

BIOAKTIVNOST ACETONSKIH EKSTRAKATA VRSTA *HERICIUM CLATHROIDES* I *AURICULARIA MESAENTERICA*

Marijana Kosanić¹, Aleksandra Vesić¹, Nevena Petrović¹

Izvod: *Hericum clathroides* i *Auricularia mesenterica* predstavljaju nedovoljno istražene vrste gljiva iz podrazdela Basidiomycotina. U ovom radu ispitana je bioaktivnost njihovih acetonskih ekstrakata. Determinisane su antimikrobna i antioksidativna aktivnost ekstrakata *in vitro*, kao i ukupni sadržaj fenola i flavonoida u njima. Naši rezultati pokazuju da testirane vrste gljiva poseduju relativno dobra antimikrobna i antioksidativna svojstva, što otvara put daljim istraživanjima i potencijalnoj primeni ovih vrsta u biomedicinske svrhe.

Ključne reči: acetonski ekstrakti, antimikrobno, antioksidativno, bioaktivnost, gljive

Uvod

Plodonosna tela gljiva odlikuju se visokim sadržajem proteina, značajnim procentom ugljenih hidrata i relativno niskim sadržajem lipida. Sadržaj proteina u sirovim plodonosnim telima gljiva obično je nezatno niži od onog u mesu, a daleko viši od onog u povrću i mleku. Proteini makromiceta su više nutritivne vrednosti, nego proteini biljaka. Ugljeni hidrati makromiceta predstavljani su monosaharidima, disaharidima, alkoholnim šećerima, šećernim kiselinama, polisaharidima i dr. (Kalač, 2013). Lipidi makromiceta sačinjeni su od visokog udela nutritivno poželjnih, nezasićenih masnih kiselina, koje mogu činiti i do 72% njihovog ukupnog sadržaja. Plodonosna tela gljiva bogata su i mineralima i vitaminima, od kojih su najviše zastupljeni vitamini B kompleksa (Mattila et al, 2001). Pored svojih nutritivnih svojstava, makromicete predstavljaju i značajne izvore korisnih bioaktivnih supstanci, koje pozitivno utiču na zdravlje. Bioaktivni molekuli, prisutni u gljivama, su polisaharidi velike molekulske mase, polisaharidno-proteinski kompleksi, glikoproteini, imunomodulatorni proteini, triterpenoidi, antioksidativne komponente, određeni mikroelementi i druge specifične komponente gljiva. Gljive se uspešno koriste u prevenciji, ali i u tretmanu nekih bolesti. Danas je poznato preko 2000 vrsta gljiva, koje ispoljavaju različita farmakološka svojstva, kao što su antimikrobno, imunomodulatorno, antioksidativno, antikancerogeno, neuroprotektivno, hepatoprotektivno i dr. (Kosanić et al, 2013).

U ovom radu ćemo prikazati antimikrobno i antioksidativno delovanje, kao i ukupni sadržaj fenola i flavonoida acetonskih ekstrakata vrste bukova brada *Hericum clathroides* (Pall.) Pers. i vrste mrežasta uška *Auricularia mesenterica* (Dicks.) Pers.

¹Univerzitet u Kragujevcu, Prirodno-matematički fakultet, Radoja Domanovića 12, 34 000 Kragujevac, Srbija (nevena.n.petrovic@pmf.kg.ac.rs)

Materijal i metode rada

Priprema ekstrakata

Uzorci vrste *H. clathroides* sakupljeni su 2020. godine na Južnom Kučaju, dok su uzorci vrste *A. mesenterica* sakupljeni 2019. godine u Batočini. Pri identifikaciji vrsta korišćena je standardna literatura (Hagara, 2014). Od osušenih i samlevenih uzoraka napravljeni su acetonski ekstrakti. Za potrebe dobijanja rastvora različitih koncentracija ekstrakata korišćen je rastvarač dimetil sulfoksid (5% DMSO).

Antimikrobna aktivnost

Ispitivanje antimikrobne aktivnosti ekstrakata odabranih vrsta makromiceta rađeno je na tri vrste bakterija i deset vrsta gljiva (tabela 1). Testirane bakterije i gljive potiču iz Američke kolekcije uzoraka kultura (ATCC). Antimikrobna aktivnost ekstrakata testirana je određivanjem minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) korišćenjem mikrodilucione metode (Sarker et al, 2007). Antibiotik streptomycin korišćen je kao pozitivna kontrola za inhibiciju rasta bakterija, a antimikotik ketokonazol za inhibiciju rasta gljiva.

Antioksidativna aktivnost

DPPH test

DPPH test je iskorišćen za određivanje sposobnosti ekstrakata da neutrališu stabilan, slobodni radikal DPPH (1,1 difenil-2-pikril-hidrazil) po metodi Dorman et al. (2004). Apsorbanca je izmerena na 517 nm, na spektrofotometru ("Jenway" UK). Askorbinska kiselina je korišćena kao pozitivna kontrola. Kapacitet neutralisanja slobodnih radikala izračunat je po sledećoj formuli:

Kapacitet neutralisanja DPPH radikala (%) = $[A_0 - A_1] / A_0 \times 100$,

gde je A_0 absorbanca negativne kontrole, a A_1 absorbanca reakcione smeše ili standarda.

Redukciona moć

Redukciona moć ekstrakata određena je po metodi Oyaizu (1986). Absorbanca je merena na 700 nm na spektrofotometru. Askorbinska kiselina je korišćena kao pozitivna kontrola.

Ukupni sadržaj fenola i flavonoida

Ukupni sadržaj fenola u ekstraktima određen je sa Folin-Ciocalteu reagensom po metodi Slinkard and Singleton (1997). Ukupan sadržaj fenolnih komponenti u ekstraktima izražen je u ekvivalentima pirokatehola ($\mu\text{g PE/mg}$ ekstrakta).

Određivanje ukupnog sadržaja flavonoida u ekstraktima rađeno je spektrofotometrijskom metodom sa aluminijum hloridom, stvaranjem kompleksa flavonoid-aluminijum (Meda et al, 2005). Sadržaj ukupnih flavonoida u ekstraktu izražen je u ekvivalentima rutina ($\mu\text{g RE/mg}$ ekstrakta).

Rezultati istraživanja i diskusija

Antimikrobna aktivnost

Tabela 1. Antimikrobna aktivnost ekstrakata *H. clathroides* i *A. mesenterica*
 Table 1. The antimicrobial activity of extracts of *H. clathroides* and *A. mesenterica*

Testirani organizmi Tested organisms	<i>H.</i> <i>clathroides</i>	<i>A.</i> <i>mesenterica</i>	Streptomicin /ketokonazol
	MIC (mg/ml)		
<i>P. mirabilis</i>	20	20	0,062
<i>E. coli</i>	20	20	0,062
<i>S. aureus</i>	5	10	0,031
<i>T. mentagrophytes</i>	5	1,25	0,078
<i>F. oxysporum</i>	1,25	2,5	0,078
<i>G. candidum</i>	10	5	0,078
<i>T. viride</i>	10	10	0,078
<i>C. cladosporioides</i>	10	2,5	0,039
<i>P. italicum</i>	5	5	0,156
<i>M.ucedo</i>	10	10	0,156
<i>A. flavus</i>	10	20	0,156
<i>A. niger</i>	20	5	0,078
<i>C. albicans</i>	10	10	0,039

Antibakterijska aktivnost ekstrakata kreće se u rasponu 5-20 mg/ml, dok je antifungalna u rasponu 1,25-20 mg/ml. Najniža MIC ekstrakta vrste *H. clathroides* izmerena je kod *F. oxysporum* (1,25 mg/ml), dok je najniža MIC ekstrakta *A. mesenterica* izmerena kod *T. mentagrophytes* (1,25 mg/ml). Antimikrobna aktivnost ispitivanih ekstrakata približno je slična, mada bi se moglo reći da je ekstrakt *H. clathroides* pokazao za nijansu bolju antibakterijsku aktivnost, a ekstrakt *A. mesenterica* blago bolju antifungalnu aktivnost. U poređenju sa ekstraktima drugih vrsta gljiva, antimikrobna aktivnost naših ispitivanih ekstrakata bi se mogla smatrati umereno dobrom, do relativno jakom. Na primer, MIC metanolnog ekstrakta vrste *Amanita rubescens* za *S. aureus* iznosio je 10 mg/ml, dok je za *C. albicans* bio 7.5 mg/ml (Martínez-Escobedo et al, 2021).

Antioksidativna aktivnost

DPPH test

Tabela 2. Procenat neutralisanja DPPH radikala od strane ekstrakata *H. clathroides* i *A. mesenterica*

Table 2. The percent of neutralisation of DPPH radicals by acetonc extracts of *H. clathroides* and *A. mesenterica*

Supstance	2000 µg/ml	1000 µg/ml	500 µg/ml	250 µg/ml	125 µg/ml
Substances	% neutralisanja DPPH radikala - % neutralisation of DPPH radical				
<i>H. clathroides</i>	/	/	1,53	2,56	3,28
<i>A. mesenterica</i>	12,88	12,58	10,43	6,85	3,58
Askorbinska kiselina (IC ₅₀)	6,42				

Acetonski ekstrakti ispitivanih vrsta gljiva pokazali su relativno umerenu sposobnost neutralisanja DPPH radikala (tabela 2). Acetonski ekstrakt *H. clathroides* nije pokazao aktivnost u koncentracijama većim od 500 mg/ml, dok je u manjim koncentracijama njegova aktivnost bila u rasponu 1,53-3,28%. Procenat neutralisanja DPPH radikala acetonskog ekstrakta *A. mesenterica* bio je u opsegu 3,58-12,88%. Ekstrakt vrste *A. mesenterica* pokazao je bolje delovanje od ekstrakta *H. clathroides*. Naši rezultati su u skladu sa rezultatima drugih istraživanja. Na primer, etanolni ekstrakt vrste *Pleurotus ostreatus* u koncentraciji 1 mg/ml neutralisao je 30,64% DPPH radikala, dok je etanolni ekstrakt vrste *Pleurotus sajor-caju* u istoj koncentraciji neutralisao 47,39% (Ahmad et al, 2014).

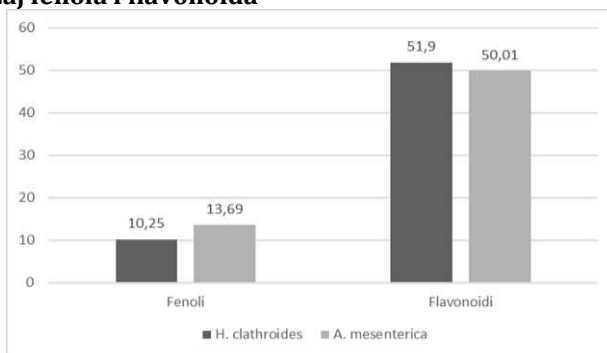
Redukciona moć ekstrakata

Tabela 3. Redukciona moć acetonskih ekstrakata *H. clathroides* i *A. mesenterica*
 Table 2. The reducing power of acetonc extracts of *H. clathroides* and *A. mesenterica*

Supstance Substances	Absorbanca (700 nm) Absorbance (700 nm)		
	1000 µg/ml	500 µg/ml	250 µg/ml
<i>C. clathroides</i>	0,101	0,063	0,042
<i>A. mesenterica</i>	0,201	0,109	0,072
Askorbinska kiselina	2,421	1,936	1,097

Redukciona moć ekstrakta *H. clathroides* je u opsegu 0,042–0,101, dok je redukcion kapacitet *A. mesenterica* u opsegu 0,072–0,201 (tabela 3). Apsorbanca ekstrakata rasla je sa porastom koncentracije ekstrakata, što pokazuje da su apsorbance zavisne od koncentracije. Ekstrakt vrste *A. mesenterica* pokazao je umereno bolji redukcion kapacitet od ekstrakta *H. clathroides*. U odnosu na druge vrste gljiva, naši ekstrakti su pokazali umerenu redukcionu moć. Na primer, metanolni ekstrakt vrste *Lactarius deliciosus* u koncentracijama 1,25, 2,5 i 5 mg/ml imao je apsorbance 0,28, 0,54 i 0,79 (Bozdoğan et al, 2018).

Ukupni sadržaj fenola i flavonoida



Graf. 1. Ukupni sadržaj fenola i flavonoida u ispitivanim ekstraktima
 Graph. 1. The total phenolic and flavonoid content in tested extracts

Sadržaj fenola i flavonoida u ispitivanim ekstraktima prikazan je na grafiku 1. Ekstrakt vrste *A. mesenterica* sadržao je više fenola od ekstrakta vrste *H. clathroides*, dok je sa flavonoidima bilo suprotno. Fenoli i flavonoidi su bioaktivna jedinjenja zaslužna za brojna biomedicinska svojstva pečuraka, ali se smatra da najveći doprinos imaju njihovom antioksidativnom delovanju (Palacios et al, 2011).

Zaključak

Testirani ekstrakti vrsta *H. clathroides* i *A. mesenterica* pokazali su relativno dobru antimikrobnu i antioksidativnu aktivnost. Neophodno je sprovesti detaljnija istraživanja, kako bi se upoznali mehanizmi svih aspekata njihovog bioaktivnog delovanja i kako bi se utvrdio njihov farmakološki potencijal.

Napomena

Istraživanja u ovom radu podržana su od strane Ministarstva za prosvetu, nauku i tehnološki razvoj (br. 451-03-9/2021-14/20012).

Literatura

- Ahmad N., Mahmood F., Khalil S. A., Zamir R., Fazal H., Abbasi, B. H. (2014). Antioxidant activity via DPPH, gram-positive and gram-negative antimicrobial potential in edible mushrooms. *Toxicology and Industrial Health*. 30(9): 826-834.
- Bozdoğan A., Ulukanlı Z., Bozok F., Eker T., Doğan H. H., Büyükalaca, S. (2018). Antioxidant potential of *Lactarius deliciosus* and *Pleurotus ostreatus* from Amanos Mountains. *Advancements in Life Sciences*. 5(3): 113-120.
- Dorman H., Bachmayer O., Kosar M., Hiltunen R. (2004). Antioxidant properties of aqueous extracts from selected Lamiaceae species grown in Turkey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(4): 762-770.
- Hagara L. (2014). *Ottova encyklopédia hùb*. Prague (Czech Republic): Europrint.
- Kalač P. (2013). A review of chemical composition and nutritional value of wild-growing and cultivated mushrooms. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 93(2): 209-218.
- Kosanic M., Rankovic B., Dasic M. (2013). Antioxidant and antimicrobial properties of mushrooms. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*. 19(5): 1040-1046.
- Martínez-Escobedo N. A., Vázquez-González F. J., Valero-Galván J., Álvarez-Parrilla E., Garza-Ocañas F., Najera-Medellin J. A., Quiñónez-Martínez M. (2021). Antimicrobial activity, phenolic compounds content, and antioxidant capacity of four edible macromycete fungi from Chihuahua, Mexico. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*. 24, 1-11.
- Mattila P., Könkö K., Eurola M., Pihlava J. M., Astola J., Vahteristo L., Hietaniemi V., Kumpulainen J., Valtanen M., Pironen V. (2001). Contents of vitamins, mineral elements and some phenolic compounds in cultivated mushrooms. *Journal Agricultural Food Chemistry*. 49(5): 2343-2348.

- Meda A, Lamien C. E, Romito M, Millogo J, Nacoulma O. G. (2005). Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in burkina fasan honey, as well as their radical scavenging activity. *Food Chemistry*. 91(3): 571–577.
- Oyaizu M. (1986). Studies on products of browning reaction prepared from glucoseamine. *The Japanese journal of nutrition and dietetics*. 44(6): 307-315.
- Palacios I, Lozano M., Moro C., D'arrigo M., Rostagno M. A., Martínez J. A., García-Lafuentea A. Guillamóna E., Villares A. (2011). Antioxidant properties of phenolic compounds occurring in edible mushrooms. *Food Chemistry*, 128(3), 674-678.
- Sarker S. D, Nahar L, Kumarasamy Y. (2007). Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the in vitro antibacterial screening of phytochemicals. *Methods*. (42): 321-324.
- Slinkard K., Singleton, V. L. (1977). Total phenol analysis: automation and comparison with manual methods. *American journal of enology and viticulture*. 28(1): 49-55.

THE BIOACTIVITY OF THE ACETONIC EXTRACTS OF *HERICIUM CLATHROIDES* AND *AURICULARIA MESENERICA*

Marijana Kosanić¹, Aleksandra Vesić¹, Nevena Petrović¹

Abstract. *Hericium clathroides* and *Auricularia mesenterica* present insufficiently studied species of fungi in the subphylum Basidiomycotina. In this manuscript we have explored the bioactivity of their acetonic extracts. We determined the antimicrobial and antioxidative activities *in vitro*, as well as the total phenolic and flavonoid content of extracts. Our results indicate that the tested species of fungi possess relatively good antimicrobial and antioxidative properties, which opens the way for further research and potential application of these species for biomedical purposes.

Key words: acetonic extracts, antimicrobial, antioxidative, bioactivity, fungi

¹University of Kragujevac, Faculty of Science, Radoja Domanovića 12, 34 000 Kragujevac, Serbia (nevena.n.petrovic@pmf.kg.ac.rs)