4	0,1	4,7	0,277	0,017	0,498
<i>B. appendiculatus</i>	0,8	1,6	2,3	0,163	0,241	0,259
<i>L. aurantiacium</i>	0,1	0,4	3,4	0,017	0,075	0,433
<i>L. albstipitatum</i>	<u>69,4</u>	9,3	0,1	<u>0,910</u>	0,088	0,001
<i>H. impolitum</i>	9,1	<u>70,4</u>	5,4	0,145	<u>0,807</u>	0,046
<i>L. semisanguifluus</i>	0,0	1,5	7,1	0,000	0,183	<u>0,640</u>
<i>L. sanguifluus</i>	1,3	5,2	0,5	0,192	<u>0,537</u>	0,039
<i>L. deliciosus</i>	4,3	0,0	1,1	<u>0,654</u>	0,001	0,087
<i>L. volemus</i>	2,3	0,2	0,5	0,281	0,021	0,031
<i>L. piperatus</i>	4,6	0,2	0,8	<u>0,656</u>	0,023	0,064

Podvučene vrednosti pokazuju najveći doprinos ukupnoj varijansi

Vrsta *L. sanguifluus* za drugu glavnu komponentu ima vrednost $\cos^2=0,537$ i smatra se da je dobro predstavljena na PCA dijagramu.

Primenom PCA analize, uočava se jasno odvajanje i grupisanje vrsta gljiva na osnovu sadržaja fenolnih kiselina. Vrste gljiva sa visokim sadržajem fenolnih kiselina (*L. albstipitatum*, *H. impolitum*, *X. chrysenteron* i *L. sanguifluus*) dobro su predstavljene na prve tri glavne komponente (\cos^2 je kod svih $> 0,5$) i grupisane su u blizini analiziranih fenolnih kiselina. Sve ostale vrste gljiva koje nisu pokazale visok sadržaj fenolnih kiselina grupisane su dijametralno od vektora fenolnih kiselina što pokazuje da između njih ne postoji značajna korelacija.



Slika 4.8 PCA dijagram zavisnosti PC1 i PC3 za analizirane vrsta gljiva od sastava fenolnih kiselina

4.2. BIOLOŠKA AKTIVNOST GLJIVA

4.2.1. Prinos ekstrakcije

Efikasnost ekstrakcije biološki važnih jedinjenja kao što su antioksidansi zavisi od vrste rastvarača koji se koristi za ekstrakciju. S obzirom da su fenoli i flavonoidi nosioci antioksidativne aktivnosti neophodno je izabrati pogodan rastvarač za njihovu ekstrakciju. Pošto su ovo polarna jedinjenja mogu se koristiti polarni rastvarači kao što su voda, metanol, etanol, aceton i slično dok je za ekstrakciju lipofilnih jedinjenja neophodno izabrati heksan, cikloheksan, dihlormetan i sl. Iz prethodnih istraživanja zaključeno je da gljive sadrže male količine lipofilnih jedinjenja (Smolskaitė i sar., 2015) pa su u ovom istraživanju korišćeni samo polarni rastvarači: metanol, etanol i voda.

Na osnovu dobijenih vrednosti koje su prikazane u tabeli 4.15 može se uočiti da je prinos vodenih i metanolnih ekstrakata znatno veći od etanolnih ekstrakata, što potvrđuje tvrdnju da prinos ekstrakcije zavisi od rastvarača (Goli i sar., 2005).

Tabela 4.15 Prinos metanolnih, etanolnih i vodenih ekstrakata gljiva (%)

Vrste	Metanolni ekstrakt (%)	Etanolni ekstrakt (%)	Vodeni ekstrakt (%)
<i>B. edulis</i>	11,9	6,9	38,0
<i>X. chrysenteron</i>	29,1	5,4	37,7
<i>I. rhodopurpureus</i>	41,1	14,7	36,2
<i>R. rhodoxanthus</i>	22	9,2	19,2
<i>B. appendiculatus</i>	16,2	2,8	37,6
<i>L. aurantiacum</i>	20,2	2,9	38,9
<i>L. albostipitatum</i>	18,4	4,3	34,7
<i>H. impolitum</i>	19,1	8	33,1
<i>L. semisanguifluus</i>	15,2	6,6	17,6
<i>L. sanguifluus</i>	12,6	4,1	16,5
<i>L. deliciosus</i>	8,8	3,4	22,0
<i>L. volemus</i>	9,1	3,6	21,1
<i>L. piperatus</i>	21,5	6,2	23,2

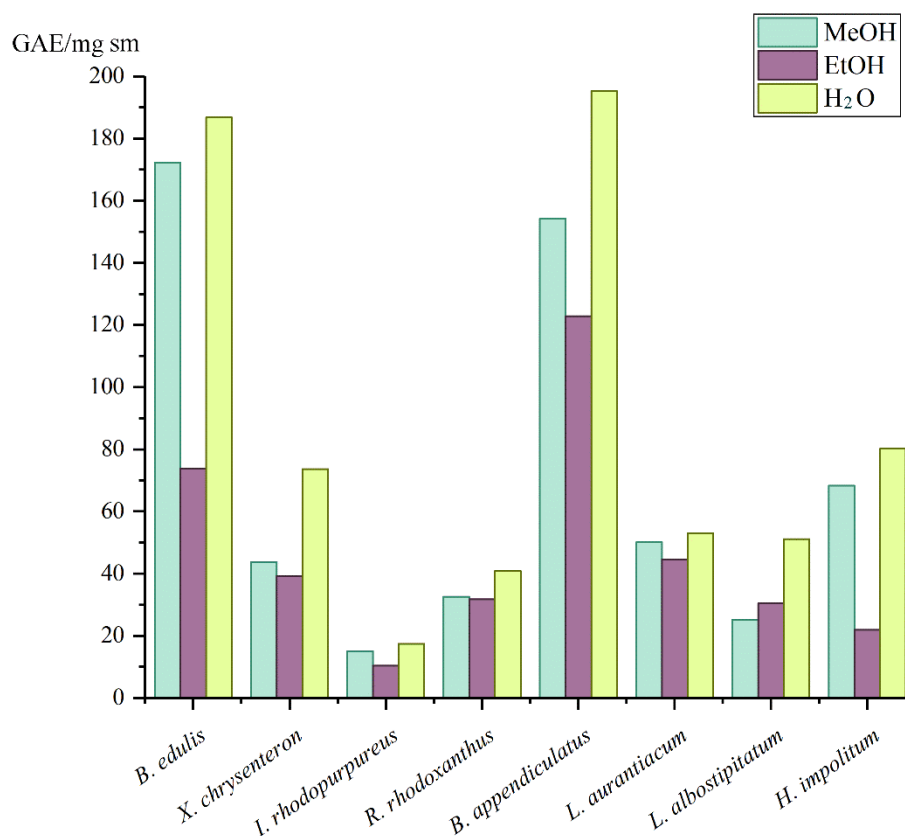
Ukoliko se uporede metanolni i vodeni ekstrakti može se zaključiti da je prinos vodenih ekstrakata veći kod svih ispitivanih vrsta, osim za *I. rhodopurpureus* i *R. rhodoxanthus* kod kojih je prinos veći za metanolne ekstrakte (41,1% i 22%). Takođe se uočava da ekstrakti svih

gljiva porodice Russulaceae u odnosu na gljive porodice Boletaceae imaju znatno niži prinos ekstrakcije korišćenjem sva tri rastvarača, ali je redosled prinosa isti: vodeni > metanolni > etanolni.

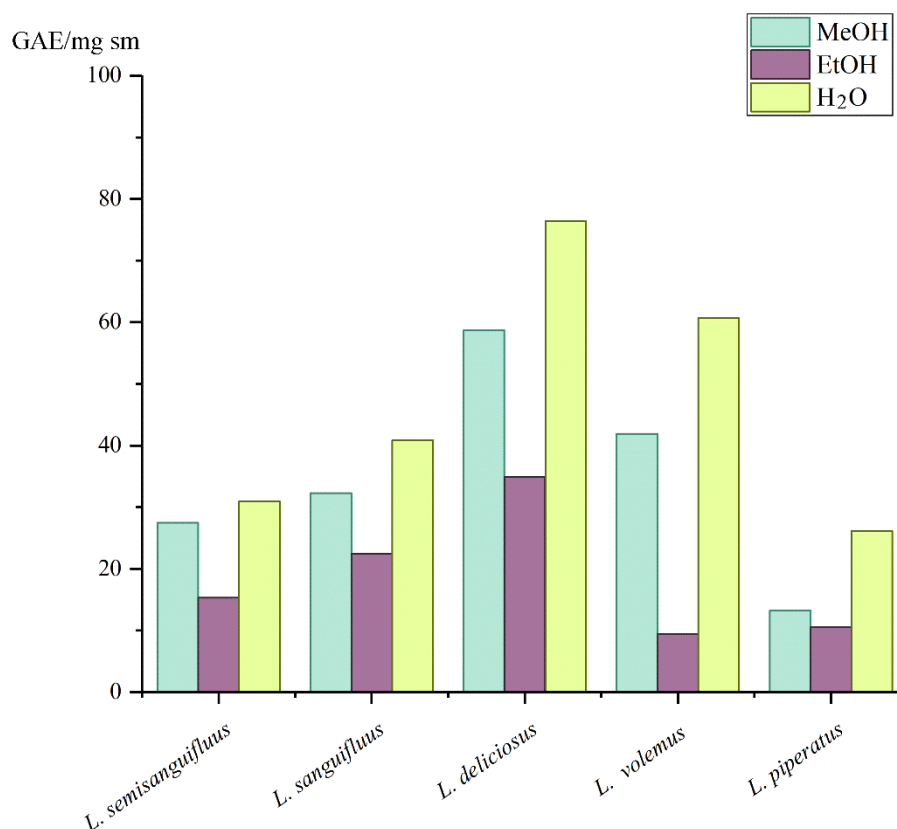
4.2.2. Određivanje sardžaja ukupnih fenola i flavonoida

Fenolna jedinjenja se smatraju dominantnim neesencijalnim jedinjenjima od značaja za ljudsko zdravlje, zahvaljujući sposobnosti da vrše heliranje metala, inhibiciju lipooksigenaze i „hvatanje” slobodnoradikalnih vrsta (Decker, 1997).

Kako je utvrđeno da antioksidativna aktivnost ekstrakata gljiva zavisi od fenolnih jedinjenja određen je njihov ukupan sadržaj i rezultati izraženi kao ekvivalenti galne kiseline po mg suvog ekstrakta (GAE/mg se) su prikazani na slikama 4.9 i 4.10.



Slika 4.9 Sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja u metanolnim, etanolnim i vodenim ekstraktima gljiva porodice Boletaceae



Slika 4.10 Sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja u metanolnim, etanolnim i vodenim ekstraktima gljiva porodice Russulaceae

Sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja u ispitivanim ekstraktima gljiva nalazi se u opsegu od 9,4 do 195 μg GAE/mg se. Dobijeni rezultati o sadržaju ukupnih fenolnih jedinjenja u ekstraktima gljiva ukazuju na najveći sadržaj ovih jedinjenja u vodenim ekstraktima. I prema literaturnim podacima voda se pokazala kao najbolji rastvarač za ekstrakciju fenolnih kiselina i flavonoida (Reisa i sar., 2012). Najveći sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja u vodenim ekstraktima zabeležen je kod vrste *B. appendiculatus* (195 μg GAE/mg se) kao i kod vrste *B. edulis* (187 μg GAE/mg se). Do istih rezultata došli su i Kosjanić i sar. (2012). Među metanolnim ekstraktima izdvojio se ekstrakt vrste *B. edulis* (172 μg GAE/mg se), dok je među analiziranim etanolnim ekstraktima najveći sadržaj fenolnih jedinjenja zabeležen kod vrste *B. appendiculatus* (122 μg GAE/mg se).

Gljive iz porodice Russulaceae pokazuju značajno manji sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja u odnosu na gljive iz porodice Boletaceae. Međutim i ovde postoji pravilnost u raspodeli sadržaja fenolnih jedinjenja, najveći je kod vodenih, pa metanolnih i na kraju kod etanolnih ekstrakata. Do istih zapažanja su došli Gan i sar. (2013) koji su utvrdili da vodeni ekstrakti gljiva imaju najveći sadržaj fenola u odnosu na metanolne i etanolne ekstrakte pod

istim uslovi ekstrakcije. Od pet vrsta mlečnica, *L. deliciosus* je pokazala najveći sadržaj fenolnih jedinjenja u sve tri vrste ekstrakata (59 µg GAE/mg se; 35 µg GAE/mg se; 76 µg GAE/mg se).

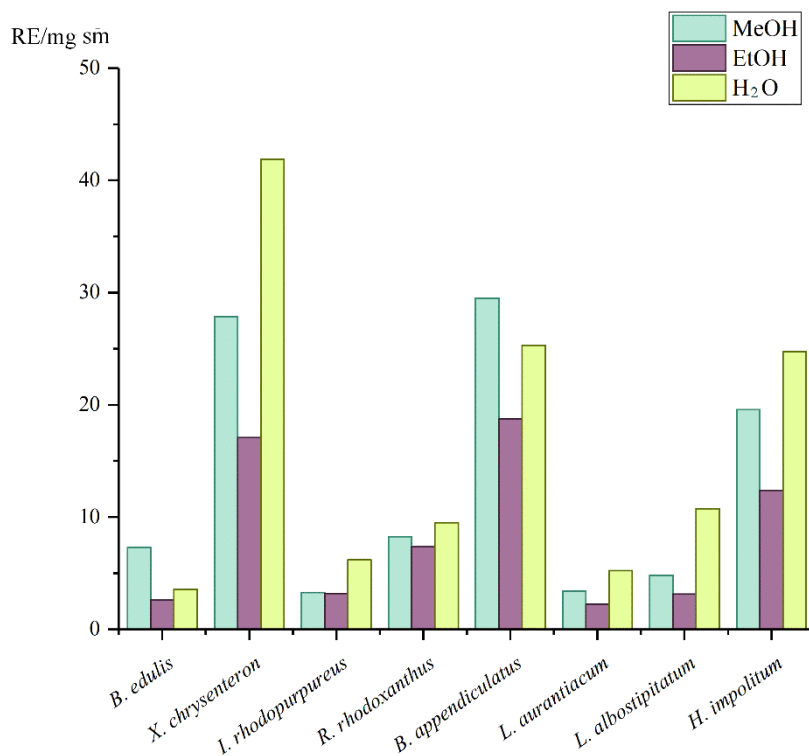
Vrednosti dobijene u reakciji ekstrakata sa Folin-Ciocalteu reagensom, izražene kao ekvivalenti galne kiseline, su opšte prihvaćene kao ukupan sadržaj fenolnih jedinjenja u uzorku. Međutim, Folin i Ciocalteu metoda je alternativni test za kvantitativno određivanje ukupnih količina redukujućih jedinjenja (Wangensteen i sar., 2004). Reagens ne reaguje samo sa fenolnim jedinjenjima već i sa drugim komponentama sistema koji imaju redukcionu sposobnost. Tako, da bi se dobila realna slika o sadržaju fenolnih jedinjenja urađena je kvalitativna i kvantitativna analiza fenolnih jedinjenja HPLC tehnikom.

Istraživanja koja su se do sada bavila sadržajem ukupnih flavonoida u ekstraktima gljiva nisu brojna. Flavonoidi, pripadaju grupi fenolnih jedinjenja sa najizraženijim antioksidativnim delovanjem (Vidović, 2011). Rezultati određivanja sadržaja ukupnih flavonoidnih jedinjenja su prikazani na slikama 4.11 i 4.12 i izraženi su kao ekvivalenti rutina po mg suvog ekstrakta (RE/mg se)

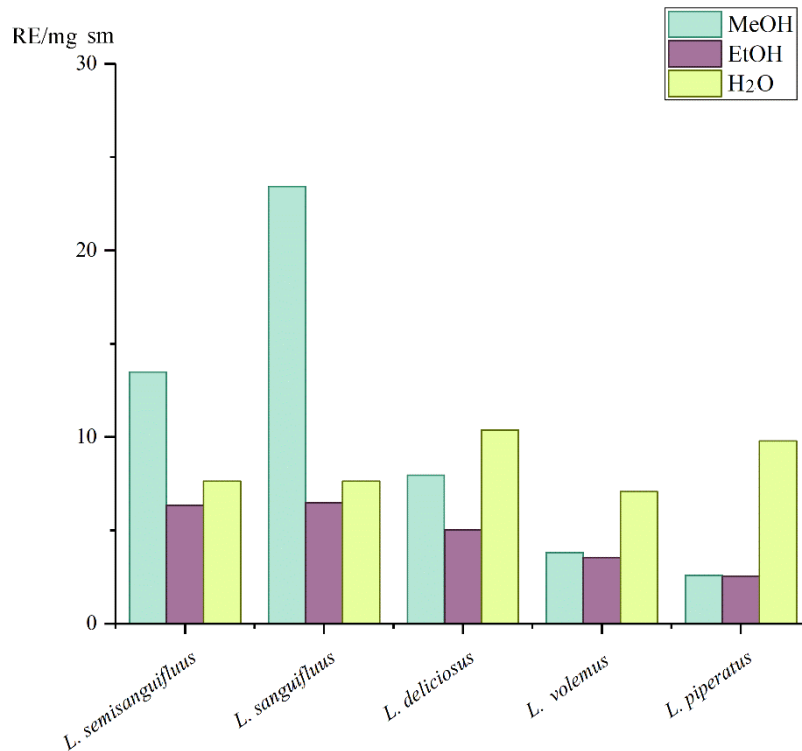
Sadržaj flavonoida u ekstraktima gljiva je od 2,24 RE/mg se (*L. aurantiacum*) do 42 RE/mg se (*X. chrysenteron*). Ukupan sadržaj flavonoidnih jedinjenja je najveći u vodenim, zatim u metanolnim i na kraju etanolnim ekstraktima.

Najveći udeo flavonoida u odnosu na ukupna fenolna jedinjenja ima metanolni ekstrakt vrste *L. sanguifluus* (72,5%). Ovaj ekstrakt pokazuje i najveći sadržaj ukupnih flavonoida među vrstama porodice Russulaceae (23,43 RE/mg se). Metanolni i etanolni ekstrakt vrste *L. semisanguifluus*, takođe pokazuju visok udeo flavonoida u odnosu na sadržaj ukupnih fenola (49% i 41%).

Gljive iz porodice Boletaceae pokazuju nešto veći sadržaj flavonoida u odnosu na ispitivanje gljive iz porodice Russulaceae i tu treba izdvojiti vrstu *X. chrysenteron* čija sva tri ekstrakta (metanolni, etanolni i vodeni) pokazuju veći sadržaj flavonoida: 27,9; 17,1 i 42 RE/mg se. Udeo flavonoida u ukupnom sadržaju fenolnih jedinjenja za pomenute ekstrakte takođe je visok i iznosi: 63,7; 43,5 i 56,9%. Sa najmanjim sadržajem flavonoida izdvojio se etanolni ekstrakt gljive *L. aurantiacum* (2,24 RE/mg se) koji sadrži svega 5% flavonoida od ukupnog sadržaja fenolnih jedinjenja.



Slika 4.11 Sadržaj ukupnih flavonoida u metanolnim, etanolnim i vodenim ekstraktima gljivama porodice Boletaceae



Slika 4.12 Sadržaj ukupnih flavonoida u metanolnim, etanolnim i vodenim ekstraktima gljiva porodice Russulaceae

4.2.3. Antioksidativna aktivnost gljiva

Za procenu antioksidativne aktivnosti koristi se veliki broj testova koji se zasnivaju na različitim mehanizmima, jer je utvrđeno da oksidacija fenolnih komponenata ide do različitih vrsta jedinjenja. Postoje testovi kod kojih se prati redukciona sposobnosti fenolnih jedinjenja, dok druge vrste testova utvrđuju sposobnost „hvatanja” slobodnih radikala.

U tabeli 4.16 je prikazana antioksidativna aktivnost ispitivanih uzoraka gljiva primenom DPPH, ABTS, CUPRAC, TRP i FRAP metode. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost tri merenja \pm SD.

Tabela 4.16 Antioksidativna aktivnost metanolnih, etanolnih i vodenih ekstrakata analiziranih uzoraka gljiva primenom spektrofotometrijskih metoda preračunato na suvi ekstrakt (srednja vrednost tri merenja \pm SD)

Vrsta	Rastvarač	DPPH $\mu\text{g TE/mg se}$	ABTS $\mu\text{g TE/mg se}$	CUPRAC $\mu\text{g TE/mg se}$	FRAP $\mu\text{g FeSO}_4/\text{mg se}$	TRP $\mu\text{g AA/mg se}$
Boletaceae						
<i>B. edulis</i>	MeOH	22,3 \pm 0,2	3,1 \pm 0,1	33 \pm 2	8,2 \pm 0,7	0,93 \pm 0,07
	EtOH	7,4 \pm 0,1	2,7 \pm 0,1	7,8 \pm 0,5	8 \pm 1	0,29 \pm 0,01
	H ₂ O	11,7 \pm 0,2	8,3 \pm 0,1	44 \pm 1	34 \pm 1	0,96 \pm 0,08
<i>X. chrysenteron</i>	MeOH	13,9 \pm 0,2	8,68 \pm 0,09	133 \pm 3	42 \pm 1	0,61 \pm 0,05
	EtOH	11,3 \pm 0,2	8,6 \pm 0,1	126 \pm 2	39 \pm 1	0,46 \pm 0,03
	H ₂ O	18,7 \pm 0,1	9,01 \pm 0,08	150 \pm 2	47 \pm 1	0,75 \pm 0,06
<i>I. rhodopurpureus</i>	MeOH	6,26 \pm 0,09	8,5 \pm 0,1	13,2 \pm 0,5	16,3 \pm 0,9	0,13 \pm 0,01
	EtOH	3,4 \pm 0,1	5,21 \pm 0,07	9,2 \pm 0,5	11 \pm 1	0,10 \pm 0,01
	H ₂ O	11,3 \pm 0,2	8,54 \pm 0,08	36 \pm 1	25 \pm 1	0,26 \pm 0,01
<i>R. rhodoxanthus</i>	MeOH	11,3 \pm 0,2	8,49 \pm 0,09	52 \pm 1	27 \pm 1	0,49 \pm 0,03
	EtOH	4,1 \pm 0,1	7,8 \pm 0,1	20 \pm 1	10,1 \pm 0,7	0,33 \pm 0,01
	H ₂ O	14,99 \pm 0,09	9,15 \pm 0,08	84 \pm 2	34 \pm 1	0,66 \pm 0,04
<i>B. appendiculatus</i>	MeOH	13,4 \pm 0,3	8,40 \pm 0,08	84 \pm 2	32 \pm 2	0,82 \pm 0,07
	EtOH	6,6 \pm 0,1	8,4 \pm 0,1	15,6 \pm 0,7	17,4 \pm 0,9	0,63 \pm 0,05
	H ₂ O	14,4 \pm 0,09	8,62 \pm 0,09	86 \pm 2	46,5 \pm 0,3	0,72 \pm 0,06
<i>L. aurantiacum</i>	MeOH	8,81 \pm 0,08	8,5 \pm 0,1	38 \pm 1	13,2 \pm 0,9	0,31 \pm 0,01
	EtOH	5,62 \pm 0,08	8,6 \pm 0,1	27 \pm 1	10 \pm 1	0,25 \pm 0,01
	H ₂ O	11,5 \pm 0,1	8,35 \pm 0,07	71 \pm 2	40 \pm 1	0,46 \pm 0,02

<i>L. allostipitatum</i>	MeOH	10,68±0,09	8,5±0,1	43±1	19±1	0,37±0,02
	EtOH	6,7±0,1	8,7±0,1	31±1	15,9±0,6	0,31±0,01
	H ₂ O	12,16±0,09	8,24±0,09	97±2	37±1	0,61±0,05
<i>H. impositum</i>	MeOH	11,9±0,1	1,41±0,06	12,9±0,7	7,8±0,5	0,38±0,01
	EtOH	4,64±0,08	0,32±0,06	10,2±0,7	5,6±0,9	0,18±0,01
	H ₂ O	12,75±0,01	8,4±0,1	66±2	44±1	0,48±0,03
Russulaceae						
<i>L. semisanguifluus</i>	MeOH	6,1±0,1	8,45±0,07	52±2	10,5±0,6	0,43±0,03
	EtOH	5,39±0,07	8,35±0,07	49±2	9±1	0,39±0,03
	H ₂ O	6,85±0,08	8,6±0,1	70±2	12,1±0,6	0,60±0,05
<i>L. sanguifluus</i>	MeOH	3,94±0,05	8,4±0,1	41±1	18±1	0,46±0,04
	EtOH	3,43±0,05	8,24±0,06	36±2	13,5±0,4	0,34±0,03
	H ₂ O	6,48±0,08	8,54±0,07	72±1	30±1	0,65±0,05
<i>L. deliciosus</i>	MeOH	2,6±0,1	8,21±0,07	13,4±0,6	15,1±0,8	0,39±0,02
	EtOH	2,1±0,1	7,57±0,07	5,6±0,2	11,5±0	0,20±0,01
	H ₂ O	8,81±0,09	8,4±0,1	21±1	18,5±0,7	0,45±0,03
<i>L. volemus</i>	MeOH	1,84±0,06	6,33±0,09	4,5±0,2	8,8±0,3	0,18±0,01
	EtOH	1,76±0,06	5,5±0,1	4,2±0,2	4,2±0,2	0,17±0,01
	H ₂ O	4,39±0,07	8,6±0,1	21±1	16,3±0,6	0,33±0,01
<i>L. piperatus</i>	MeOH	3,35±0,07	7,74±0,07	23±1	13,7±0,5	0,30±0,01
	EtOH	2,23±0,05	5,13±0,08	15±1	5,41±0,09	0,25±0,01
	H ₂ O	3,9±0,1	8,55±0,07	35±2	19,9±0,9	0,37±0,01

4.2.3.1. Određivanje antioksidativne aktivnosti „hvatanja” DPPH radikala

Sposobnost „hvatanja” slobodnih radikala merilo je antioksidativne aktivnosti nekog uzorka. DPPH radikal (DPPH[•]) se veoma često koristi za brza određivanja jer je stabilan i komercijalno dostupan. Njegova intenzivno ljubičasta boja prelazi u žutu prilikom interakcije sa fenolnim jedinjenjima koja mu doniraju vodonik i na taj način „neutrališu”.

Svi ekstrakti gljiva su pokazali aktivnost prema DPPH radikalu. Na osnovu dobijenih rezultata može se uočiti da sposobnost „hvatanja” DPPH radikala zavisi od rastvarača koji se koristi za ekstrakciju, kao i od vrste gljive.

Među dobijenim ekstraktima gljiva, vodeni je pokazao najveću aktivnost uklanjanja DPPH radikala, zatim metanolni, a najslabije etanolni ekstrakt (tabela 4.16). Ovi rezultati su u skladu sa literaturnim vrednostima (Santos i Gonçalves, 2016).

Različiti rastvarači korišćeni za ekstrakciju su birani zbog širokog spektra fenolnih jedinjenja koja se mogu njima ekstrahovati. Prema Pérez-Jiménez-u i Saura-Calixto-u (2006), vrsta rastvarača i polarnost utiču na pojedinačni transfer elektrona i atoma vodonika, koji su ključni aspekti u merenju antioksidativne aktivnosti (Pérez-Jiménez i Saura-Calixto, 2006). Korišćeni su čisti rastvarači, a ne vodene smeše jer vodeno-organski ekstrakti pored antioksidanasa mogu da sadrže i druga jedinjenja koja ne pokazuju aktivnost, ali mogu da ometaju analizu (Santos i Gonçalves, 2016).

Vodeni ekstrakti gljiva koji pripadaju porodici Russulaceae i Boletaceae pokazuju najveću sposobnost hvatanja DPPH radikala, u odnosu na metanolni i etanolni. Ova pravilnost je narušena jedino kod vrste *B. edulis*, čiji metanolni ekstrakt pokazuje veću aktivnost od vodenog i ujedno najveću sposobnost hvatanja DPPH radikala (22,3 µg TE/mg se). Do istih zapažanja su došli i Sarikurkc u sar. (2008) određivanjem antioksidativne aktivnosti metanolnog ekstrakta vrste *B. edulis* koji je pokazao najveći efekat „hvatanja” DPPH radikala, praćen vrstom *X. chrysenteron*.

Gljive porodice Russulaceae pokazuju nešto manju aktivnost u poređenju sa gljivama porodice Boletaceae i vodeni ekstrakti pokazuju aktivnost u opsegu od 3,9 (*L. piperatus*) do 8,81 (*L. deliciosus*) µg TE/mg se.

Metanolni ekstrakti pokazuju slabiju aktivnost u odnosu na vodene. Pored *B. edulis* sa većom antioksidansnom aktivnošću (22,3 µg TE/mg se) se i izdvajaju gljive *X. chrysenteron* i *B. appendiculatus*, (13,9 i 13,4 µg TE/mg se). Među gljivama porodice Russulaceae, vrsta *L. volemus* se izdvojila sa najmanjom aktivnošću (1,84 µg TE/mg se) dok je metanolni ekstrakt gljive *L. semisanguifluus* pokazao najveću aktivnost (6,1 µg TE/mg se).

Ovakva raspodela aktivnosti je očekivana jer je primećeno da vodeni ekstrakti pokazuju uglavnom veću aktivnost hvatanja DPPH radikala u odnosu na metanolne ekstrakte (González-Palma i sar., 2016).

Etanol kao rastvarač se pokazao najmanje efikasnim, jer su vrednosti dobijene DPPH testom za ekstrakte dobijene primenom ovog rastvarača najmanje. Od svih analiziranih vrsta gljiva najveću aktivnost pokazuje vrsta *X. chrysenteron* (11,3 µg TE/mg se) a najmanju *L. volemus* (1,76 µg TE/mg se).

Dobijeni rezultati su u skadu sa rezultatima sadržaja ukupnih fenolna jedinjenja. Prema DPPH metodi izdvojile su se vrste *B. edulis*, *X. chrysenteron*, *B. appendiculatus* i *L. deliciosus* koje imaju i najveći sadržaj fenolnih jedinjenja.

4.2.3.2. Određivanje antioksidativne aktivnosti „hvatanja” ABTS radikala

Antioksidanasi prisutni u ekstraktima inhibiraju ABTS katjon radikal (ABTS^{•+}) koji iz plavo-zelene boje prelazi u bezbojnu ili svetliju nijansu plave u zavisnosti od koncentracije antioksidanasa koji „neutrališu” radikal. Princip delovanja je sličan kao kod DPPH testa: u ispitivani uzorak se unosi sintetski radikal kako bi se na taj način ispitala antioksidativna aktivnost ekstrakta. Rezultati dobijeni ovom metodom su niži u odnosu rezultate dobijene primenom DPPH testa, jer ABTS^{•+} redukuju polifenolna jedinjenja tj. kiseonična jedinjenja, dok DPPH radikal redukuju donori vodonika i slobodni radikali (Campos i Lissi, 1997).

Rezultati antioksidativne aktivnosti ekstrakata dobijeni primenom ABTS katjon radikala (tabela 4.16) pokazali su isti obrazac kao i za DPPH metodu. Sposobnost hvatanja radikala u zavisnosti od korišćenog rastvarača za ekstrakciju je sledeći: vodeni > metanolni > etanolni. Ovo je u skladu sa literaturnim podacima (Dimitrijević i sar., 2018). Vrste *L. aurantiacium* i *L. albobipitatum*, koje pripadaju porodici Boletaceae, su se izdvojile zbog činjenice da etanolni ekstrakti pokazuju veću sposobnost hvatanja ABTS^{•+} od metanolnih i vodenih (8,6 i 8,7 µg TE/mg se).

Primenom ovog testa nije se izdvojila ni jedna gljiva sa izuzetno visokom aktivnošću. Najveća aktivnost zabeležena je kod vodenog ekstrakta vrste *R. rhodoxanthus* (9,15 µg TE/mg se), a najmanju ispoljava etanolni ekstrakt vrste *H. impolitum* (0,32 µg TE/mg se).

Kod gljiva koje pripadaju porodici Russulaceae se može uočiti da rastvarač nema veliki uticaj na aktivnost jer sve tri vrste ekstrakata pokazuju sličnu aktivnost prema ABTS katjon radikal. Razlike između antioksidativne aktivnosti prema ABTS^{•+} vodenog, metanolnog i etanolnog ekstrakta su zanemarljive.

4.2.3.3. Određivanje redukcionog potencijala primenom CUPRAC-testa

Nedostaci metoda za određivanje antioksidativne aktivnosti kao što su: niska pH vrednost radnog rastvora, favorizacija samo hidrofilnih ili hidrofobnih komponenti ekstrakta i slično je smanjena razvojem CUPRAC metode. U CUPRAC metodi se kao reagens koristi bis neokuproin Cu(II) katjon koji može da oksiduje i hidro i lipo solubilne supstance, a reaktivan je u prisustvu svih tipova biološki važnih antioksidanasa (Özyürek i sar., 2011).

Primenom CUPRAC metode, ekstrakti svih gljiva su pokazali visoku aktivnost. Sve tri vrste ekstrakta gljive *X. chrysenteron* su pokazale visoke vrednosti antioksidativnog potencijala: vodeni, metanolni i etanolni (150, 133 i 126 µg TE/mg se) (tabela 4.16).

Vodeni ekstrakti svih gljiva pokazuju najveću aktivnost, tako da pored pomenute gljive *X. chrysenteron*, visoku aktivnost imaju i sledeće vrste: *L. albotipitatum* (97 µg TE/mg se), *B. appendiculatus* (86 µg TE/mg se) i *R. rhodoxanthus* (84 µg TE/mg se). Vrste gljiva iz porodice Russulaceae su pokazale manju aktivnost nego vrste porodice Boletaceae. Gljive *L. sanguifluus* i *L. semisanguifluus* su se izdvojile sa nešto većom antioksidativnom sposobnošću u odnosu na druge vrste iste porodice (72 i 70 µg TE/mg se). Od metanolnih ekstrakata gljiva *X. chrysenteron* pokazala je najveću aktivnost (133 µg TE/mg se) dok *L. volemus* pokazuje najmanju redukcionu sposobnost (4,5 µg TE/mg se).

Etanolni ekstrakti su i primenom ove metode dali najniže rezultate i dobijene vrednosti za vrste gljiva koje pripadaju porodici Boletaceae su se kretale u rasponu od 7,8 µg TE/mg se za *B. edulis* do 126 µg TE/mg se za *X. chrysenteron*. U slučaju mlečnica vrednosti antioksidativne aktivnosti dobijene primenom CUPRAC metode su manje i nalaze se u rasponu vrednosti od 4,2 µg TE/mg se za *L. volemus*, do 49 µg TE/mg se za *L. semisanguifluus*.

CUPRAC metoda je potvrdila rezultate dobijene prethodnim metodama i izdvojila vrste *B. edulis*, *X. chrysenteron* i *B. appendiculatus* sa većom antioksidativnom aktivnošću.

4.2.3.4. Određivanje redukcionog potencijala primenom FRAP-testa

FRAP metodom se može odrediti sposobnost komponenata nekog ekstrakta da učestvuje u jednelektronskim redoks-reakcijama, što znači da antioksidansi sa drugačijim načinom delovanja ne mogu biti registrovani (MacDonald-Wicks i sar., 2006).

Vodeni ekstrakti vrsta *X. chrysenteron* (47 µg FeSO₄/mg se) i *B. appendiculatus* (46,5 µg FeSO₄/mg se) ispoljili su najveću redukcionu aktivnost, dok je najmanji efekat primećen kod vrste *L. semisanguifluus* (12,1 µg FeSO₄/mg se).

Vrednosti redukcionne aktivnosti metanolnih ekstrakata su niže od aktivnosti vodenih ekstrakata (tabela 4.16). Metanolni ekstrakt sa najvećom redukcionom aktivnošću je *X. chrysenteron* (42 µg FeSO₄/mg se) iz porodice Boletaceae i *L. sanguifluus* (4,2 µg FeSO₄/mg se) iz porodice Russulaceae.

Etanolni ekstrakti svih gljiva su primenom i ovog testa pokazali najmanju vrednost. Etanolni ekstrakt vrste *X. chrysenteron* se izdvojio sa najvećom redukcionom aktivnošću od 39 µg FeSO₄/mg se kao i vrsta *L. volemus* sa najmanjom, 4,2 µg FeSO₄/mg se.

Sva tri ekstrakta vrste *X. chrysenteron* i *B. appendiculatus* (vodeni, metanolni i etanolni) pokazuju veću antioksidativnu aktivnost u odnosu na ostale gljive što je u skladu sa ukupnim sadržajem fenolnih jedinjenja u njima.

4.2.3.5. Određivanje ukupne redukcionne moći

Određivanjem ukupne redukcionne moći uzoraka dobijene su vrednosti koje su saglasne sa vrednostima koje su dobijene prethodnim testovima. Generalno, ekstrakti gljiva porodice Boletaceae pokazali su veću ukupnu redukcionnu moć od ekstrakata gljiva porodice Russulaceae. Primenom ovog testa izdvojila se gljiva *B. edulis* kod koje nema velike razlike u vrednostima za vodeni i metanolni ekstrakt (0,96 µg EAA/mg se i 0,93 µg EAA/mg se) (tabela 4.16). Takođe, može se izdvojiti i gljiva *B. appendiculatus* kod koje je vrednost za metanolni ekstrakt veća nego za vodeni, 0,82 µg EAA/mg se i 0,72 µg EAA/mg se. Metanolni ekstrakt gljive *L. volemus* se izdvojio zbog najniže vrednosti ukupne redukcionne moći (0,18 µg EAA/mg se) što je u skladu sa publikovanim istraživanjima Ozen i sar. (2011).

Najveću vrednost ukupne redukcionne moći pokazuju vodeni, zatim metanolni i na kraju etanolni ekstrakti. Za etanolne ekstrakte, najveće vrednosti su dobijene za vrste porodice Boletaceae – *B. appendiculatus* (0,63 µg EAA/mg se) i *X. chrysenteron* (0,46 µg EAA/mg se), a od vrsta porodice Russulaceae, najveću vrednost pokazuje *L. semisanguifluus* (0,39 µg EAA/mg se).

Na osnovu dobijenih rezultata može se uočiti određena pravilnost i veza između korišćenog rastvarača za ekstrakciju i antioksidativne aktivnosti. Voda se pokazala kao najefikasniji rastvarač za ekstrahovanje antioksidanata. Primenom svih metoda, najbolje rezultate pokazali su vodeni ekstrakti, što je u saglasnosti sa literaturom, koja potvrđuje da je voda dobar rastvarač za ekstrahovanje fenolnih jedinjenja i flavonoida (Reisa i sar., 2012), kao glavnih nosilaca antioksidativne aktivnosti. Pritom, voda je ekološki i ekonomski prihvatljiv rastvarač, što je dodatno čini idealnim rastvaračem za ekstrakciju antioksidanasa iz gljiva.

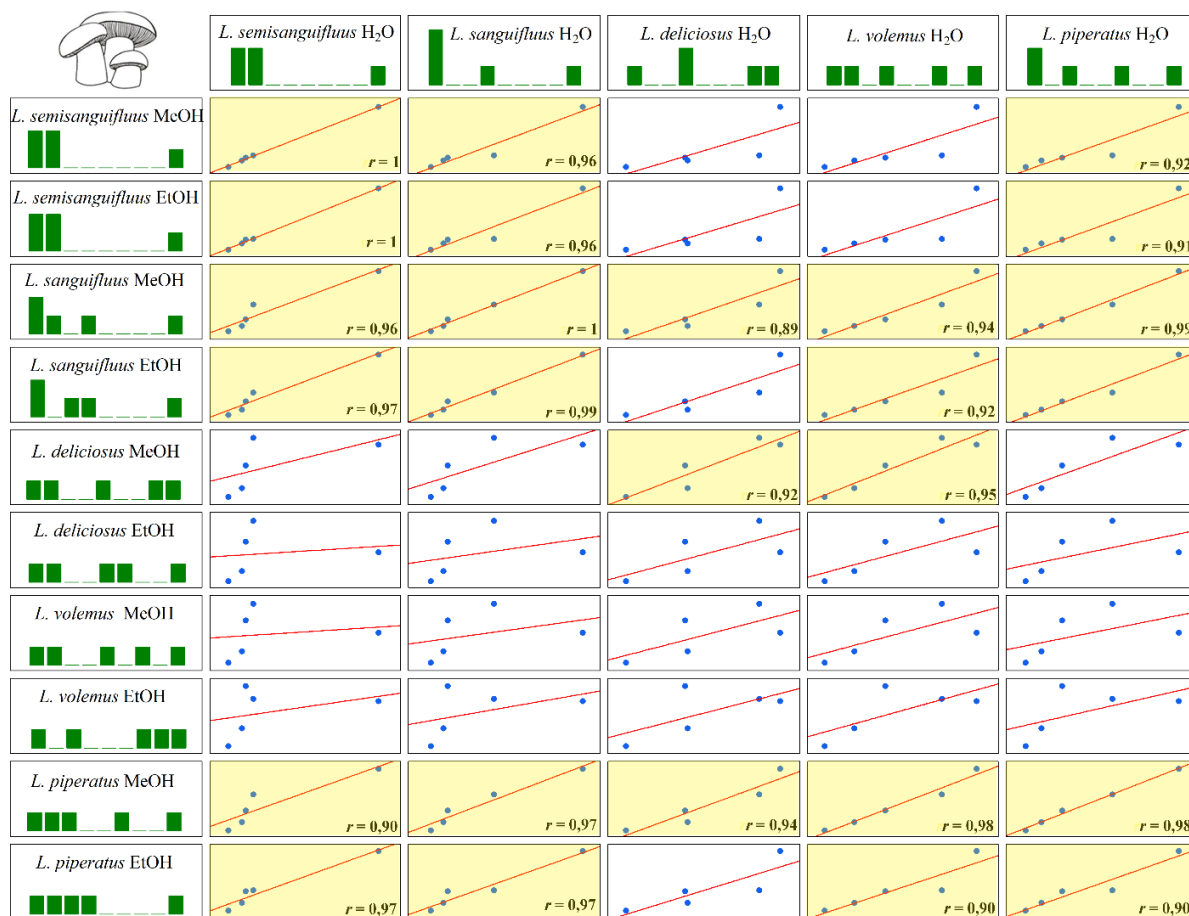
Takođe, uočeno je da se ista vrsta gljive ponaša različito primenom različitih metoda za procenu antioksidativne aktivnosti. To upućuje na mogućnost da različita jedinjenja prisutna u analiziranim ekstraktima ostvaruju antioksidativnu aktivnost različitim mehanizmima (Novaković, 2015).

4.2.4. Hemometrijska analiza rezultata antioksidativne aktivnosti

4.2.4.1. Korelaciona analiza

Pre primene PCA analize dobijenih rezultata, urađena je korelaciona analiza kako bi se utvrdilo da li postoji povezanost među analiziranim uzorcima gljiva. Kao rezultat su dobijeni

koeficijenti Pirsonove linearne korelacije (r) koji su prikazani na slikama 4.13 i 4.14.



Slika 4.13 Korelaciona analiza antioksidativne aktivnosti metanolnih, etanolnih i vodenih ekstrakata odabranih vrsta gljiva porodice Russulaceae, i Pirsonov koeficijent linearne korelacije (r) ($p < 0,05$)

Korelaciona analiza pokazala je da postoji više statistički značajnih korelacija ($p < 0,05$). Najveći stepen korelacije ($r = 1$) javlja se između vrsta: *X. chrysenteron* H₂O i *X. chrysenteron* MeOH; *X. chrysenteron* H₂O i *X. chrysenteron* EtOH; *X. chrysenteron* H₂O i *B. appendiculatus* MeOH; *R. rhodoxanthus* H₂O i *X. chrysenteron* MeOH; *R. rhodoxanthus* H₂O i *B. appendiculatus* EtOH; *R. rhodoxanthus* H₂O i *L. albostipitatum* MeOH; *B. appendiculatus* H₂O i *R. rhodoxanthus* MeOH; *L. aurantiacium* H₂O i *R. rhodoxanthus* MeOH; *L. albostipitatum* H₂O i *X. chrysenteron* MeOH; *L. albostipitatum* H₂O i *X. chrysenteron* EtOH; *L. albostipitatum* H₂O i *L. albostipitatum* H₂O; *L. semisanguifluus* H₂O i *L. semisanguifluus* MeOH; *L. semisanguifluus* H₂O i *L. semisanguifluus* EtOH; *L. sanguifluus* H₂O i *L. sanguifluus* MeOH.



Slika 4.14 Korelaciona analiza antioksidativne aktivnosti metanolnih, etanolnih i vodenih ekstrakata odabranih vrsta gljiva porodice Boletaceae, i Pirsonov koeficijent linearne korelacije (r) ($p < 0,05$)

4.2.4.2. Analiza glavnih komponenti (PCA)

Posle urađene korelacione analize pristupilo se analizi glavnih komponentata, sa ciljem utvrđivanja veze između korišćenog rastvarača i antioksidativne aktivnosti metanolnih, etanolnih i vodenih ekstrakata analiziranih vrsta gljiva. Vrednosti kolone polazne matrice podataka predstavljaju metode kojim je određena antioksidativna aktivnost, a vrednosti vrste odgovaraju ekstraktima gljiva dobijenih primenom odgovarajućih rastvarača. Najpre je određen broj svojstvenih vrednosti, što je prikazano u tabeli 4.17.

Tabela 4.17 Promena svojstvene vrednosti u funkciji njenog broja

Glavna komponenta	Svojstvena vrednost	Ukupna varijansa (%)	Kumulativna varijansa (%)
PC1	<u>3,221</u>	<u>64,4</u>	<u>64,4</u>
PC2	<u>1,038</u>	<u>20,8</u>	<u>85,2</u>
PC3	0,392	7,8	93,0
PC4	0,194	3,9	96,9
PC5	0,154	3,1	100,0

Podvučene vrednosti pokazuju najveći doprinos ukupnoj varijansi

Od dobijenih glavnih komponentata obično se zadržavaju samo one čiji zbir obuhvata veliki procenat ukupne promenljive (Otto, 1999). Na osnovu Kajzerovog kritrijuma (Kaiser, 1960) (uslov: svojstvena vrednost > 1) određeno je da prve dve komponente imaju najveći doprinos ukupnoj varijansi originalnih podataka. PC1 ima svojstvenu vrednost 3,221 i objašnjava 64,4% ukupne varijanse, dok druga ima 1,038 i objašnjava 20,8% ukupne varijanse

Na osnovu vrednosti u tabeli 4.18 može se primetiti da najveći doprinos prvoj glavnoj komponenti daju varijable FRAP, CUPRAC, TRP i DPPH (25,6%, 25,5%, 20,7% i 20,3%), dok je PC2 određena varijablom ABTS sa 63,8%. Kosinos na kvadrat vrednosti za CUPRAC i FRAP imaju iste vrednosti i njihovi vektori se pružaju u istom pravcu, dok su vektori varijabli TRP i DPPH orjentisani u drugom pravcu, sa sličnim vrednostima.

Tabela 4.18 Doprinos svake varijable ukupnoj varijabilnosti i vrednosti \cos^2 varijable

Varijable	Doprinos svake varijable (%)		\cos^2 varijable	
	PC1	PC2	PC1	PC2
DPPH	<u>20,3</u>	23,1	<u>0,65</u>	0,24
ABTS	7,9	<u>63,8</u>	0,26	<u>0,66</u>
CUPRAC	<u>25,5</u>	0,9	<u>0,82</u>	0,01
FRAP	<u>25,6</u>	2,8	<u>0,82</u>	0,03
TRP	<u>20,7</u>	9,4	<u>0,67</u>	0,01

podvučene vrednosti pokazuju najveći doprinos ukupnoj varijansi

Metanolni ili etanolni ekstrakti gljiva, ređe vodeni, pokazuju negativno opterećenje prve glavne komponente i to su sledeći uzorci: *B. edulis* EtOH, *I. rhodopurpureus* MeOH, *I. rhodopurpureus* EtOH, *R. rhodoxanthus* EtOH, *B. appendiculatus* EtOH, *L. aurantiacum* MeOH, *L. aurantiacum* EtOH, *L. albostipitatum* EtOH, *H. impositum* MeOH, *H. impositum* EtOH, *L. semisanguifluus* MeOH, *L. semisanguifluus* EtOH, *L. sanguifluus* MeOH, *L. sanguifluus* EtOH, *L. deliciosus* MeOH, *L. deliciosus* EtOH, *L. deliciosus* H₂O, *L. volemus* MeOH, *L. volemus* EtOH, *L. volemus* H₂O, *L. piperatus* MeOH, *L. piperatus* EtOH i *L. piperatus* H₂O (tabela 4.19).

Tabela 4.19 Doprinos svake vrste ukupnoj varijabilnosti i faktorske koordinate uzoraka

Vrste	Doprinos svake vrste (%)		Faktorske koordinate uzoraka	
	PC1	PC2	PC1	PC2
<i>B. edulis</i> MeOH	1,0	<u>38,8</u>	1.1	-4.0
<i>B. edulis</i> EtOH	<u>3,2</u>	7,6	-2.0	-1.8
<i>B. edulis</i> H ₂ O	<u>3,5</u>	1,0	2.1	-0.6
<i>X. chrysenteron</i> MeOH	<u>7,9</u>	0,04	3.1	0.1
<i>X. chrysenteron</i> EtOH	<u>4,4</u>	0,7	2.4	0.5
<i>X. chrysenteron</i> H ₂ O	<u>14,8</u>	0,2	4.3	-0.3
<i>I. rhodopurpureus</i> MeOH	<u>1,3</u>	1,9	-1.3	0.9
<i>I. rhodopurpureus</i> EtOH	<u>4,3</u>	0,03	-2.3	-0.1

<i>I. rhodopurpureus</i> H ₂ O	0,01	0,4	0.1	0.4
<i>R. rhodoxanthus</i> MeOH	<u>0,7</u>	0,02	0.9	0.1
<i>R. rhodoxanthus</i> EtOH	<u>1,4</u>	0,6	-1.3	0.5
<i>R. rhodoxanthus</i> H ₂ O	<u>4,7</u>	0,03	2.4	-0.1
<i>B. appendiculatus</i> MeOH	<u>4,7</u>	0,6	2.4	-0.5
<i>B. appendiculatus</i> EtOH	0,03	0,1	-0.2	0.1
<i>B. appendiculatus</i> H ₂ O	<u>6,9</u>	0,1	3.0	-0.1
<i>L. aurantiacum</i> MeOH	0,2	0,4	-0.5	0.4
<i>L. aurantiacum</i> EtOH	<u>1,0</u>	1,5	-1.1	0.8
<i>L. aurantiacum</i> H ₂ O	<u>2,0</u>	0,2	1.6	0.3
<i>L. albstipitatum</i> MeOH	0,01	0,1	0.2	0.2
<i>L. albstipitatum</i> EtOH	0,3	<u>1,2</u>	-0.6	0.7
<i>L. albstipitatum</i> H ₂ O	<u>3,6</u>	0,01	2.1	0.0
<i>H. impolitum</i> MeOH	1,9	<u>19,6</u>	-1.5	-2.8
<i>H. impolitum</i> EtOH	<u>6,7</u>	12,4	-2.9	-2.2
<i>H. impolitum</i> H ₂ O	<u>2,8</u>	0,1	1.9	0.2
<i>L. semisanguifluus</i> MeOH	0,1	0,5	-0.4	0.5
<i>L. semisanguifluus</i> EtOH	0,3	0,7	-0.6	0.5
<i>L. semisanguifluus</i> H ₂ O	0,1	0,2	0.4	0.3
<i>L. sanguifluus</i> MeOH	0,1	<u>1,1</u>	-0.4	0.7
<i>L. sanguifluus</i> EtOH	<u>0,7</u>	1,5	-0.9	0.8
<i>L. sanguifluus</i> H ₂ O	<u>1,2</u>	0,5	1.2	0.5
<i>L. deliciosus</i> MeOH	<u>1,0</u>	1,3	-1.1	0.7
<i>L. deliciosus</i> EtOH	<u>3,0</u>	1,4	-2.0	0.8
<i>L. deliciosus</i> H ₂ O	0,03	0,1	-0.2	0.2
<i>L. volemus</i> MeOH	<u>4,3</u>	0,3	-2.3	0.3
<i>L. volemus</i> EtOH	<u>5,4</u>	0,01	-2.6	0.0
<i>L. volemus</i> H ₂ O	<u>0,7</u>	1,7	-0.9	0.8
<i>L. piperatus</i> MeOH	<u>1,3</u>	0,9	-1.3	0.6
<i>L. piperatus</i> EtOH	<u>4,1</u>	0,2	-2.3	-0.3
<i>L. piperatus</i> H ₂ O	0,2	<u>1,9</u>	-0.5	0.9

Podučene vrednosti pokazuju najveći doprinos ukupnoj varijansi

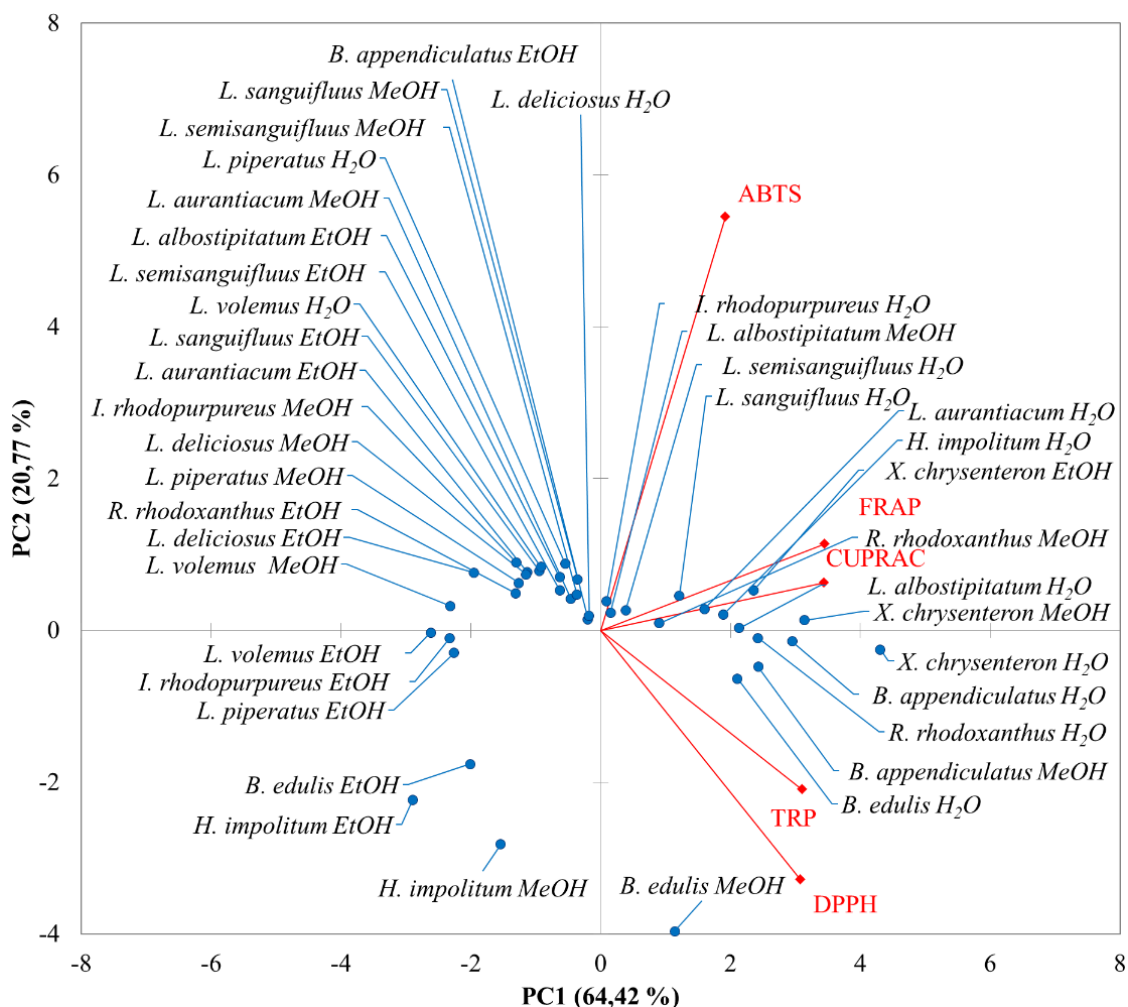
Vodeni ekstrakti, ređe metanolni i etanolni, koji imaju pozitivno opterećenje prve glavne komponente su: *B. edulis* MeOH, *B. edulis* H₂O, *X. chrysenteron* MeOH, *X. chrysenteron* EtOH, *X. chrysenteron* H₂O, *I. rhodopurpureus* H₂O, *R. rhodoxanthus* MeOH, *R. rhodoxanthus* H₂O, *B. appendiculatus* MeOH, *B. appendiculatus* H₂O, *L. aurantiacum* H₂O,

L. albostipitatum MeOH, *L. albostipitatum* H₂O, *H. impolitum* H₂O, *L. semisanguifluus* H₂O, *L. sanguifluus* H₂O i *L. sanguifluus* H₂O (tabela 4.19).

Na osnovu navedenih podataka i prikaza na slici 4.15 može se uočiti da su se vodeni ekstrakti, sem *L. volemus*, *L. piperatus* i *L. deliciosus*, kao i neki metanolni i etanolni (*L. albostipitatum*, *X. chrysenteron*, *B. appendiculatus* i *B. edulis*) izdvojili u desnom delu PCA dijagrama. Karakteristično za ovu grupu uzoraka je da su svi pomenuti ekstrakti gljiva (uglavnom vodeni) ispoljili najbolju antioksidativnu aktivnost i time se izdvojili u zaseban klaster.

Drugu grupu uzoraka čine metanolni i etanolni ekstrakti svih ostalih gljiva, koji se nalaze u negativnom delu PC1.

Takođe, sa slike 4.15 se može videti da vektori varijabli CUPRAC i FRAP zaklapaju oštar ugao što ukazuje na jaku međusobnu korelaciju.



Slika 4.15 PCA dijagram zavisnosti PC1 i PC2 za analizirane metanolne, etanolne i vodene ekstrakte ispitivanih vrsta gljiva i njihova antioksidativna aktivnost određena različitim metodama

To znači da nose iste informacije, te je za karakterizaciju uzorka dovoljno koristiti bilo koju od te dve metode (Krimer-Malešević, 2016). Kako se iz tabele 4.18 uočava da CUPRAC, FRAP, DPPH i TRP imaju \cos^2 varijabli $> 0,5$ za PC1, može se zaključiti da ove varijable određuju prvu glavnu komponentu, pri čemu vrsta *X. chrysenteron* H₂O sa svojim doprinosom od 14,8% i pozitivnim opterećenjem od 4,3 ima najveći doprinos prvoj glavnoj komponenti od svih analiziranih vrsta.

ABTS ima vrednost kosinus na kvadrat varijable od 0,66 i dominantno utiče na PC2. *B. edulis* MeOH u najvećoj meri određuje drugu glavnu komponentu sa svojim doprinosom od 38,8%.

4.3. KOMPARATIVNA ANALIZA

4.3.1. Korelacija sadržaja elemenata i antioksidativne aktivnosti ekstrakata odabranih vrsta gljiva

Korelacija sadržaja elemenata i antioksidativne aktivnosti gljiva nije mnogo proučavana, imajući u vidu činjenicu da su fenolna jedinjenja odgovorna za antioksidativnu aktivnost hrane. Međutim, istraživanja koja su rađena na ovu temu pokazuju da povezanost ipak postoji. Ispitivanjem je utvrđeno da prisustvo metalnih jona u proučavanim ekstraktima gljiva može uticati na povećanje ili smanjenje antioksidativne aktivnosti. Elementi mogu imati pozitivan, ali i negativan uticaj na aktivnost, u zavisnosti od prirode proučavanog elementa i njegove funkcije u procesu biosinteze sekundarnih metabolita (Samsonowicz i Ewa Regulsk, 2016).

Da nisu samo fenolna jedinjenja odgovorna za ukupnu antioksidativnu aktivnost već i neki mikroelementi, potvrđuje i istraživanje koje su radili Szymczycha-Madeja i sar., 2012. Ovi istraživači su utvrdili da mangan, koji je deo enzimskih antioksidansa, takođe učestvuje u borbi protiv reaktivnih kiseoničnih vrsta (Szymczycha-Madeja i sar., 2012). Takođe, antioksidativna svojstva cinka u eliminisanju reaktivnih kiseoničnih vrsta kao što su OH^\cdot , $\text{O}_2^{\cdot-}$ i H_2O_2 potvrđena su u Zn-metalotionenu i u enzimu Cu-Zn superoksid-dismutazi (Prasad i sar., 2004).

Joni prelaznih metala imaju značajnu ulogu u neutralisanju slobodnih radikala, gradeći komplekse sa polifenolima. Eksperimentalne studije su pokazale da helatizovani flavonoidi (pomoću Fe^{2+} , Cu^{2+} i Zn^{2+} jona) su efikasniji u „hvatanju” slobodnih radikala u poređenju sa nehelatizovanim flavonoidima (Kostiuk i sar., 2001). Ovu činjenicu potvrdilo je istraživanje koje su sproveli Moridani i sar. (2003) kojim su ustanovili da su kompleksi flavonoida sa metalnim jonom, u odnosu 2 : 1, bili efikasniji u „hvatanju” $\text{O}_2^{\cdot-}$ radikala od slobodnih flavonoida.

Neki kompleksi formirani između fenolnih jedinjenja i metala mogu imati manju antioksidativnu aktivnost zbog ograničene dostupnosti za neutralisanje slobodnih radikala (Clarisse i sar., 2000). Sa druge strane, visok sadržaj metala kod gljiva koje su rasle na zemljištu koje je obogaćivano određenim elementima može rezultovati većom bioraspoloživošću elemenata. Istraživanja koja su sproveli Gąsecka i sar. (2015) pokazuju da se koncentracija selena u gljivama nakon obogaćivanja zemljišta ovim elementom povećala 27 i 40 puta za vrste *Pleurotus ostreatus* i *Pleurotus eryngii*. Sa većim sadržajem elemenata koji su bioraspoloživi u gljivama dolazi do manjeg kompleksiranja sa polifenolnim jedinjenjima (Gąsecka i sar., 2015).

Ova činjenica ukazuje da povećanje antioksidativne aktivnosti, koja je ustanovljena u prethodno navedenom eksperimentu, može biti rezultat činjenice da je stvaranje kompleksa bilo manje, ili da su formirana druga jedinjenja koja pokazuju veću antioksidativnu aktivnost (Gąsecka i sar., 2015).

Međutim, pored toga što grade komplekse sa polifenolnim jedinjenjima, elementi kao što su npr. cink i selen su ključne komponente antioksidativnih enzima. Enzimi glutathion-peroksidaza i tioreduksin-reduktaza su važni za regulisanje koncentracije reaktivnih kiseoničnih vrsta u tkivima. Pomenuti enzimi regulišu njihovu koncentraciju u tkivima i na taj način smanjuju oksidativni stres, što je takođe uloga antioksidanasa. Selenoenzimi tokom stresa, infekcije ili povrede tkiva mogu zaštititi organizam od štetnih efekata vodonik-peroksida ili slobodnih radikala (FAO/WHO, 2001).

Da elementi nemaju samo pozitivan uticaj na enzimsku aktivnost dokazuje i istraživanje Tevari i sar. (2006), koji su zabeležili povećanu aktivnost antioksidativnih enzima, kao što je superoksid-dismutaza, u uzorcima duda, sa nedostatkom magnezijuma. Zaključili su da postoji obrnuti odnos između sadržaja magnezijuma i antioksidativne aktivnosti. Takođe, smanjenje koncentracije fosfora može uticati na povećani sadržaj flavonoida u hrani (Lillo i sar., 2007). Međutim, postoji i pozitivna korelacija sadržaja elemenata i antioksidativne aktivnosti, kao što je zabeleženo između koncentracije mangana i vrednosti DPPH testa, što se može objasniti ulogom mangana u aktiviranju enzima koji pojačavaju biosintezu flavonoida (Gordon, 2007). Mikroelementi Zn, Cu, Se i Mn, su kofaktori nekoliko antioksidativnih enzima, kao što je na primer, superoksid-dismutaza koji deluje tako što koristi Zn, Cu i Mn kako bi transformisala $O_2^{\cdot -}$ u manje štetan H_2O_2 (Spears i Weiss, 2008) a zatim glutathion-peroksidaza, koji sadrži selen, metaboliše H_2O_2 (Fardet i sar., 2008).

Dobijeni rezultati koji se odnose na elementni sadržaj ispitivanih vrsta gljiva i utvrđene antioksidativne aktivnosti, primenom različitih testova, korišćeni su za korelacionu analizu, u cilju proučavanja potencijalne veze elementnog sadržaja i antioksidativne aktivnosti. Dobijeni rezultati su prikazani u tabeli 4.20 i na slici 4.16.

4.3.1.1. Korelacija sadržaja fenolnih kiselina i antioksidativne aktivnosti

Na osnovu dobijenih korelacionih koeficijenata, uočava se nekoliko statistički značajnih korelacija između sadržaja fenolnih kiselina i antioksidativne aktivnosti. Iz tabele 4.20 se može uočiti da postoji pozitivna korelacija između sadržaja *p*-kumarne kiseline i rezultata antioksidativne aktivnosti, dobijeni primenom DPPH, CUPRAC i FRAP testova ($r = 0,69$;

$r = 0,70$ i $r = 0,55$). Takođe, *p*-kumarna kiselina je u pozitivnoj korelaciji sa sadržajem flavonoida u gljivama ($r = 0,80$).

Tabela 4.20 Korelaciona analiza elementnog sadržaja, antioksidativne aktivnosti i fenolnih kiselina odabranih vrsta gljiva

	<i>p</i> -hidroksi benzoeva	Kafena kiselina	Vanilinska kiselina	Hlorogenska kiselina	Siringinska kiselina	<i>p</i> -kumarna kiselina	Ferulna kiselina	TPC	TFC
DPPH	0,02	0,13	0,29	0,12	0,06	<u>0,69</u>	0,08	0,36	<u>0,65</u>
ABTS	-0,48	-0,3	-0,23	-0,2	0,27	0,33	-0,43	-0,18	0,43
CUPRAC	0,26	-0,14	0,14	0,44	0,43	<u>0,7</u>	0,28	0,08	<u>0,71</u>
FRAP	0,21	0,31	<u>0,5</u>	0,15	0,07	<u>0,55</u>	0,23	0,47	<u>0,63</u>
TRP	0,04	0,08	-0,07	0,34	-0,04	0,35	0,05	<u>0,66</u>	0,26
Ca	0,08	-0,14	-0,09	-0,12	0,45	0,09	0,02	-0,38	0,09
K	<u>0,56</u>	-0,17	0,04	<u>0,65</u>	0,01	-0,06	<u>0,52</u>	-0,17	-0,18
Na	-0,24	-0,09	-0,05	-0,32	0,15	0,09	-0,15	-0,22	-0,02
P	0,42	<u>0,56</u>	<u>0,83</u>	-0,08	-0,22	0,03	0,43	0,23	0,29
Zn	0,06	0,2	0,35	-0,24	-0,34	-0,19	0,11	-0,14	-0,18
Fe	0,1	-0,26	-0,23	0,33	-0,07	-0,3	0,03	-0,29	-0,22
Cu	0,03	-0,06	-0,01	0,03	0,02	-0,29	0,08	0,15	-0,09
Mn	0,25	0,46	<u>0,63</u>	0,08	-0,41	-0,36	0,17	0	-0,01
Cr	-0,18	0,21	-0,23	-0,13	0,21	0,2	-0,16	0,43	-0,03
Co	0,38	0,06	-0,04	0,52	-0,02	-0,04	0,38	0,29	-0,28
Se	-0,11	0,26	-0,15	0,04	-0,27	-0,14	-0,09	<u>0,71</u>	-0,32
Ni	<u>0,89</u>	-0,11	0,07	<u>0,78</u>	0,36	-0,07	<u>0,93</u>	-0,14	-0,12
Ag	-0,15	0,06	-0,15	-0,22	0,31	-0,19	-0,15	-0,05	-0,17
Al	-0,14	-0,24	-0,27	0,07	-0,03	-0,31	-0,19	-0,27	-0,15
Rb	-0,24	0,41	0,31	-0,33	-0,22	0,17	-0,17	-0,02	0,12
Bi	-0,29	0	-0,2	-0,03	-0,22	-0,14	-0,24	0	-0,19
Ba	-0,14	0,09	-0,14	-0,2	0,44	-0,03	-0,14	-0,01	-0,05

Podvučene vrednosti označavaju korelacije statistički značajne

Takođe, može se uočiti da je sadržaj vanilinske kiseline u pozitivnoj korelaciji sa rezultatima za FRAP test, $r = 0,50$. Ranije prikazani rezultati za sadržaj fenolnih kiselina u ispitivanim vrstama gljiva pokazuju da vanilinska kiselina ima najveći doprinos sadržaju ukupnih fenolnih kiselina i da verovatno najviše doprinosi ukupnom antioksidativnom kapacitetu proučavanih uzoraka. To se može objasniti strukturom vanilinske kiseline, prisustvom dve hidroksilne grupe u molekulu, a poznato je da one pokazuju veću sposobnost doniranja atoma vodonika i sparivanja nesparenih elektrona (Bratu i sar., 2018).

4.3.1.2. Korelacija sadržaja flavonoida i antioksidativne aktivnosti

Hrana bogata flavonoidima je dobar izvor antioksidanasa koji povećavaju ukupni antioksidativni kapacitet i štite od peroksidacije lipida (Sharififar i sar., 2009) Dobijeni rezultati pokazuju da postoji pozitivna korelacija između sadržaja ukupnih flavonoidnih jedinjenja i rezultata antioksidativne aktivnosti koji su dobijene primenom CUPRAC ($r = 0,71$), DPPH ($r = 0,65$) i FRAP ($r = 0,63$) testa (tabela 4.20). Ovi rezultati su slični rezultatima koje su prikazali Tamuly i sar. (2013) i Kim i sar. (2003) u svojim istraživanjima. Takođe, Kainama i sar. (2020) su ustanovili da između sadržaja ukupnih flavonoida i rezultata dobijenih DPPH testom postoji jaka, pozitivna korelacija ($r = 0.756$).

4.3.1.3. Korelacija sadržaja fenolnih kiselina i sadržaja određivanih elemenata

Na osnovu dobijenih rezultata, sa slike 4.16, može se uočiti da postoji pozitivna korelacija između rezultata za sadržaj pojedinačnih fenolnih kiselina i određenih elementata. Sadržaji kalijuma i nikla pokazuju značajnu pozitivnu korelaciju sa sadržajem *p*-hidroksibenzojeve kiseline, $r = 0,56$ i $r = 0,89$, hlorogene, $r = 0,65$ i $r = 0,78$, kao i sa sadržajem ferulne kiseline, $r = 0,52$ i $r = 0,93$. Ovi rezultati ukazuju da prisustvo pomenutih elemenata ima značajan uticaj na povećanje sadržaja fenolnih kiselina u gljivama, a samim tim i na veću antioksidativnu aktivnost. Prikazana pozitivna korelacija nikla sa fenolnim kiselinama je u skladu sa podacima iz literature, koji takođe potvrđuju uticaj nikla na sadržaj fenolnih jedinjenja (Li i sar., 2020). Treba napomenuti da pozitivna korelacija kalijuma sa fenolnim kiselinama može biti posledica njegove funkcije u aktiviranju enzima koji pojačavaju biosintezu flavonoida i fenolnih jedinjenja (Gordon, 2007).

Još jedan makroelement, fosfor, pokazuje pozitivnu korelaciju sa kafenom i vanilinskom kiselinom, $r = 0,56$ i $r = 0,83$, što potvrđuje uticaj fosfora na sintezu fenolnih kiselina.

In vitro istraživanje koje su realizovali Kaneda i sar. (2006), pokazuje da je sadržaj mangana u korelaciji sa antioksidativnom aktivnošću. Rezultati prikazani u ovom doktoratu su u skladu sa Kaneda istraživanjem, jer se može uočiti pozitivna korelacija između sadržaja mangana i vanilinske kiseline, $r = 0,63$. Ova činjenica se može objasniti učestvovanjem mangana u aktiviranju enzima koji su odgovorni za biosintezu fenolnih jedinjenja (Gordon, 2007).



Slika 4.16 Korelaciona analiza elementnog sadržaja, antioksidativne aktivnosti i fenolnih kiselina u gljiva

4.3.1.4. Korelaciona analiza sadržaja ukupnih fenolnih jedinjenja i selen

Poznato je da gljive poseduju antioksidativna svojstva, zahvaljujući prisustvu antioksidanasa kao što su fenoli, ergotionein i selen.

Selen je esencijalan mikroelement neophodan za zdravlje ljudi i životinja, koji se ne sintetise u ljudskom telu i ne može se zameniti bilo kojim drugim elementom (Lions i sar., 2005). Granica između štetnog i korisnog efekta selen je mala, tako da sadržaj selen ima velike implikacije na aktivnost ljudskog organizma. Nedovoljan unos selen je povezan sa zdravstvenim poremećajima, uključujući stanja povezana sa oksidativnim stresom, imunološke funkcije ili povećan rizik od karcinoma (Zeng i Combs, 2008). Selen se javlja u približno 30 selenoenzima i selenoproteina koji su uključeni u Se-antioksidativni sistem odbrane (Kalač, 2019). Smatra se „čistačem” toksičnih metala u telu jer je antagonist žive, olova, aluminijuma i kadmijuma i kroz njegovu funkciju sa glutationom deluje kao moćan antioksidans koji pomaže u borbi protiv slobodnih radikala (Lachman i sar., 2011).

Imajući u vidu značaj selena i činjenici da ga gljive akumuliraju u značajnom procentu, od velikog je značaja komparativno ispitivanje sadržaja selena i fenolnih jedinjenja.

Gasecka i sar. (2015) su uzimajući u obzir značaj Se u metabolizmu čoveka i činjenicu da gljive akumuliraju selen, ispitivali uticaj koncentracije selena na sadržaj fenolnih jedinjenja u gljivama *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus eringii* i *Pholiota nameko*. Rezultati su pokazali da selen može stimulisati biosintezu fenola i flavonoida. Sa povećanjem koncentracije selena u supstratu linearno se povećala koncentracija svih ipitivanih fenolnih kiselina u pomenutim gljivama.

Dobijeni rezultat korelacione analize ($r = 0,71$) ukazuje da postoji značajna veza između koncentracije selena i ukupnog sadržaja fenolnih jedinjenja u ispitivanim gljivama (tabela 4.20). Na osnovu pozitivne korelacije zaključuje se da selen direktno utiče na sintezu fenolnih jedinjenja.

Zaključak

Cilj doktorske disertacije „Komparativno istraživanje sadržaja elemenata i antioksidativne aktivnosti odabranih vrsta gljiva: hemometrijski pristup” bio je određivanje elementnog sastava i antioksidativne aktivnosti odabranih vrsta gljiva iz porodice Boletaceae (*Boletus edulis*, *Xerocomellus chrysenteron*, *Imperator rhodopurpureus*, *Rubroboletus rhodoxanthus*, *Butyriboletus appendiculatus*, *Leccinum aurantiacum*, *Leccinum albostipitatum* i *Hemileccinum impolitum*) i Russulaceae (*Lactarius semisanguifluus*, *Lactarius sanguifluus*, *Lactarius deliciosus*, *Lactifluus volemus* i *Lactarius piperatus*).

Kvalitet gljiva u pogledu elementnog sastava određen je primenom optičke emisijske spektrometrije sa indukovano spregnutom plazmom (za određivanje Ca, Fe, K, Na i P) i masene spektrometrije sa indukovano spregnutom plazmom (za određivanje Zn, Cu, Mn, Co, Se, Cr, Ni, Ag, Al, Rb, Bi, Sr, Ba, As, Cd, Hg i Pb). Svi posmatrani elementi su podeljeni u tri grupe: biološki važni, toksični i neesencijalni elementi koji se mogu naći u gljivama i na osnovu njihove količine u ispitivanim uzorcima kao i prihvatljivog i preporučenog dnevnog unosa određen je njihov doprinos kroz konzumiranje porcije od 300 g svežih gljiva. Od svih analiziranih elemenata kalijum je najviše prisutan u svim gljivama i njegov sadržaj se kreće u rasponu od 10092 mg/kg sm (*I. rhodopurpureus*) do 45257 mg/kg sm (*L. aurantiacum*), tako da konzumiranjem porcije od 300 g gljiva obezbeđuje se 15,1% do 67,9% dnevnih potreba za kalijumom. Fosfor je drugi najzastupljeniji makroelement u samoniklim gljivama i njegova koncentracija je oko pet puta manja u odnosu na sadržaj kalijuma. Gljiva *H. impolitum* se izdvojila jer je sadržaj fosfora najveći kod ove vrste (10078 mg/kg sm). Kalcijum i natrijum se u gljivama pojavljuju u manjoj koncentraciji, pa se i konzumiranjem 300 g svežih gljiva može obezbediti maksimalno 1,6% (*L. sanguifluus*) dnevnog unosa kalcijuma, i do 1,8% (*I. rhodopurpureus*) natrijuma dnevno. Na osnovu dobijenih vrednosti koncentracija za biološki važne mikroelemente može se zaključiti da su ispitivane vrste gljiva bogate ovim elementima i imaju značajan doprinos u ishrani, jer konzumiranjem porcije od 300 g gljiva procenat unetih elemenata prelazi 15% dnevnih potreba kod većine ispitivanih vrsta i time se smatra značajnim. Treba istaći da je većina analiziranih vrsta izrazito bogata bakrom, pogotovu vrste iz porodice Boletaceae od kojih se konzumiranjem 300 g svežih gljiva može uneti i više od 100% preporučenog dnevnog unosa bakra. Takođe, konstatacija da se gljive smatraju jednim od najvećih prirodnih izvora selena je ovim istraživanjem i dokazana jer je kod većine analiziranih vrsta utvrđena visoka koncentracija selena pa se njihovim konzumiranjem može obezbediti četvrtina dnevnih potreba za selenom. I ostali mikroelementi, kao što su gvožđe, hrom i cink su prisutni u značajnim količinama. Koncentracija arsena, kadmijuma, žive i olova praćena je u odabranim vrstama gljiva.

Na osnovu dobijenih vrednosti može se videti da konzumiranje velike većine analiziranih vrsta ne predstavlja rizik po zdravlje ljudi. Sadržaj arsena u 300 g svežih gljiva na nedeljnom nivou ne prelazi 4,7% (*B. appendiculatus*), za kadmijum 14,8% (*I. rhodopurpureus*), za živu, 32,8% kod vrste *L. volemus*, i olovo, 18,7% kod vrste *B. edulis*. Pored pomenutih grupa elemenata, u ovoj doktorskoj disertaciji prikazani su i rezultati za koncentracije neesencijalnih elemenata koji se mogu naći u samoniklim gljivama. Neki od njih kao što su Ag, Al, Rb, Sr i Ba su često proučavani elementi u samoniklim gljivama i dobijene vrednosti su u okvirima literaturnih podataka. Gljiva *L. volemus* se istakla sa velikim sadržajem srebra (233 mg/kg sm) kao i barijuma (9,8 mg/kg sm). Bizmut nije često proučavan element u gljivama i svi analizirani uzorci pokazali su mali sadržaj ovog elementa izuzev vrste *R. rhodoxanthus* gde je zabeleženo 1,4 mg/kg.

Hemometrijska analiza dobijenih rezultata o elementnom sastavu ispitivanih gljiva obuhvatila je korelacinu analizu, analizu glavih komponenti i klaster analizu. Korelacionom analizom je utvrđena najveća korelacija između sadržaja natrijuma i cinka. PCA analizom su ekstrahovane dve glavne komponente koje objašnjavaju 82,3% ukupne varijanse između dobijenih rezultata i na taj način pružen je uvid u podelu gljiva na osnovu sadržaja elemenata. Uočeno je da su se vrste *B. edulis*, *X. chrysenteron*, *R. rhodoxanthus*, *L. semisanguifluus*, *L. sanguifluus*, *L. volemus* i *L. piperatus* izdvojile u donjem delu dijagrama, kao i toksični elementi, jer u odnosu na druge vrste imaju visok sadržaj pomenutih elemenata. Klaster analizom, elementi su grupisani u dva klastera, pri čemu prvi klaster čini kalijum, element koji je nađen u svim gljivama u dosta većoj koncentraciji nego ostali elementi, dok drugi klaster čine svi preostali elementi. Klaster analizom gljiva na osnovu sadržaja elemenata dobijena su dva značajna klastera unutar kojih se jasno odvajaju gljive iz različitih porodica.

Koristeći HPLC metodu izvršena je identifikacija, a zatim i kvantifikacija sledećih fenolnih kiselina: *p*-hidroksibenzoeva, kafena, vanilinska, hlorogena, siringinska, *p*-kumarna i ferulna kiselina.

Odabrane vrste gljiva sadrže od tri do sedam fenolnih kiselina i jedino se *p*-kumarna kiselina izdvojila kao kiselina koja je identifikovana u svim ispitivanim gljivama. Sadržaj ove fenolne kiseline je nešto veći u gljivama koje pripadaju porodici Boletaceae i to u opsegu od 0,59–2,21 mg/kg se, dok je njena koncentracija u gljivama porodice Russulaceae manja i kreće se u opsegu od 0,045–1,21 mg/kg se. Ipak najveći doprinos ukupnom sadržaju fenolnih kiselina ima vanilinska kiselina koja je pronađena kod svih gljiva, izuzev kod vrste *B. edulis* i dominantna je kod gljiva koje pripadaju porodici Boletaceae. Vrsta *B. appendiculatus* sadrži vanilinsku kiselinu čak 92,9% dok *H. impolitum* 88,2% od ukupnog sadržaja fenolnih kiselina.

Među gljivama koje pripadaju porodici Russulaceae, koje imaju manji sadržaj ove kiseline, treba izdvojiti vrstu *L. deliciosus* kod koje 60,9% od ukupnog sadržaja se pripisuje vanilinskoj kiselini. Gljive porodice Boletaceae su bogatije fenolnim kiselinama i tu treba istaći vrste *H. impolitum*, *L. albobostipatum*, *B. appendiculatus* i *X. chrysenteron* čiji je ukupan sadržaj fenolnih kiselina 176,761; 82,118; 51,447 i 37,313 mg/kg se. Primenom korelacione analize utvrđeno je da se najveći stepen korelacije javlja između ferulne i *p*-hidroksibenzojeve kiseline, $r = 0,98$; kafene i vanilinske kiseline, $r = 0,81$; ferulne i hlorogenske kiseline, $r = 0,75$; i hlorogene i *p*-hidroksibenzojeve kiseline, $r = 0,74$.

Podela gljiva prema sadržaju fenolnih kiselina urađena je primenom PCA analize. Prve tri glavne komponente doprinose 90,63% ukupne varijanse originalnih podataka. *p*-hidroksibenzojeve, ferulne i hlorogena kiselina određuju prvu glavnu komponentu, kafena i vanilinska drugu glavnu komponentu i *p*-kumarna i siringinska kiselina treću glavnu komponentu. Zavisnost prve i druge glavne komponente izdvaja gljivu *H. impolitum* zbog visokog sadržaja kafene i vanilinske kiseline, *L. albobostipatum* zbog visokog sadržaja *p*-hidroksibenzojeve i ferulne kiseline. Zavisnost prve i treće glavne komponente izdvaja vrstu *X. chrysenteron* zbog visokog sadržaja *p*-kumarne i siringinske kiseline.

Za ekstrakciju antioksidanasa korišćena su tri rastvarača: metanol, etanol i vodu. Prinos vodenih ekstrakata najveći je za sve uzorke gljiva, osim za vrste *I. rhodopurpureus* i *R. rhodoxanthus*. Takođe, uočeno je da sve gljive iz porodice Russulaceae imaju znatno niži prinos za sva tri korišćena rastvarača.

Sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja ispitivan je u metanolnim, etanolnim i vodenim ekstraktima gljiva primenom Folin-Ciocalteu metode, i kreće se u opsegu od 9,4 µg GAE/mg se do 195 µg GAE/mg se. Vodeni ekstrakti gljiva pokazuju najveći sadržaj ovih jedinjenja. Gljive koje pripadaju porodici Boletaceae su se pokazale kao bogatije fenolnim jedinjenjima i tu se izdvajaju vrste *B. appendiculatus* i *B. edulis*, čiji svi ekstrakti imaju visok sadržaj fenolnih jedinjenja. Gljive iz porodice Russulaceae pokazuju manji sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja u odnosu na gljive iz porodice Boletaceae, ali je i kod njih sadržaj fenolnih jedinjenja najveći u vodenim, zatim metanolnim i na kraju etanolnim ekstraktima. Vrsta *L. deliciosus* ima najveći sadržaj fenolnih jedinjenja u sve tri vrste ekstrakata.

Sadržaj flavonoida najveći je u vodenim, zatim u metanolnim i na kraju etanolnim ekstraktima i kreće se u opsegu od 2,24 RE/mg se do 41,9 RE/mg se. Vrste gljiva koje pripadaju porodici Boletaceae imaju veći sadržaj flavonoida i tu treba izdvojiti vrstu *X. chrysenteron* čiji su svi ekstrakti pokazali najveći sadržaj pomenutih jedinjenja. Metanolni ekstrakt vrste *L. sanguifluus* se izdvojio zbog najvećeg sadržaja ukupnih flavonoida među vrstama porodice

Russulaceae, 23,43 RE/mg se, što čini 72,5% flavonoida u odnosu na ukupna fenolna jedinjenja.

Antioksidativna aktivnost ispitivanih vrsta gljiva iz porodice Boletaceae i Russulaceae određena je primenom DPPH, ABTS, CUPRAC, TRP i FRAP testova. Za analizu su korišćeni metanolni, etanolni i vodeni ekstrakti i na osnovu rezultata se može zaključiti da antioksidativna aktivnost zavisi od rastvarača koji se koristi za ekstrakciju kao i od vrste gljiva. U svim primenjenim testovima uočena je pravilnost da vodeni ekstrakti pokazuju najveću antioksidativnu aktivnost, zatim metanolni, i najslabije etanolni. Vrste koje pripadaju porodici Boletaceae pokazuju veću aktivnost u odnosu na vrste porodice Russulaceae i tu se izdvajaju vrste *B. edulis*, *X. chrysenteron* i *R. rhodoxanthus* koje su u svim pomenutim testovima pokazivale najbolju aktivnost. Sa nešto većom antioksidativnom aktivnošću treba izdvojiti vrste *L. deliciosus* i *L. sanguifluus*, gljive koje pripadaju porodici Russulaceae. Primenom PCA analize u istom delu PCA dijagrama grupisani su uglavnom vodeni ekstrakti, kao i sve primenjene metode.

Korelacionom analizom je dokazano da određeni elementi poput Se, Zn, Cu, Fe, Mn koji su deo antioksidativnih enzima imaju uticaj na antioksidativnu aktivnost.

Literatura

- Alaimo, MG., G. Dongarra, A. La Rosa, E. Tamburo, G. Vasquez, D. Varrica, Major and trace elements in *Boletus aereus* and *Clitopilus prunulus* growing on volcanic and sedimentary soils of Sicily (Italy). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2018, 157:182–190.
- Alonso, J., M. A. GarcíaM. Pérez-López, MJ. Melgar, The concentrations and bioconcentration factors of copper and zinc in edible mushrooms. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 2003, 44:180–188.
- Aloupi, M., G. Koutrotsios, M. Koulousaris, N. Kalogeropoulos, Trace metal contents in wild edible mushrooms growing on serpentine and volcanic soils on the island of Lesvos, Greece. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2012, 78:184–194.
- Apak, R., K. Güçlü, M. Özyürek, BB. Oğlu, M. Bener, Cupric ion reducing antioxidant capacity assay for food antioxidants: Vitamins, polyphenolics, and flavonoids in food extracts. *Methods in Molecular Biology*, 2008, 477:163–193.
- Apak, R., K. Güçlü, M. Özyürek, S.E. Karademir, M. Altun, Total antioxidant capacity assay of human serum using copper (II)-neocuproine as chromogenic oxidant: the CUPRAC method, *Free Radical Research*, 2005, 39:949–961.
- Apak, R., K. Güçlü, M. Özyürek, SE. Karademir, Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2004, 52:7970–7981.
- Aparicio, R., R. Aparicio-Ruiz, Chapter 7: Chemometrics as an aid in authentication, in: Oils and fats authentication, Michael Jee (Ed.), Blackwell publishing, Oxford, UK, 156–180, 2002.
- Apostolov, S., Proučavanje retencionih i solvatohromnih osobina novosintetizovanih derivata fenilacetamida, Univerzitet Novi Sad, 2014.
- Arfken, G., Eigenvectors, Eigenvalues. In: Arfken G., Weber H., (Eds.) *Mathematical Methods for Physicists*. Academic Press, Orlando, Florida, USA. 229–237. 1985.
- Arsic, B., D. Dimitrijevic, D. Kostic, *Nutraceuticals: nanotechnology in agri-food industry*, edited by AM. Grumezescu, Mineral and vitamin fortification, Academic Press, 2016.
- Aschner, JL., M. Aschner, Nutritional aspects of manganese homeostasis. *Molecular Aspects of Medicine*, 2005;26:353–362.
- ATSDR - Agency for Toxic Substances and Disease Registry, Toxicological profile for Arsenic, 2007.
- Babbie, E., *The Practice of Social Research*. Wadsworth Publishing, Belmont, California, USA, 2009.
- Bajić-Ljubičić, J., Varijabilnost sadržaja odabranih fenolnih jedinjenja u ekstraktima plodova pet šumskih drvenastih vrsta sa različitih staništa u Srbiji. Univerzitet Beograd, 2018.
- Bandyopadhyay, M., R. Chakraborty, U. Raychaudhuri, A process for preparing a natural antioxidant enriched diary product (Sandesh), *LWT-Food Science and Technology*, 2007, 40:842–851.

- Barcan, V Sh., EF. Kovnatsky, MS. Smetannikova, Absorption of heavy metals in wild berries and edible mushrooms in an area affected by smelter emissions. *Water, Air, and Soil Pollution*, 1998, 103:173–195.
- Barja, G., Free radicals and aging, *Trends in Neurosciences*, 2004, 27:595–600.
- Benbrahim, M., L. Denaix, AL. Thomas, J. Balet, JM. Carnus, Metal concentrations in edible mushrooms following municipal sludge application on forest land. *Environment Pollution*, 2006, 3:847–854.
- Bennett, RN., RM. Wallsgrove, Secondary metabolites in plant defence mechanisms, *New Phytologist*, 1994, 127:617–633.
- Benzie, IFF., JJ. Strain, The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of ‘Antioxidant Power’: The FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 1996, 239:70–76.
- Berenson, M., M. Levine, T. Krehbiel, Basic Business Statistics: Concepts and Applications, 12th edition, Prentice Hall, New Jersey, 2011.
- Bharathy, H., N Fathima, Exploiting oleuropein for inhibiting collagen fibril formation. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2017, 101:179–186.
- Birben, E., UM. Sahiner, C. Sackesen, S. Erzurum, O. Kalayci, Oxidative stress and antioxidant defense, *World Allergy Organization Journal*, 2012, 5:9–19.
- Blainski, A., G.Cristiny L. Palazzo de Mello, J.C. Palazzo de Mello, Application and Analysis of the Folin Ciocalteu Method for the Determination of the Total Phenolic Content from *Limonium Brasiliense* L., *Molecules*, 2013, 18:6852–6865.
- Boccard, J., S. Rudaz, Mass Spectrometry Metabolomic Data Handling for Biomarker Discovery. In: Proteomic and Metabolomic Approaches to Biomarker Discovery, edited by HJ. Issaq, TD.Veenstra, Academic Press, 2013.
- Borovička, J., S. Braeuer, J. Sácký, J.Kameník, W. Goessler, J. Trubač, L. Strnad, J. Rohovec, T. Leonhardt, P. Kotrba. Speciation analysis of elements accumulated in *Cystoderma carcharias* from clean and smelter-polluted sites. *Science of the Total Environment*, 2019, 648:1570–1581.
- Bors, W., W. Heller, C. Michel, M. Saran, Flavonoids as antioxidant: Determination of radical scavenging efficiencies, *Methods in Enzymology*, 1990, 186:343–355.
- Brand-Wiliams, W., ME. Cuvelier, C. Berset, Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*, 1995, 28: 25–30.
- Bratu, M., S. Birghila, A. Popescu, S. Negreanu-Pirjol, T. Negreanu-Pirjol, Correlation of antioxidant activity of dried berry infusions with the polyphenols and selected microelements contents. *Bulletin of the Chemical Society of Ethiopia*, 2018, 32:1–12.
- Brzezicha-Cirocka, J., M. Medyk, J. Falandysz, P. Szefer, Bio- and toxic elements in edible wild mushrooms from two regions of potentially different environmental conditions in eastern Poland. *Environmental Science and Pollution Research*, 2016, 23:21517–21522.
- Bulajić, M., Geodemografski model tržišnog prostora Srbije, Univerzitet Beograd, 2002.
- Campos, AM., EA. Lissi, Kinetics of the reaction between 2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) derived radical cations and phenols. *International Journal of Chemical Kinetics*, 1997, 29:219–224.

- Campos, JA., NA. Tejera, Bioconcentration factors and trace elements bioaccumulation in sporocarps of fungi collected from quartzite acidic soils. *Biological Trace Elements Research*, 2011, 143:540–554.
- Cannes do Nascimento, N., AG. Fett-Neto, Plant secondary metabolism and challenges in modifying its operation: an overview. In: Fett-Neto, A.G. (Ed.), *Plant Secondary Metabolism Engineering, Methods in Molecular Biology*. Humana Press Inc., New York, 1–13, 2010.
- Chandrasekara, A., Phenolic Acids, *Reference Module in Food Science*, 2018.
- Charles, DJ., *Antioxidant Properties of Spices, Herbs and Other Sources*, Springer-Verlag New York, 2013.
- Cheeseman, KH., TF. Slater, An introduction to free radicals chemistry, *British Medical Bulletin*, 1993, 49:481–493.
- Chen, S., P. Schopfer, Hydroxyl-radical production in physiological reactions. A novel function of peroxidase. *European Journal of Biochemistry*, 1999, 260:726–735.
- Chivers, PT., Binding, Transport and Storage of Metal Ions in Biological Cells, *Royal Society of Chemistry*, 381–428, 2014.
- Ciu, T., JZ. Li, H. Kayahara, L. Ma, LX. Wu, K. Nakamura, Quantification of the polyphenols and triterpene acids in Chinese hawthorn fruit by high-performance liquid chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2006, 54:4574–4581.
- Clarisse, MD., EF. Lucas, MCV. Amorim Avaliação da interação macromolécula/ion Zn^{+2} em meio aquoso: poli(acrilamida-co-ácido acrílico) e taninos. *Polimeros*, 2000, 10:162–169.
- Cocchi, L., L. Vescov, LE. Petrini, O. Petrini, Heavy metals inedible mushrooms in Italy. *Food Chemistry*, 2006, 98:277–284.
- Collin-Hansen, C., KE. Yttri, RA. Andersen, BO. Berthelsen, E. Steinnes, Mushrooms from two metal-contaminated areas in Norway: Occurrence of metals and metallothionein-like proteins. *Geochemistry, Exploration, Environment, Analysis*, 2002, 2:121–130.
- Coşkuner, Y., Y.Özdemir, Effects of canning processes on the elements content of cultivated mushrooms (*Agaricus bisporus*), *Food Chemistry*, 1997, 60:559–562.
- Cotzias, GC., Importance of trace substances in environmental health, as exemplified by manganese. edited by DH Hemphil, *Trace Substances in Environmental Health*, Press, Columbia, 1967.
- Csomós, E., K. Héberger, L. Simon-Sarkadi, Principal component analysis of biogenic amines and polyphenols in Hungarian wines. *Jornal of Agricultural and Food Chemistry*, 2002, 50:3768–3774.
- Cvetkovic, JS., VD. Mitic, VP. Stankov-Jovanovic, MV. Dimitrijevic, SD. Nikolic-Mandic, Elemental composition of wild edible mushrooms from Serbia. *Analytical Letters*, 2015, 48:2017–2121.
- de Groot, H., U. Rauen, Tissue injury by reactive oxygen species and the protective effects of flavonoids, *Fundamental and Clinical Pharmacology*, 1998, 12:249–255.
- De Silva, DD., S. Rapior, F. Fons, AH. Bahkali, KD. Hyde, Medicinal mushrooms in supportive cancer therapies: an approach to anti-cancer effects and putative mechanisms of action, *Fungal Diversity*, 2012, 55:1–35.

- Dean, JR., Practical Inductively Coupled Plasma Spectroscopy, John Wiley and Sons, Ltd., 2005.
- Decker, EA., Phenolics: Prooxidants or Antioxidants? *Nutrition Reviews*, 1997, 55:396–398.
- Delaquis, P., K. Stanich, P. Toivonen, Effect of pH on the inhibition of *Listeria* spp. by vanillin and vanillic acid. *Journal of Food Protection*, 2005, 68:1472–1476.
- Demirbaş, A., Heavy metal bioaccumulation by mushrooms from artificially fortified soils. *Food Chemistry*, 2001, 74:293–301.
- Dey, G., M. Chakraborty, A. Mitra, Profiling C6-C3 and C6-C1 phenolic metabolites in *Cocos nucifera*. *Journal of Plant Physiology*, 2005, 162:375–381.
- Dimitrijević, M., V. Stankov Jovanovic, J. Cvetkovic, T. Mihajlov Krstev, G. Stojanovic, V. Mitic, Screening of antioxidant, antimicrobial and antiradical activities of twelve selected Serbian wild mushrooms. *Analytical Methods*, 2015, 7:4181–4191.
- Dimitrijević, MV., VD. Mitic, OP. Jovanovic, VP. Stankov Jovanovic, JS. Nikolic, GM. Petrovic, G S. Stojanovic, Comparative Study of Fatty Acids Profile in Eleven Wild Mushrooms of Boletacea and Russulaceae Families. *Chemistry and Biodiversity*, 2018, 15:1–15.
- Drewnowska, M., J. Falandysz, Investigation on mineral composition and accumulation by popular edible mushroom common chanterelle (*Cantharellus cibarius*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2015, 113:9–17.
- Drewnowska, M., J. Falandysz, M. Chudzińska, A. Hanć, M. Saba, D. Barańkiewicz, Leaching of arsenic and sixteen metallic elements from *Amanita fulva* mushrooms after food processing. *LWT Food Science and Technology*, 2017, 84:861–866.
- Dröge, W., Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function, *Physiological Reviews*, 2002, 82:47–95.
- Durkan, N., I. Ugulu, MC. Unver, Y. Dogan, S. Baslar, Concentrations of trace elements aluminum, boron, cobalt and tin in various edible mushroom species from Buyuk Menderes River Basin in Turkey by ICP-OES. *Trace Elements and Electrolytes*, 2011, 28:242–248.
- EEC Amending Council Directive 90/496/EEC on nutrition labelling for foodstuffs as regards recommended daily allowances, energy conversion factors and definitions. *Official Journal of the European Union*, Commission Directive 2008/100/EC.
- EFSA Guidance on selected default values to be used by the EFSA Scientific Committee, Scientific Panels and Units in the absence of actual measured data. *EFSA Journal* 2012, 10:2579.
- EFSA NDA Panel (EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies), Scientific Opinion on Dietary Reference Values for copper. *EFSA Journal* 2015, 13:4253.
- EFSA NDA Panel (EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies), Scientific Opinion on Dietary Reference Values for iron. *EFSA Journal* 2015, 13:4254.
- EFSA Scientific opinion on dietary reference values for cobalamin (vitamin B12). EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition, and Allergies (NDA). *EFSA Journal*, 2015, 13: 4150.
- EFSA, European Food Safety Authority, Dietary Reference Values for nutrients-Summary report, *EFSA Journal*, 2017, e15121.
- EFSA, European Food Safety Authority, Dietary Reference Values for sodium, 2019.

- EFSA, European Food Safety Authority, Dietary Reference Values for nutrients-Summary report, 2017.
- El-Seedi, HR., AM. El-Said, SA. Khalifa, U. Goransson, L. Bohlin, AK. BorgKarlson, R. Verpoorte, Biosynthesis, natural sources, dietary intake, pharmacokinetic properties, and biological activities of hydroxycinnamic acids, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2012, 60:10877–10895.
- Falandysz, J., AK. Kojta, G. Jarzyńska, M. Drewnowska, A. Dryżałowska, D. Wydmańska, I. Kowalewska, A. Wacko, M. Szlosowska, K. Kannan, P. Szefer, Mercury in bay bolete (*Xerocomus badius*): bioconcentration by fungus and assessment of element intake by humans eating fruiting bodies. *Food Additives and Contaminants: Part A*, 2012, 29:951–961.
- Falandysz, J., H. Bona, D. Danisiewicz, Silver content of wild-grown mushrooms from Northern Poland. *Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und Forschung*, 1994, 199:222–224.
- Falandysz, J., J. Zhang, YZ. Wang, M. Saba, G. Krasińska, A. Wiejak, T. Li, Evaluation of Mercury Contamination in Fungi Boletus Species from Latosols, Lateritic Red Earths, and Red and Yellow Earths in the Circum-Pacific Mercuriferous Belt of Southwestern China. *Plos One*, 2015, 10:e0143608.
- Falandysz, J., M. Gučia, Bioconcentration factors of mercury by Parasol Mushroom (*Macrolepiota procera*). *Environmental Geochemistry and Health*, 2008, 30:121–125.
- Falandysz, J., Selenium in Edible Mushrooms. *Journal of Environmental Science and Health, Part C*, 2008, 26:256–299.
- Falandysz, J., T. Kunito, R. Kubota, L. Bielawski, A. Frankowska, JJ. Falandysz, S. Tanabe, Multivariate characterization of elements accumulated in King Bolete *Boletus edulis* mushroom at lowland and high mountain regions. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, 2008, 43:1692–1699.
- FAO/WHO– Food and Agriculture Organization of the United Nations/ World Health Organization, Human Vitamin and Mineral Requirements, FAO Rome, 2001.
- Fardet, A., E. Rock, C. Révész. Is the in vitro antioxidant potential of whole-grain cereals and cereal products well reflected in vivo? *Journal of Cereal Science*. 2008, 48:258–276.
- Ferreira, I., L. Barros, R. Abreu. Antioxidants in wild mushrooms. *Current Medicinal Chemistry*, 2009, 16:1543–60.
- Focht, I., Ključ za gljive, ITRO „Naprijed”; Zagreb, 1986.
- Francišković, M., Fitohemijaska karakterizacija i biološka aktivnost odabranih vrsta *Tribusa urticae* i *parietariae* (Urticaceae Juss.), Univerzitet Novi Sad, 2015.
- Gan, CH., AB. Nurul, R. Asmah, Antioxidant analysis of different types of edible mushrooms (*Agaricus bisporous*). *International Food Research Journal*, 2013, 3:1095–1102.
- Gąsecka, M., M. Mleczek, M. Siwulski, P. Niedzielski, L. Kozak, The effect of selenium on phenolics and flavonoids in selected edible white rot fungi. *LWT - Food Science and Technology*, 2015, 63:726–731.
- Gąsecka, M., M. Mleczek, M. Siwulski, P. Niedzielski, Phenolic composition and antioxidant properties of *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus eryngii* enriched with selenium and zinc. *European Food Research and Technology*, 2015, 242:723–732.

- Gast, CH., E. Jansen, J. Bierling, L. Haanstra, Heavy metals in mushrooms and their relationship with soji characteristics. *Chemosphere*, 1988, 17:789–799.
- Gencelep, H., Y. Uzun, Y. Tunçturk, K. Demirel, Determination of mineral contents of wild-grow edible mushrooms. *Food Chemistry*, 2009, 113:1033–1036.
- Giannaccini, G., L. Betti, L. Palego, G. Mascia, L. Schmid, M. Lanza, A. Mela, L. Fabbrini, L. Biondi, A. Lucacchini, The trace element content of top-soil and wild edible mushroom samples collected in Tuscany, Italy. *Environmental Monitoring and Assessment*, 2012, 184:7579–7585.
- Glasl, H., Zur Photometrie in der Drogenstandardisierung. 3. Gehaltsbestimmung von Gerbstoffdrogen. *Deutsche Apotheker-Zeitung*, 1983, 123:1979–1983.
- Goli, M. AH., Barzegar, MA. Sahari, Antioxidant activity and total phenolic compounds of pistachio (*Pistachia vera*) hull extracts. *Food Chemistry*, 2005, 92:521–525.
- Golubkina, NA., VE. Mironov, Element composition of mushrooms in contrasting anthropogenic loading. *Geochemistry International*, 2018, 56:1263–1275.
- González-Palma, I., HB. Escalona-Buendía, E. Ponce-Alquicira, M. Téllez-Téllez, VK. Gupta, G. Díaz-Godínez, J. Soriano-Santos, Evaluation of the Antioxidant Activity of Aqueous and Methanol Extracts of *Pleurotus ostreatus* in Different Growth Stages. *Frontiers in Microbiology*, 2016, 7:1099.
- Gordon, B., Manganese nutrition of glyphosate-resistant and conventional soybeans. *Better Crops*, 2007, 91:12–13.
- Hadžić, I., Drugi gljivarski korak, Prosveta, 2002.
- Haghi, G., A. Hatami, Simultaneous quantification of flavonoids and phenolic acids in plant materials by a newly developed isocratic high-performance liquid chromatography approach. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2010, 58:10812–10816.
- Halpern, GM., Healing Mushrooms: Effective Treatments for Today's Illnesses, Square One, 2007.
- Heleno, SA., L. Barros, A. Martins, MJ. Queiroz, C. Santos-Buelga, IC. Ferreira. Fruiting body spores and *in vitro* produced mycelium of *Ganoderma lucidum* from Northeast Portugal: A comparative study of the antioxidant potential of phenolic and polysaccharidic extracts. *Food Research International*, 2012, 46:135–140.
- Heleno, SA., L. Barros, MJ. Sousa, A. Martins, C. Santos-Buelga, IC. Ferreira. Targeted metabolites analysis in wild *Boletus* species. *LWT—Food Science and Technology*, 2011, 44:1343–1348.
- Heleno, SA., L. Barros, A. Martins, MJRP. Queiroz, C. Santos-Buelga, ICFR. Ferreira, Phenolic, Polysaccharidic, and Lipidic Fractions of Mushrooms from Northeastern Portugal: Chemical Compounds with Antioxidant Properties. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 2012, 60:4634–4640.
- Hill, SJ., Inductively Coupled Plasma Spectrometry and its Applications, 2nd edition, Blackwell Publishing Ltd., 2007.

Horowitz, CT., HH. Schock, LA. Horowitz-Kisimova, The content of scandium, thorium, silver, and other trace elements in different plant species, *Plant Soil*, 1974, 40:397–403.

<http://gorila.jutarnji.hr/vijestigorila/zivot/svastara/siljatonogi-vrganj-vrganj-koji-dobro-podnosi-susna-razdoblja/>

<http://www.boletus.hr/prikaz.asp?slovo=Leccinum+aurantiacum+%28Bull%29+SF+Gray>

http://www.gljivarsko-drustvo.org.rs/index.php?option=com_content&task=view&id=33&Itemid=51

http://www.gljive.com.hr/gljive/Boletus_rhodoxanthus.html

<http://www.matf.bg.ac.rs/p/files/69-pca.html> link za citiranje

<https://gdnovisad.weebly.com/zascaronti263ene-i-retke-gljive-srbije>

<https://prepoznavanje-gljiva.blogspot.com/2018/01/skerletni-vrganj.html>

<https://www.plantea.com.hr/pravi-vrganj/>

IARC (International Agency for Research on Cancer), Beryllium, cadmium, mercury, and exposures in the glass manufacturing industry. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, 1993, 58:119–237.

International Mycological Association, Myco Bank. Russulaceae Lotsy, Truffe, 2:708, 1907.

Jakovetić Tanasković, S., Enzimaska proizvodnja estara fenolnih kiselina, Univerzitet Beograd, 2016.

JECFA, 2010. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, Seventy-second Meeting. Rome, 16–25 February 2010. Summary and Conclusions. JECFA/72/SC. Food and Agriculture Organization of the United Nations World Health Organization. Issued 16th March 2010.

Jedidi, IK., IK. Ayoub, T. Philippe, N. Bouzouita, Chemical composition and nutritional value of three Tunisian wild edible mushrooms. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 2017, 11:2069–2075.

Kabata-Pendias, A., Trace Elements in Soils and Plants, CRC Press by Taylor and Francis Group, LLC, 2011.

Kainama, H., S. Fatmawati, M. Santoso, PM. Papilaya, T. Ersam, The Relationship of Free Radical Scavenging and Total Phenolic and Flavonoid Contents of *Garcinia lasoar* PAM. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 2020, 53:1151–1157.

Kaiser, HF., The Application of Electronic Computers to Factor Analysis. *Educational and Psychological Measurement*, 1960, 20:141–151.

Kalač, P., 2001, Review of edible mushroom radioactivity. *Food Chemistry*, 75:29–35.

Kalač, P., Chemical composition and nutritional value of European species of wild growing mushrooms: a review. *Food Chemistry*, 2009, 113:9–16.

Kalač, P., J. Burda, I. Stašková, Concentrations of lead, cadmium, mercury and copper in mushrooms in the vicinity of a lead smelter. *The Science of the Total Environment*, 1991, 105:109–119.

- Kalač, P., J. Burda, I. Staskova, Concentrations of lead, cadmium, mercury and copper in mushrooms in the vicinity of a lead smelter. *Science of the Total Environment*, 1991, 105:109–111.
- Kalač, P., L. Svoboda, A review of trace element concentrations in edible mushrooms, *Food Chemistry*, 2000, 69:273–281.
- Kalač, P., Mineral Composition and Radioactivity of Edible Mushrooms, 1st edition, Academic Press. 2019.
- Kalač, P., Trace element contents in European species of wild growing edible mushrooms: a review for the period 2000–2009. *Food Chemistry*, 2010, 122:2–15.
- Kaneda, I., F. Kubo, H. Sakurai Antioxidative compounds in the extracts of black rice brans. *Journal of Health Sciences*, 2006, 52:495–511.
- Kayano, SI., H. Kikuzaki, N. Fukutsuka, T. Mitani, N. Nakatani, Antioxidant activity of prune (*Prunus domestica* L.) constituents and a new synergist. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2002, 50:3708–3712.
- Keller, G., Statistics for Management and Economics, 10 th Edition, Cengage Learning, USA, 3–4, 2014.
- Kim, DO., KW. Lee, HJ. Lee, CY. Lee, Vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of phenolic phytochemicals, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2002, 50:3713–3717.
- Kim, DO., OK. Chum, YJ Kim, HY Moon, CY Lee, Quantification of polyphenolics and their antioxidant capacity in fresh plums. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2003, 51:6509–6515.
- Kim, DO., SW. Jeong, CY. Lee. Antioxidant capacity of phenolic phytochemicals from various cultivators of plums. *Food Chemistry*, 2003, 81:321–326.
- Kirk, PM., Species Fungorum, 2014.
- Kondratyuk, TP., JM. Pezzuto. Natural Product Polyphenols of Relevance to Human Health, *Pharmaceutical Biology*, 2004, 42:46–63.
- Kosanić, M., B. Ranković, M. Dašić, Mushrooms as Possible Antioxidant and Antimicrobial Agents. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 2012, 11:1095–1102.
- Kostyuk, VA., AI. Potapovich, EN. Vladykovskaya, LG. Korkina, IBA. Afanas'ev, Influence of metal ions on flavonoid protection against asbestos-induced cell injury. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2001, 385:129–137.
- Krimer Malešević, V., Fenolni potencijal uljanih pogača, Univerzitet Novi SAD, 2016.
- Kumar, S., AK. Pandey, Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview, *The Scientific World Journal*, 2013, 2013:10.1155/2013/162750.
- Lachman, J., D. Miholová, V. Pivec1, K. Jírů, D. Janovská, Content of phenolic antioxidants and selenium in grain of einkorn (*Triticum monococcum*), emmer (*Triticum dicoccum*) and spring wheat (*Triticum aestivum*) varieties, *Plant, Soil and Environment*, 2011, 57:235–243.
- Lanjwani, MF., FA. Channa, Minerals content in different types of local and branded honey in Sindh, Pakistan. *Heliyon*, 2019, 5:E02042.

- Lebel, T., CW. Dunk, TW. May, Rediscovery of *Multifurca stenophylla* (Berk.) T. Lebel, C.W. Dunk & T.W. May comb. nov. (Russulaceae) from Australia, *Mycological Progress*, 2013, 12:497–504.
- Lepšová, A., R. Král, Lead and cadmium in fruiting bodies of macrofungi in the vicinity of a lead smelter. *The Science of the Total Environment*, 1988, 76:129–138.
- Li, Z., Z. Li, Y. Huang, Y. Jiang, Y. Liu, W. Wen, H. Li, J. Shao, C. Wang, Antioxidant Capacity, Metal Contents, and Their Health Risk Assessment of Tartary Buckwheat Teas. *ACS Omega*, 2020, 5:9724–9732.
- Lillo, C., US. Lea, P. Ruoff, Nutrient depletion as a key factor for manipulating gene expression and product formation in different branches of the flavonoid pathway. *Plant Cell Environment*, 2007, 31:587–601.
- Lindsay, S., J. Barnes, High performance liquid chromatography. 2nd edition. John Wiley and Sons, West Sussex, UK, 1992, 1–5.
- Little, CA., FW. Whicker, TF. Winsor, Plutonium in a grassland ecosystem at Rocky Flats, *Journal of Environmental Quality*, 1980, 9:350.
- Lobo, V., A. Patil, A. Phatak, N. Chandra, Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health, *Pharmacognosy Reviews*, 2010, 4:118–126.
- Lyons, GH., GJ. Judson, I. Ortiz-Monasterio, Y. Genc, JCR. Stangoulis, RD. Graham, Selenium in Australia: Selenium status and biofortification of wheat for better health. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 2005, 19:75–82.
- MacDonald-Wicks, LK., LG. Wood, ML. Garg, Methodology for the determination of biological antioxidant capacity in vitro: a review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2006, 86: 2046–2056.
- Malešević, VK., Fenolni potencijal uljanih pogača, Univerzitet Novi Sad, 2016.
- Martyn, CN., DJP. Barker, C. Osmond, EC. Harris, JA. Edwardson, RF. Lacey. Geographical relation between Alzheimer's disease and aluminium in drinking water. *The Lancet*, 1989 1:59–62.
- Mattila, P., K. Könkö, M. Euvola, J. Pihlava, J. Astola, L. Vahteristo, V. Hietaniemi, J. Kumpulainen, M. Valtonen, V. Piironen, Contents of vitamins, mineral elements and some phenolic compound in cultivated mushrooms, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2001, 49:2343–2348.
- Michelot, D., E. Siobud, JC. Dore, C. Viel, F. Poirier, Update on metal content profiles in mushrooms-toxicological implications and tentative approach to the mechanisms of bioaccumulation. *Toxicon*, 1998, 36:1997–2012.
- Milovanović, G., Hromatografske metode odvajanja, PMF Univerziteta u Beogradu i Jugoslovenski zavod za produktivnost rada i informacione sisteme, Beograd, 1985.
- Mironczuk-Chodakowska, I., K. Socha, AM. Witkowska, ME. Zujko, MH. Borawska, Cadmium and lead in wild edible mushrooms from the Eastern region of Poland's 'Green Lungs'. *Polish Journal of Environmental Studies*, 2013, 22:1759–1765.
- Mitić, MN., JM. Souquet, MV. Obradović SS. Mitić, Phytochemical profiles and antioxidant activities of Serbian table and wine grapes. *Food Science and Biotechnology*, 2012, 21:1619–1626.

- Mleczek, M., M. Siwulski, K. Stuper-Szablewska, K. Sobieralski, Z. Magdziak, P. Golinski, Accumulation of elements by edible mushroom species. II. A comparison of aluminium, barium and nutritional element contents. *Journal of Environmental Science and Health B*, 2013, 48:308–317.
- Mleczek, M., M. Siwulski, Z. Kaczmarek, I. Rissmann, K. Sobieralski, P. Golinski, Concentration of selected trace elements in *Xerocomus badius* mushroom bodies. A health risk for humans?. *Acta Scientiarum Polonorum, Technologia Alimentaria*, 2013, 12:331–343.
- Mleczek, M., Z. Magdziak, P. Goliński, M. Siwulski, K. Stuper-Szablewska, Concentrations of minerals in selected edible mushroom species growing in Poland and their effect on human health, *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*, 2013, 12:203–214.
- Molyneux, P., The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity, *Songklanakarinn Journal of Science and Technology*, 2004, 26:211–219.
- Morello, MJ., F. Shahidi, CT. Ho, Free Radicals in Foods: Chemistry, Nutrition, and Health Effects, Poglavlje 1: Free Radicals in Foods: Chemistry, Nutrition, and Health Effects, American Chemical Society, 2002.
- Moridani, MY., J. Pourahmad, H. Bui, A. Siraki, PJ. O'Brien, Dietary flavonoid iron complexes as cytoprotective superoxide radical scavengers. *Free Radical Biology and Medicine*, 2003, 34:243–253.
- Mrmošanin, J., Analiza katehina, procijanidina, makro i mikroelemenata u crnoj, mlečnoj, i beloj čokoladi i kakaou u prahu i njihov antioksidativni potencijal, Univerzitet Niš, 2019.
- Natella, F., M. Nardini, M. Di Felice, C. Scaccini, Benzoic and Cinnamic Acid Derivatives as Antioxidants: Structure–Activity Relation. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 1999, 47:1453–1459.
- Nenadis, N., HY. Zhang, MZ. Tsimidou, Structure-antioxidant activity relationship of ferulic acid derivatives: effect of carbon side chain characteristic groups. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2003, 51:1874–1879.
- Nikolić, J., Optimizacija postupaka pripreme uzoraka zemljišta za kvantitativnu analizu policikličnih aromatičnih ugljovodonika primenom metode gasna hromatografijamasena spektrometrija, Univerzitet Niš, 2018.
- Novaković, A., Biopotencijal autohtonih gljiva u funkciji nutraceutika, Univerzitet Novi Sad, 2015.
- Nuorteva, P., Metal Distribution Patterns and Forest Decline. Seeking Achilles' Heels for Metals in Finnish Forest biocenoses, University of Helsinki, 1990.
- Otto, M., Chemometrics Statistics and Computer Application in Analytical Chemistry. Wiley-VCH, Weinheim, Germany, 1999.
- Oyaizu, M., Study on the browning substance for antioxidation of the glucosamine browning substance, Studies on products of browning reaction prepared from glucosamine. *Japanese Journal of Nutrition*, 1986, 44:307–315.
- Ozen, T., C. Darcan, O. Aktop, I. Turkecul, Screening of Antioxidant, Antimicrobial Activities and Chemical Contents of Edible Mushrooms Wildly Grown in the Black Sea Region

- of Turkey. *Combinatorial Chemistry and High Throughput Screening*, 2011, 14: 10.2174/138620711794474079
- Özyürek, M., K. Güçlü, E. Tütem, K. Sözgen Başkan, E. Erçağ, SE. Çelik, S. Baki, L. Yıldız, Ş. Karamanc, R. Apak, A comprehensive review of CUPRAC methodology, *Analytical Methods*, 2011, 3:2439–2453.
- Özyürek, M., K. Güçlü, R. Apak, The main and modified CUPRAC methods of antioxidant (activity) measurement. *Trends in Analytical Chemistry*, 2011, 30:652–664.
- Pandey, KB., SI. Rizvi, Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2009, 2:270–278.
- Pastor, K., Autentičnost cerealija i pseudocerealija – razvoj novih metoda analize brašna i gotovih pekarskih proizvoda, Univerzitet Novi Sad, 2018.
- Pavón, JMC., AG. Torres, FS. Rojas, CB. Ojeda, EV. Alonso, Handbook of Mineral Elements in Food, Edit by M. Guardia, S. Garrigues, Poglavlje 6: The toxic elements, 2015.
- Pelkonen, R., G. Alfthan, O. Järvinen, Element Concentrations in Wild Edible Mushrooms in Finland, The Finnish Environment, 2008.
- Pereira, DM., P. Valentão, JA. Pereira, PA. Andrade, Phenolics: From Chemistry to Biology. *Molecules*, 2009, 14:2202–2211.
- Pérez-Jiménez, J., F. Saura-Calixto, Effect of solvent and certain food constituents on different antioxidant capacity assays. *Food Research International*, 2006, 39:791–800.
- Petkovsek, AAS., B. Pokorny, Lead and cadmium in mushrooms from the vicinity of two large emission sources in Slovenia. *Science of the Total Environment*, 2013, 443:944–954.
- Plum, LM., L. Rink, H. Haase, The essential toxin: Impact of zinc on human health. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2010, 7:1342–1365.
- Pragasam, SJ., V. Venkatesan, M. Rasool, Immunomodulatory and anti-inflammatory effect of *p*-coumaric acid, a common dietary polyphenol on experimental inflammation in rats, *Inflammation*, 2013, 36:169–176.
- Prasad, AS., B. Bao, FWJ. Beck, O. Kucuk, FH. Sarkar, Antioxidant effect of zinc in humans. *Free Radical Biology and Medicine*, 2004, 37:1182–1190.
- Pravilnik o maksimalno dozvoljenim količinama ostataka sredstava za zaštitu bilja u hrani i hrani za životinje za koju se utvrđuju maksimalno dozvoljene količine ostataka sredstava za zaštitu bilja, Službeni glasnik Republike Srbije, 29/2014.
- Prior, RL., X. Wu, K. Schaich, Standard methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2005, 53:4290–4302.
- Pulido, R., L. Bravo, F. Saura-Calixto, Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing antioxidant power assay, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2000, 48:3396–3402.
- Puttaraju, NG., SU. Venkateshaiah, SM. Dharmesh, SM. Urs, R. Somasundaram. Antioxidant activity of indigenous edible mushrooms. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 2006, 54:9764–9772.

- Pyrzyska, K., A. Pekal, Application of free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) to estimate the antioxidant capacity of food samples, *Analytical Methods*, 2013, 5:4288–4295.
- Quinche, JP., Phosphorus and heavy metals in some species of fungi. *Revue Suisse d'Agriculture*, 1997, 29:151–156.
- Rahman, K., Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors, *Clinical interventions in aging*, 2007, 2:219–236.
- Rasheeda, K., H. Bharathy, N. Nishad Fathima, Vanillic acid and syringic acid: Exceptionally robust aromatic moieties for inhibiting in vitro self-assembly of type I collagen. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018, 113:952–960.
- Re, R., N. Pellegrini, A. Proreggente, A. Pannala, M. Yang, Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay, *Free Radical Biology and Medicine*, 1999, 26:1231–1237.
- Reisa, SF., DK. Raib, N. Abu-Ghannam, Water at room temperature as a solvent for the extraction of apple pomace phenolic compounds. *Food Chemistry*, 2012, 135:1991–1998.
- Rouessac, G., A. Rouessac, Chemical Analysis, 2nd edition, John Wiley & Sons, Ltd., 2007.
- Rudawska, M., T. Leski, Macro- and microelement contents in fruiting bodies of wild mushrooms from the Notecka forest in west-central Poland. *Food Chemistry*, 2005, 92:499–506.
- Radojičić, Z., N. Vuković, Vukmirović, D. Određivanje "Zone osetljivosti". SymOpIs '01. 2001.
- Samsonowicz, M., E. Regulsk, Evaluation of influence of selected metal cations on antioxidant activity of extracts from savory (*Satureja hortensis*), *Chemical Papers*, 2016. 70:811–819.
- Santos, MCP., ÉCBA. Gonçalves, Effect of different extracting solvents on antioxidant activity and phenolic compounds of a fruit and vegetable residue flour. *Scientia Agropecuaria*, 2016, 17:10.17268/sci.agropecu.2016.01.01.
- Sarikurkcü, C., B. Tepe, M. Yamac, Evaluation of the antioxidant activity of four edible mushrooms from the Central Anatolia, Eskisehir – Turkey: *Lactarius deterrimus*, *Suillus collitinus*, *Boletus edulis*, *Xerocomus chrysenteron*. *Bioresource Technology*, 2008, 99:6651–6655.
- Sarikurkcü, C., B. Tepe, MS. Kocak, MC. Uren, Metal concentration and antioxidant activity of edible mushrooms from Turkey. *Food Chemistry*, 2018, 175:549–555.
- Sarikurkcü, C., M. Copur, D. Yildiz, I. Akata, Metal concentration of wild edible mushrooms in Soguksu National Park. Turkey. *Food Chemistry*, 2011, 128:731–734.
- Saxena, M., J. Saxena, A. Pradhan, Flavonoids and phenolic acids as antioxidants in plants and human health, *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 2012, 16:130–134.
- Seeger, R., Content of potassium in higher fungi. *Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und Forschung*, 1978, 167:2331.

- Seeger, R., W. Huttner, Calcium in mushrooms. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau*, 1981, 77:385–392.
- Sesli, E., M. Tüzen, Levels of trace elements in the fruiting bodies of macrofungi growing in the East Black Sea region of Turkey. *Food Chemistry*, 1999, 65:453–460.
- Shahidi, F., Y. Zhong, Measurement of antioxidant activity, *Journal of Functional Foods*, 2015, 18:757–781.
- Sharififar, F., G. Dehghn-Nudeh, and M. Mirtajaldini, Major flavonoids with antioxidant activity from *Teucrium polium* L., *Food Chemistry*, 2009, 112:885–888.
- Shi, H., N. Noguchi, E. Niki, Antioxidants in food, edit by J. Pokorny, N. Yanishlieva, M. Gordon, Poglavlje 3: Natural antioxidants, Woodhead Publishing, 2001, 147–155.
- Silva, B., P. Faustino, An overview of molecular basis of iron metabolism regulation and the associated pathologies. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 2015, 1852:1347–1359.
- Singer, R., The Agaricales in Modern Taxonomy, Koeltz Scientific Books, 1986.
- Singleton, VL., R. Orthofer, RM. Lamuela-Raventós, Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, 1999, 299:152–178.
- Skoog, DA., JJ. Leary, Principles of instrumental analysis. 4th edition. Saunder college publishing, Florida, USA, 1992, 628-669.
- Slekovec, M., KJ. Irgolic, Uptake of arsenic by mushrooms from soil, *Chemical Speciation and Bioavailability*, 1996, 8:67–73.
- Smolskaitė, L., P. Rimantas Venskutonis, T. Talou, Comprehensive evaluation of antioxidant and antimicrobial properties of different mushroom species. *LWT- Food Science and Technology*, 2015, 60:462–471.
- Snyder, LR., JW. Dolan, Initial experiments in high-performance liquid chromatographic method development I. Use of a starting gradient run. *Journal of Chromatography A*, 1996, 721:3–14.
- Spears, JW., WP. Weiss Role of antioxidants and trace elements in health and immunity of transition dairy cows. *Veterinary Journal*, 2008, 176:70–76.
- Stefanovic, V., Određivanje sadržaja makroelemenata i mikroelemenata u uzorcima pečurke *macrolepiota procera* i zemljišnim supstratima iz rasinskog okruga, Univerzitet Beograd, 2016.
- Svoboda, L., K. Zimmermannová, P. Kalač, Concentrations of mercury, cadmium, lead and copper in fruiting bodies of edible mushrooms in an emission area of a copper smelter and a mercury smelter. *Science of the Total Environment*, 2000, 1:61–67.
- Szymczycha-Madeja, A., M. Welna, P. Pohl, Elemental analysis of teas and their infusions by spectrometric methods. *Trends in Analytical Chemistry*, 2012. 35:165–181.
- Tamuly, C., B. Saikia, M. Hazarika, J. Bora, MJ. Bordoloi, OP. Sahu, Correlation Between Phenolic, Flavonoid, and Mineral Contents With Antioxidant Activity of Underutilized Vegetables. *International Journal of Vegetable Science*, 2013, 19:34–44.

- Tanida, I., Y. Shirasago, R. Suzuki, R. Abe, T. Wakita, K. Hanada, M. Fukasawa, Inhibitory effects of caffeic acid, a coffee-related organic acid, on the propagation of Hepatitis C Virus, *Japanese Journal of Infectious Diseases*, 2015, 68:268–275.
- Taofiq, O., RC.Calhelha, S. Heleno, L. Barros, A. Martins, C. Santos-Buelga, MJ RP. Queiroz, ICFR. Ferreira, The contribution of phenolic acids to the anti-inflammatory activity of mushrooms: Screening in phenolic extracts, individual parent molecules and synthesized glucuronated and methylated derivatives. *Food Research International*, 2015, 79:821–827.
- Tewari, RK., P.Kumar, N. Sharma, Magnesium deficiency induced oxidative stress and antioxidant responses in mulberry plants. *Scientia Horticulturae*, 2006, 108:7–14.
- Thomas, R., Practical guide to ICP-MS, a tutorial for beginners, 2nd edition. Practical spectroscopy series volume 37. CRC Press, Taylor and Francis group, 2008.
- Todorović, M., P. Đurđević, V. Antonijević, Optičke metode instrumentalne analize, Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu, Beograd, 1997.
- Trachootham, D., W. Lu, MA. Ogasawara, N. Rivera-Del Valle, P. Huang, Redox Regulation of Cell Survival, *Antioxidants and Redox Signaling*, 2008, 10:1343–1374.
- Turfan, N., A. Peksen, B. Kibar, S. Unal, Determination of nutritional and bioactive properties in some selected wild growing and cultivated mushrooms from Turkey. *Acta Scientiarum Polonorum Hortorum Cultus*, 2018, 17:57–72.
- Turkekul, I., M. Elmastas, M. Tuzen, Determination of iron, copper, manganese, zinc, lead, and cadmium in mushroom samples from Tokat, Turkey. *Food Chemistry*, 2004, 84:389–392.
- Tüzen, M., M. Özdemir, A. Demirbaş, Study of heavy metals in some cultivated and uncultivated mushrooms of Turkish origin. *Food Chemistry*, 1998, 63:247–251.
- Tyler G., Accumulation and exclusion of metals in *Collybia peronata* and *Amanita rubescens*. *Transactions of the British Mycological Society*, 1982, 79:239–245.
- U.S. National Academies, Institute of Medicine, Dietary reference intakes for vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium, and zinc. The National Academies Press, Washington, USA, 2001.
- Valko, M., M. Izakovic, M. Mazur, CJ. Rhodes, J. Telser, Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence, *Molecular and Cellular Biochemistry*, 2004, 266:37–56.
- Vetter, J., Chromium and nickel, contents of some common edible mushroom species, *n Acta Alimentaria*, 1997, 26:163-170.
- Victor, V., M. Rocha, M. De la Fuente, Immune cells: free radicals and antioxidants in sepsis, *International Immunopharmacology*, 2004, 4:327–347.
- Vidović, S., Ekstrakcija, sastav, delovanje i moguće primene odabranih vrsta pečuraka, Univerzitet Novi Sad, 2011.
- Vunduk, J., Hemijska karakterizacija i biološka svojstva polisaharidnih ekstrakata gljiva *Fomes fomentarius*, *Auricularia auricula-judae* i *Sparassis crispa*, Univerzitet Beograd, 2017.

- Wang, X., H. Liu, T. Li, Y. Wang, Evaluation of heavy metal concentrations of edible wild-grown mushrooms from China. *Journal of Environmental Science and Health B*, 2017, 52:178–183.
- Wangensteen, H., AB. Samuelsen, KE. Malterud, Antioxidant activity in extracts from coriander. *Food Chemistry*, 2004, 88:293–297.
- World Health Organization, Food and Agricultural Organization of the United Nations, Vitamin and mineral requirements in human nutrition, 2004.
- Wright, JS., ER. Johnson, GA. DiLabio, Predicting the activity of phenolic antioxidants: Theoretical method, analysis of substituent effects, and application to major families of antioxidants, *Journal of the American Chemical Society*, 2001, 123:1173–1183.
- Wuana, AR., FE. Okieimen, Heavy metals in contaminated soils: a review of sources, chemistry, risks and best available strategies for remediation, *International Scholarly Research Network: Ecology*, 2011, 2011:1–20.
- Yağız, D., M. Konuk, A. Afyon, SM. Kök, Minor element and heavy metal content of edible wild mushrooms native to bolu, north-west turkey. *Fresenius Environmental Bulletin*, 2008, 17:249–252.
- Yamaç, M., D.Yıldız, C. Sarıkürkcü, M. Çelikkollu, MH.Solak, Heavy metals in some edible mushrooms from the Central Anatolia, Turkey. *Food Chemistry*, 2007, 103:263–267.
- Zang, LY., G. Cosma, H. Gardner, X. Shi, V. Castranova, V. Vallyathan, Effect of antioxidant protection by *p*-coumaric acid on low-density lipoprotein cholesterol oxidation, *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 2000, 279:C954–960.
- Zeng, H., GFJr. Combs, Selenium as an anticancer nutrient:roles in cell proliferation and tumor cell invasion. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 2008, 19:1–7.
- Zhang, D., A. Frankowska, G. Jarzynska, AK. Kojta, M. Drewnowska, D. Wydmanska, L. Bielawski, J. Wang, J. Falandysz, Metals of King Bolete (*Boletus edulis*) Bull.:Fr. collected at the same site over two years. *African Journal of Agricultural Research*, 2010, 5:3050–3055.
- Zhishen, J., T. Mengcheng, W. Jianming. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry*, 1999, 64:555–559.
- Zimmermanova, K., L. Svoboda, P. Kalač, Mercury, cadmium, lead and copper contents in fruiting bodies of selected edible mushrooms in contaminated middle Spiš region, Slovakia. *Ekologia (Bratislava)*, 2001, 20:440–446.

Biografija sa bibliografijom

Marija V. Dimitrijević, rođena 22.04.1988. u Nišu. Osnovnu školu „Kole Rašić” i gimnaziju „Svetozar Marković” završila je u Nišu, sa odličnim uspehom.

Osnovne akademske studije na Departmanu za hemiju upisala je školske 2007/08. god. na Prirodno-matematičkom fakultetu Univerziteta u Nišu. Studije je završila školske 2009/10. god. sa prosečnom ocenom 9,17. Kao student osnovnih studija bila je korisnik studentske stipendije Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja.

Master studije primenjene hemije na Prirodno-matematičkom fakultetu Univerziteta u Nišu upisala je školske 2010/11 god. i završila u predviđenom roku sa prosečnom ocenom 10,00. 3.10.2012. god. odbranila master rad na temu „Uticaj požara na antioksidativne karakteristike biljke *Seseli rigidum* Waldst&Kit” sa ocenom 10. Za vreme trajanja master studija bila je stipendista Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.

Doktorske akademske studije na Departmanu za hemiju Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Nišu upisala je školske 2012/13. god. i položila sve planom i programom predviđene ispite sa prosečnom ocenom 10,00.

Kao stipendista Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja priključena je projektu OI 172051 „Razvoj i poboljšanje postojećih elektrohemijskih, spektroskopskih i protočnih (FIA) metoda za praćenje kvaliteta životne sredine”, od 2013. god. do kraja 2016. godine. U tom periodu imala je zvanje istraživač-pripravnik. Od 2017.-2019. god. je bila angažovana na projektu OI 172047 „Prirodni proizvodi biljaka i lišajeva: izolovanje, identifikacija, biološka aktivnost i primena” kao istraživač-saradnik. Od januara 2020. god. do 31.01.2021. godine angažovana je na Prirodno-matematičkom fakultetu u Nišu kao istraživač-saradnik na osnovu ugovora o finansiranju naučnoistraživačkog rada NIO, broj 451-03-9/2021-14/200124.

Februara 2021. godine je zasnovala radni odnos na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Nišu kao asistent za užu naučnu oblast Opšta i neorganska hemija.

Kao student doktorskih studija bila je angažovana u svojstvu saradnika za izvođenje vežbi i aktivno učestvovala u aktivnostima promocije Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Nišu.

Dobitnica je povelje Prirodno-matematičkog fakulteta kao najcitiraniji autor, student doktorskih studija u 2019. godini.

Dobitnica je povelje Prirodno-matematičkog fakulteta kao autor, student doktorskih studija sa najviše objavljenih radova u 2018. godini.

Poster na Konferenciji „1st FoodEnTwin Workshop Food and Environmental-Omics“, Beograd, Srbija, 20- 21. jun, 2019. god. je proglašen za najbolji.

Publikovala je 33 radova *in extenso*, od toga 24 u naučnim časopisima međunarodnog značaja, citiranim u Science Citation Index (SCI) bazi podataka, a 9 radova je objavila u naučnim časopisima nacionalnog značaja. Sa 17 saopštenja učestvovala je u radu međunarodnih i nacionalnih naučnih skupova. Radovi su, prema podacima koje je moguće dobiti sa indeksne baze SCOPUS, do sada citirani 142 puta (bez autocitata).

Radovi objavljeni u naučnim časopisima međunarodnog značaja

M21 – rad u vrhunskom međunarodnom časopisu

1. DL. Miladinović, **M. Dimitrijević**, TM. Mihajilov-Krstev, MS. Marković, VM. Ćirić. The significance of minor components on the antibacterial activity of essential oil via chemometrics. *LWT – Journal of Food Science and Technology*, 2021, 136:110305.
2. V. Mitić, V. Stankov-Jovanović, **M. Dimitrijević**, J. Cvetković, S. Simonović, S. Nikolić Mandić, Chemometric analysis of antioxidant activity and anthocyanin content of selected wild and cultivated small fruit from Serbia, *Fruits*, 2014, 69 (5), 413–422.
3. V. Mitić, M. Ilić, **M. Dimitrijević**, J. Cvetković, S. Ćirić, V. Stankov-Jovanović, Chemometric characterization of peach, nectarine and plum cultivars according to fruit phenolic content and antioxidant activity, *Fruits*, 2016, 71 (1), 57–66.

M22 – rad u istaknutom međunarodnom časopisu

1. BD. Kocić, DM. Stanković Đorđević, **MV. Dimitrijević**, MS. Marković, DL. Miladinović. Potentially Effective and Safe Anti-Helicobacter pylori Natural Products: Chemometric Study. *Revista de Chimie* 2020, 71 (6):267–273.
2. **M. Dimitrijević**, V. Mitić, J. Nikolic, A. Djordjevic, J. Mutic, V. Stankov Jovanovic, G. Stojanovic, First Report about Mineral Content, Fatty Acids Composition and Biological Activities of Four Wild Edible Mushrooms, *Chemistry and Biodiversity*, 2019, 16 (2): e1800492.
3. **M. Dimitrijević**, V. Mitić, O. Jovanović, V. Stankov-Jovanović, J. Nikolić, G. Petrović, G. Stojanović, Comparative Study of Fatty Acids Profile in Eleven Wild Mushrooms of Boletacea and Russulaceae Families, *Chemistry and Biodiversity*, 2018, 15 (1): e1700434.
4. V. Mitić, M. Ilić, V. Stankov-Jovanović, G. Stojanović, **M. Dimitrijević**, Essential oil composition of *Erica spiculifolia* Salisb - first report, *Natural Product Research*, 2018, 32 (2), 222–224.
5. J. Cvetković, V. Mitić, V. Stankov-Jovanović, **M. Dimitrijević**, G. Petrović, S. Nikolić Mandić, G. Stojanović, Optimization of the QuEChERS extraction procedure for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil by gas chromatography-mass spectrometry, *Analytical Methods*, 2016, 8 (7), 1711–1720.
6. **M. Dimitrijević**, V. Mitić, J. Cvetković, V. Stankov-Jovanović, J. Mutić, S. Nikolić Mandić, Update on element content profiles in eleven wild edible mushrooms from family Boletacea, *European Food And Research Technology*, 2016, 242 (1), 1–10.

7. **M. Dimitrijević**, V. Stankov-Jovanović, J. Cvetković, T. Mihajilov-Krstev, G. Stojanović, V. Mitić, Screening of antioxidant, antimicrobial and antiradical activities of twelve selected Serbian wild mushrooms, *Analytical Methods*, 2015, 7 (10), 4181–4191.

M23 – rad u međunarodnom časopisu

1. **M. Dimitrijević**, V. Mitić, D. Đorđević, G. Popović, N. Krstić, J. Nikolić, V. Stankov Jovanović, Macroelements versus toxic elements in selected wild edible mushrooms of the Russulacea family from Serbia, *Journal of the Serbian Chemical Society*, 2021, <https://doi.org/10.2298/JSC210410038D>.
2. B. Kocić, **M. Dimitrijević**, Lj. Miladinović, M. Marković, G. Ranković, and D. Miladinović, *In Vitro* Anti-*Helicobacter pylori* Activity of Berberine and Barberry Extracts: A Preliminary Report, *Natural Product Communications*, 2019, 14 (6).
3. **M. Dimitrijević**, V. Mitić, G. Ranković, D. Miladinović, Survey of Antioxidant Properties of Barberry: A Chemical and Chemometric Approach, *Analytical Letters*, 2019, 53 (2), 671–682.
4. J. Nikolic, V. Mitic, V. Stankov Jovanovic, **M. Dimitrijevic**, G. Stojanovic, Chemometric characterization of twenty three culinary herbs and spices according to antioxidant activity, *Journal of Food Measurement and Characterization*, 2019, 13 (3), 2167–2176.
5. J. Nikolić, V. Mitić, V. Stankov-Jovanović, **M. Dimitrijević**, M. Ilić, S. Simonović, G. Stojanović, Novel Sorbent and Solvent Combination for QuEChERS Soil Sample Preparation for the Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Gas Chromatography–Mass Spectrometry, *Analytical Letters*, 2018, 51 (7) 1087–1107.
6. V. Mitić, **M. Dimitrijević**, J. Pavlović, J. Nikolić, S. Simonović, V. Stankov-Jovanović, G. Stojanović, Comprehensive Evaluation of Antioxidant Activity of *Ribes berry* Fruit Species: A Chemometric Approach, *Analytical Letters*, 2018, 51 (6), 908–920.
7. V. Stankov-Jovanović, V. Mitić, S. Ćirić, M. Ilić, J. Nikolic, **M. Dimitrijević**, G. Stojanović, Optimized Ultrasonic Extraction for the Determination of Polyaromatic Hydrocarbons by Gas Chromatography–Mass Spectrometry, *Analytical Letters*, 2017, 50 (15), 2491–2504.
8. J. Nikolić, V. Stankov-Jovanović, **M. Dimitrijević**, D. Cvetković, L. Stanojević, L. Nikolić, V. Mitić, Dispersive solid-phase extraction clean up combined with Soxhlet extraction for the determination of 16 PAHs in soil samples by GC-MS, *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 2017, 97 (2), 112–123.
9. **M. Dimitrijević**, V. Stankov-Jovanović, J. Cvetković, M. Mitić, G. Petrović, A. Đorđević, V. Mitić, Phenolics, Antioxidant Potentials, and Antimicrobial Activities of Six Wild Boletaceae Mushrooms, *Analytical Letters*, 2017, 50 (10), 1691–1709.
10. V. Mitić, J. Cvetković, V. Stankov-Jovanović, **M. Dimitrijević**, G. Stojanović, Characterization of Pepper Genotypes from Serbia as a Function of Maturity by Antioxidant Activity with Chemometric Analysis, *Analytical Letters*, 2016, 49 (14), 2234–2245.

11. J. Cvetković, V. Mitić, V. Stankov-Jovanović, **M. Dimitrijević**, S. Nikolić Mandić, Elemental Composition of Wild Edible Mushrooms from Serbia, *Analytical Letters*, 2015, 48 (13), 2107–2121.
12. V. Mitić, V. Stankov-Jovanović, S. Tošić, A. Pavlović, J. Cvetković, **M. Dimitrijević**, S. Nikolić Mandić, Chemometric approach to evaluate heavy metals' content in *Daucus carota* from different localities in Serbia, *Hemijska Industrija*, 2015, 69 (6), 643–650.
13. V. Mitić, V. Stankov-Jovanović, J. Cvetković, **M. Dimitrijević**, M. Ilić, S. Nikolić Mandić, Application of multivariate statistical approach to identify element sources in parsley (*Petroselinum crispum*), *Toxicological And Environmental Chemistry*, 2015, 97 (6), 754–765.
14. V. Mitić, V. Stankov-Jovanović, M. Ilić, J. Cvetković, **M. Dimitrijević**, G. Stojanović, In vitro Antioxidant Activity of Methanol Extract of *Allium scorodoprasum*, *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 2014, 20, 1130–1136.

Radovi objavljeni u časopisima van SCI liste

M53-rad u nacionalnom časopisu

1. **M. Dimitrijević**, D. Miladinović, S. Ćirić, N. Krstić, J. Nikolić, V. Mitić, V. Stankov Jovanović, Elemental and morphological features of thermally modified clinoptilolite as an efficient sorbent for benzo(a)pyrene extraction from water preceding GC -MS analysis, *Chemia Naissensis*, 2020, 3(2), 1-23.
2. J. Nikolić, V. Mitić, **M. Dimitrijević**, M. Ilić, S. Ćirić, V. Stankov Jovanović, Mineral composition of soil from urban area of Niš – chemometric approach, *Chemia Naissensis*, 2019, 2 (1), 114–133.
3. S. Ćirić, V. Mitić, J. Nikolić, M. Ilić, **M. Dimitrijević**, S. Simonović, V. Stankov Jovanović, Recent developments in sorbent based water samples treatments prior GC-MS analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons, *Chemia Naissensis*, 2018, 1 (1), 93–123.
4. **M. Dimitrijević**, V. Mitić, V. Stankov-Jovanović, J. Nikolić, G. Stojanović, Comprehensive evaluation of antioxidant activity of six wild edible mushroom species, *Advanced technologies*, 2016, 5 (2), 53–59.
5. J. Cvetković, V. Mitić, V. Stankov-Jovanović, **M. Dimitrijević**, G. Stojanović, The evaluation of different sorbents and solvent mixtures in PAH sample preparation for GC/GC-ms analysis, *Advanced technologies*, 2016, 5 (1), 31–38.
6. M. Ilic, V. Stankov Jovanovic, V. Mitic, **M. Dimitrijevic**, J. Cvetkovic, S. Tosic, Toxic metals content and safe use of *Seseli pallasii* herb, *Safety Engineering*, 2016, 6 (1), 1– 5.
7. J. Cvetković, **M. Dimitrijević**, V. Stankov-Jovanović, V. Mitić, Analiza policikličnih aromatičnih ugljovodonika u hrani i uzorcima iz životne sredine, *Hemijski pregled*, 2013, 54 (6), 153–160.
8. **M. Dimitrijević**, J. Cvetković, V. Stankov-Jovanović, V. Mitić, In vitro metode određivanja antioksidativnih osobina u uzorcima hrane, *Hemijski pregled*, 2014, 55 (1), 7–13.

9. V. Mitić, V. Stankov-Jovanović, **M. Dimitrijević**, J. Cvetković, G. Petrović, G. Stojanović, Chemometric Analysis of Chlorophyll a, b and Carotenoid Content in Green Leafy Vegetables, *Biologica Nyssana*, 2013, 4 (1-2), 49–55.

Radovi objavljeni u zbornicima međunarodnih naučnih skupova

M33-saopštenje sa međunarodnog skupa štampano u celini

1. J. Nikolić, V. Mitić, **M. Dimitrijević**, S. Ćirić, M. Ilić, G. Stojanović, V. Stankov Jovanović, Određivanje sadržaja teških metala u uzorcima zemljišta sa teritorije grada Niša – hemometrijski pristup, 2019, XXIV Savetovanje o biotehnologiji, Čačak, Srbija, Zbornik radova, 337–343.
2. **M. Dimitrijević**, V. Mitić, J. Nikolić, M. Ilić, S. Ćirić, G. Stojanović, V. Stankov Jovanović, Bioakumulacija teških metala u odabranim vrstama gljiva, 2019, XXIV Savetovanje o biotehnologiji, Čačak, Srbija, Zbornik radova, 377–382.

M34 – saopštenje sa međunarodnog skupa štampano u izvodu

1. **M. Dimitrijević**, V. Mitić, J. Nikolić, S. Ćirić, J. Mutić, V. Stankov Jovanović, Accumulation of Cadmium in Selected Species of Mushrooms from Southeastern Serbia, 1 st FoodEnTwin Workshop Food and Environmental –Omics, Beograd, Srbija, 20-21. jun, 2019, Zbornik apstrakata, 39.
2. J. Nikolić, S. Ćirić, **M. Dimitrijević**, S. Jovanović, V. Mitić, G. Stojanović, V. Stankov Jovanović, Optimization of the coffee samples preparations for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons by gas chromatography – mass spectrometry, 1 st FoodEnTwin Workshop Food and Environmental –Omics, Beograd, Srbija, 20-21. jun, 2019, Zbornik apstrakata, 37.
3. V. Mitić, **M. Dimitrijević**, J. Nikolić, S. Ćirić, J. Mutić, V. Stankov Jovanović, ICP-MS assessment of essential and toxic metals/elements levels in wild edible mushroom species *Butyriboletus regius* and *Butyriboletus fechtneri*, 1 st FoodEnTwin Workshop Food and Environmental –Omics, Beograd, Srbija, 20-21. jun, 2019, Zbornik apstrakata, 38.
4. **M. Dimitrijević**, V. Mitić, J. Nikolić, S. Ćirić, G. Stojanović, Content of lead in selected species of mushrooms from Southeastern Serbia, 13. Simpozijum o flori jugoistočne Srbije i susednih regiona, Stara planina, Srbija, 20–23. jun, 2019, Zbornik apstrakata, 89–90.
5. V. Mitić, V. Stankov Jovanović, J. Nikolić, **M. Dimitrijević**, I. Zlatanović, G. Stojanović, Heavy metals in *Morchella esculenta* mushrooms from Serbia, 13. Simpozijum o flori jugoistočne Srbije i susednih regiona, Stara planina, Srbija, 20–23. jun, 2019, Zbornik apstrakata, 149.
6. M. Ilić, M. Marković, V. Mitić, **M. Dimitrijević**, G. Stojanović, V. Stankov Jovanović, *Sideritis montana* L.: Antioxidant properties of extracts of different polarity, 13. Simpozijum o flori jugoistočne Srbije i susednih regiona, Stara planina, Srbija, 20–23. jun, 2019, Zbornik apstrakata, 168.
7. **M. Dimitrijević**, V. Mitić, M. Mitić, V. Stankov-Jovanović, J. Cvetković, G. Stojanović, *Boletus impolitus* as a natural source of phenolic acids and antioxidants, 12. Simpozijum o flori jugoistočne Srbije i susednih regiona, Kopaonik, Srbija, 16–19. jun, 2016, Zbornik apstrakata, 106–107.

8. **M. Dimitrijević**, V. Mitić, V. Stankov-Jovanović, J. Cvetković, A. Đorđević, G. Stojanović, ICP-MS assessment of toxic elements in *Lactarius volemus*, collected from Southeastern Serbia, 12. Simpozijum o flori jugoistočne Srbije i susednih regiona, Kopaonik, Srbija, 16–19. jun, 2016, Zbornik apstrakata, 107–108.
9. M. Ilić, S. Simonović, J. Cvetković, **M. Dimitrijević**, V. Mitić, V. Stankov-Jovanović, G. Stojanović, Essential oil composition of *Laserpitium latifolium* L., Congress of Chemists and Chemical Engineers of Bosnia and Herzegovina with international participation, Sarajevo, 10–12. oktobar, 2014. PP-BC-04 Bulletin of the Chemists and Technologists of Bosnia and Herzegovina, 124.
10. J. Cvetković, **M. Dimitrijević**, M. Ilić, S. Simonović, V. Stankov-Jovanović, V. Mitić, G. Stojanović, Antioxidant Activity of *Achillea clypeolata* Sm, Congress of Chemists and Chemical Engineers of Bosnia and Herzegovina with international participation, Sarajevo, 10–2. oktobar, 2014. PP-BC-04 Bulletin of the Chemists and Technologists of Bosnia and Herzegovina, 99.
11. **M. Dimitrijević**, J. Cvetković, M. Ilić, S. Simonović, V. Stankov-Jovanović, V. Mitić, S. Nikolić Mandić, Content of As, Cd, Pb and Sn in parsley (*Petroselinum crispum*) from different districts in Serbia, Congress of Chemists and Chemical Engineers of Bosnia and Herzegovina with international participation, Sarajevo, 10–12. oktobar, 2014. PP-AEC-19 Bulletin of the Chemists and Technologists of Bosnia and Herzegovina, 45.
12. J. Cvetković, **M. Dimitrijević**, M. Ilić, V. Mitić, V. Stankov-Jovanović, G. Petrović, Antioksidaciona aktivnost metanolnih ekstrakata maline, kupine, višnje i ribizle. 10. Simpozijum o flori jugoistočne Srbije i susednih regiona, Vlasina, Srbija, 17–20. jun, 2010, Zbornik apstrakata, 92.
13. **M. Dimitrijević**, J. Cvetković, V. Mitić, M. Marković, M. Ilić, V. Stankov Jovanović, Antioksidativne osobine nekih biljnih vrsta sa požarišta na planini Vidlič, 10. Simpozijum o flori jugoistočne Srbije i susednih regiona, Vlasina, Srbija, 17–20. jun, 2010, Zbornik apstrakata, 93.

M64 Radovi na skupovima nacionalnog značaja štampani u izvodu

1. J. Cvetković, **M. Dimitrijević**, V. Mitić, V. Stankov-Jovanović, M. Ilić, G. Petrović, G. Stojanović, Uticaj termičke obrade na sadržaj pigmenata u zelenom lisnatom povrću, 11. Simpozijum o flori jugoistočne Srbije i susednih regiona, Vlasina, Srbija, 17–20. jun, 2013, Zbornik apstrakata, 92–93.
2. **M. Dimitrijević**, J. Cvetković, V. Mitić, V. Stankov-Jovanović, M. Ilić, S. Simonović, G. Stojanović, Korelacija različitih metoda za određivanje antioksidacione aktivnosti odabranih vrsta voća, 11. Simpozijum o flori jugoistočne Srbije i susednih regiona, Vlasina, Srbija, 17–20. jun, 2013, Zbornik apstrakata, 99–100.

Udžbenici, monografije, praktikumi i zbirke zadataka

1. S. Mitić, I. Rašić Mišić, R. Micić, **M. Dimitrijević**, Semimikro kvalitativna hemijska analiza, pomoćni udžbenik – praktikum, Prirodno–matematički fakultet, Univerzitet u Nišu, 2017.(odlukom NN veća, br. 398/2-01, datum 26.04.2017.) ISBN 978-86-6275-071.

ИЗЈАВА О АУТОРСТВУ

Изјављујем да је докторска дисертација, под насловом

Компаративно истраживање садржаја елемената и антиоксидативне активности одабраних врста гљива: хеометријски приступ

која је одбрањена на Природно - математичком факултету Универзитета у Нишу:

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да ову дисертацију, ни у целини, нити у деловима, нисам пријављивао/ла на другим факултетима, нити универзитетима;
- да нисам повредио/ла ауторска права, нити злоупотребио/ла интелектуалну својину других лица.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци, који су у вези са ауторством и добијањем академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада, и то у каталогу Библиотеке, Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Нишу, као и у публикацијама Универзитета у Нишу.

У Нишу, 14.6.2021.

Потпис аутора дисертације:

М. Димитријевић
(Марија В. Димитријевић)

**ИЗЈАВА О ИСТОВЕТНОСТИ ЕЛЕКТРОНСКОГ И ШТАМПАНОГ ОБЛИКА
ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

Наслов дисертације:

**Компаративно истраживање садржаја елемената и антиоксидативне
активности одабраних врста гљива: хеометријски приступ**

Изјављујем да је електронски облик моје докторске дисертације, коју сам предао/ла за уношење у **Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу**, истоветан штампаном облику.

У Нишу, 14.6.2021.

Потпис аутора дисертације:

M. Dimitrijević
(Марија В. Димитријевић)

ИЗЈАВА О КОРИШЋЕЊУ

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Никола Тесла“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу унесе моју докторску дисертацију, под насловом:

Компаративно истраживање садржаја елемената и антиоксидативне активности одабраних врста гљива: хеометријски приступ

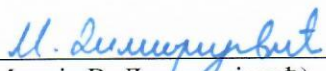
Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском облику, погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију, унету у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу, могу користити сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons), за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прераде (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

У Нишу, 14.6.2021.

Потпис аутора дисертације:


(Марија В. Димитријевић)