

## Određivanje antioksidativnih svojstava i ukupnih polifenola kod crnog letnjeg tartufa *Tuber aestivum*

*Metabolizam većine vrsta tartufa nije u potpunosti ispitan, tako da je cilj ovog rada bio da se odrede antioksidativna svojstva kod crnog letnjeg tartufa *Tuber aestivum*, kao i priroda molekula koji bi hipotetički mogli uticati na ova svojstva. Antioksidativna aktivnost merena je pomoću DPPH eseja i na osnovu izmerenih apsorbanaci reakcionih smeša, izračunat je procenat inhibicije, kao i koncentracija ukupnih polifenola. Pokazano je da ekstrakti tartufa imaju visok antioksidativni potencijal, a koncentracija polifenola je niža u odnosu na većinu komercijalnih pečuraka. Potrebno je nastaviti istraživanja u ovom pravcu jer je potrebno ispitati prirodu i ostalih molekula koji bi mogli imati potencijalno antioksidativno dejstvo kod ove vrste tartufa. Takođe, treba vršiti ispitivanja i na ostalim vrstama tartufa koje još nisu ispitane.*

### Uvod

Vrste roda *Tuber* su askomicete koje pripadaju grupi ektomikorizalnih gljiva Tuberales. Ove gljive rastu u simbozi sa velikim brojem vaskularnih biljnih vrsta. Vegetativni oblik tartufa je micelija koja se sastoji od hifa, a obrazuju podzemna plodonosna tela. Do sada je opisano više od 70 vrsta ovog roda u svetu, a u Evropi 32 vrste (Ceruti *et al.* 2003). Iako imaju veliku komercijalnu vrednost, sa obzirom da njihov metabolizam nije u potpunosti ispitan, još uvek ne postoji mogućnost masovnog uzganjanja. Letnji tartuf *Tuber aestivum* predstavlja široko rasprostranjenu i čestu vrstu tartufa, i najčešće uspeva u područjima sa kontinentalnom klimom (Riousset *et*

*al.* 2001). Kao i druge mikorizalne vrste, letnji tartuf najuspešnije raste u asocijaciji sa korenjem drveća domaćina kao što su *Quercus robur*, *Corylus avellana*, *Carpinus betulus*, *Fagus sylvatica* i *Tilia cordata* (Hilszczańska *et al.* 2008). Dosadašnja istraživanja na ovoj vrsti uglavnom se odnose na aromu (Bellina-Agostinone *et al.* 1987), miris (Culleré *et al.* 2010), varijabilnost jedarne i mitohondrijalne ribozomalne DNK (Guillemaud *et al.* 1996), broj hromozoma (Poma *et al.* 1998), metabolizam fosfata (Barry *et al.* 1995) i mutagene i antimutagene karakteristike (Fratianni *et al.* 2007).

Mnogi savremeni lekovi su bazirani na bioaktivnim komponentama izolovanim iz ekstraktata sporokarpa ili micelijuma gljiva. Pokazano je da određene vrste gljiva imaju visok antioksidativni potencijal: šitake gljive (Kitzberget *et al.* 2007), *Antrodia camphorata* (Hua-Ao *et al.* 2008), bukovača (Ferreira *et al.* 2009), što ih čini pogodnim suplementima u ishrani, jer zbog svojih antioksidativnih svojstava mogu biti korišćeni kao prevencija oštećenjima nastalim dejstvom slobodnih radikala.

Slobodni radikali su atomi ili molekuli koji u svojoj strukturi poseduju nesparene elektrone, što ih čini nestabilnim i jako reaktivnim. Zbog toga, jako često su toksični u živim sistemima i pretpostavlja se da oštećenja prouzrokovana slobodnim radikalima mogu dovesti do različitih bolesti, kao što su kancer, dijabetes, artritis, kardiološki i neurološki poremećaji, a povezuju se i sa procesom starenja. (Ferreira *et al.* 2009) Antioksidanti sprečavaju slobodne radikale da reaguju sa okolnim molekulima, i zbog toga su mnoga istraživanja posvećena vrstama koje imaju visok antioksidativni potencijal. Veliki značaj imaju namirnice sa visokim antioksidativnim potencijalom, jer je poznato da se antioksidanti u organizam moraju unositi i putem ishrane. Najpoznatiji i najzastupljeniji antioksidanti u hrani su vitamin C, tokoferoli, karotenoidi i polifenoli (Prior *et al.* 2005).

*Ivan Milenković (1993), Beograd, Koste Racina 22, učenik 2. razreda Četvrtе gimazije u Beogradu*

*MENTOR: Aleksandra Vančevska, Hemijski fakultet u Beogradu*

Polifenoli su velika i raznolika grupa sekundarnih biljnih metabolita koja se karakteriše prisustvom više fenolnih jezgara u jednom molekulu. Pokazano da polifenoli imaju snažnu antioksidativnu aktivnost (Yang *et al.* 2002). Do danas je poznato približno 8000 polifenolnih molekula, a najznačajniji su flavonoli, flavoni, flavan-3-oli, flavanoni i d-antocijani. Polifenoli su poznati kao dobri antioksidansi zbog velikog broja aromatičnih prstenova u svojoj strukturi, koji im daju mogućnost delokalizacije elektrona pri interakciji sa slobodnim radikalom. Poznato je da su prisutni u vinu, maslinovom ulju, čaju, kafi, kakau, kikirikiju i nekim vrstama gljiva (Arranz *et al.* 2009), kao i karotenoidi i tokoferoli, ali takva istraživanja još nisu vršena na tartufima (Ferreira *et al.* 2009)

**Cilj** rada je da se ispituju antioksidativna svojstva crnog letnjeg tartufa *Tuber aestivum*, kao i priroda molekula koji bi hipotetički mogli biti nosioci antioksidativnog potencijala kod ove vrste tartufa.

## Materijal i metode

Tartufi korišćeni u eksperimentu su vrste *T. aestivum*. Za pripremanje ekstrakata korišćen je 80% metanol. U eseju za antioksidativnu aktivnost korišćen je DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil.), u formi kristalnog praha, a za određivanje ukupne količine polifenola Folin-Ciocalteu-ov reagens i 7.5% natrijum karbonat (Sigma Chemical Co.)

**Priprema ekstrakata.** Sirovi ekstrakti mesa i kore tartufa pripremljeni su u 80% metanolu. Nakon uparavanja, napravljeni su rastvori koncentracija 50 mg/mL. Štok je za eksperiment razblažen do koncentracija od 25, 20, 10, 5, 2.5, 0.5, 0.25, 0.125 i 0.0625 mg/mL.

**DPPH esej za ispitivanje antioksidativne aktivnosti.** Svaka reakciona smeša je sadržala 2.9 mL rastvora DPPH (2.5 mg u 100 mL DPPH) i 100 µL ispitivane supstance određene koncentracije. Kao pozitivna kontrola korišćen je vitamin C u koncentracijama od 0.1, 0.05, 0.025 i 0.0125 mg/mL, u 80% metanolu. Negativna kontrola sadržala je samo metanol. Probe su urađene sa sve prethodno napravljene koncentracije ekstrakata. Za svaku reakcionu smešu urađeno je po pet ponavljanja. Uzorci su nakon dodavanja ispitivane supstance inkubirani na sobnoj temperaturi. Apsorbance reakcionih smeša dobijenih nakon inkubacije izmerene su na talasnoj dužini od 517 nm (Cintra 10 UV/VIS Spectrophotometer, GBC Spectral, Melbourne).

Procenat inhibicije hemolize računat je po formuli:

$$\text{Inhibicija (\%)} = \frac{A_c - A_e}{A_c} \cdot 100$$

gde je  $A_c$  – apsorbance negativne kontrole, a  $A_e$  – apsorbance uzorka koji sadrži ekstrakt

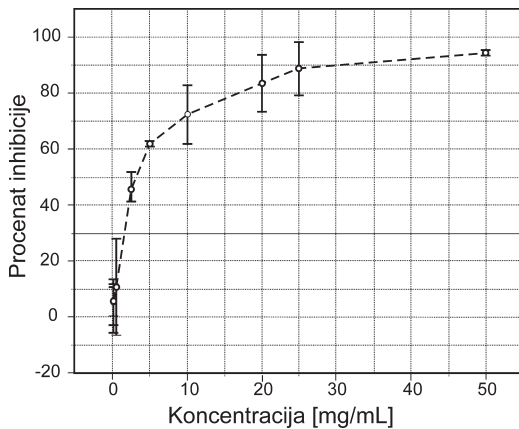
**Folin Ciocalteuov metod za određivanje ukupne koncentracije polifenola.** U 1 mL rastvora folina je dodato 200 µL rastvora tartufa i 200 µL različitih koncentracija rastvora kvarcetina. Nakon 15 minuta, dodato je 800 µL 7.5% svežeg rastvora natrijum karbonata. Inkubirano na sobnoj temperaturi tokom 2 sata. Voda korišćena kao slepa proba. Nakon inkubacije apsorbance reakcionih smeša je izmerena na talasnoj dužini od 740 nm. Na osnovu poznatih koncentracija kvarcetina napravljena je kalibraciona kriva i izračunata je količina polifenola koju sadrži ispitivani ekstrakt.

## Rezultati i diskusija

Sa obzirom da antioksidativna svojstva vrste *T. aestivum* nisu detaljno poznata, ispitano je procenat inhibicije oksidacije pri različitim koncentracijama ekstrakta tartufa. Metanoli ekstrakt tartufa pri najvišoj koncentraciji (50 mg/mL) pokazao je izraženu sposobnost inhibicije oksidacije, od 94.5%. Pri najnižoj koncentraciji (0.0625 mg/mL), procenat inhibicije je 3.14%.

Vitamin C, koji je korišćen kao pozitivna kontrola, je već pri vrlo niskim koncentracijama koje odgovaraju najvišim koncentracijama ekstrakta tartufa imao visok stepen inhibicije. Ovakva razlika je moguća posledica nepotpune ekstrakcije svih komponenti sa antioksidativnim potencijalom, ili je sam vitamin C mnogo potentniji inhibitor.

Merene su koncentracije ukupnih polifenola kod mesa i kore tartufa u odnosu na koncentraciju polifenola kod kvarcetina po Folin-Ciocalteu metodi. Dobijene vrednosti su: meso 0.069 mg/mL i kora 0.058 mg/mL za ekstrakte tartufa koncentracije 50 mg/mL. Time je dokazano da tartufi imaju nižu koncentraciju polifenola od većina komercijalnih gljiva (34.4 mg na 100g suve supstance, dok se u šampinjonima nalazi 45.6 mg na 100 g suve supstance) (Alvarez Parilla *et al.* 2007) i da je koncentracija polifenola u mesu i kori približno jednaka, ali zbog same strukture mesa i kore tartufa, nemoguće je sa podjednakom efikasnošću ekstrahovati sve polifenolne komponente



Slika 1. Procentat inhibicije u zavisnosti od koncentracije rastvora tartufa sa DPPH disruptivnim reagensom

Figure 1. The percentage of inhibition depending on the concentration of the truffle solution with DPPH disruptive reagent

## Zaključak

U ovom radu je dokazano da *T. aestivum* ima značajna antioksidativna svojstva, kao i visoku koncentraciju polifenola. Kako je poznato da polifenoli imaju singergetičko dejstvo sa drugim antioksidantima sa kojima interaguju (Perez-Jimenez 2010) potrebno je nastaviti istraživanje u ovom pravcu i ispitati koje komponente doprinose visokom antioksidativnom potencijalu kod ove vrste tartufa. Takođe, pored ove, i mnoge druge vrste tartufa se širom sveta koriste u ishrani, i ispitati i njihovu strukturu i komponente koje ih sačinjavaju.

**Zahvalnost.** Zahvaljujem se Vančevskoj jer je uvek bila tu da mi kaže „Piši“.

## Literatura

Alvarez Parilla E., Rosa L. A., Martínez N. R., González Aguilar G. A. 2007. Total phenols and antioxidant activity of commercial and wild mushrooms from Chihuahua, Mexico. *Cienc. Tecnol. Aliment.*, **5** (5): 329.

Arranz S., Saura-Calixto F., Shaha S., Kroon P. A. 2009. High contents of nonextractable polyphenols in fruits suggest that polyphenol contents of plant

foods have been underestimated. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **57**: 7298.

Barry D., Jaillard B., Staunton S., Callot G. 1995. Translocation and metabolism of phosphate following absorption by the ascocarps of *Tuber melanosporum* and *T. aestivum*. *Mycology Research*, **99**: 167.

Bellina-Agostinone C., D'Antonio M., Pacioni G. 1987. Odour composition of the summer truffle, *Tuber aestivum*. *Transactions of the British Mycological Society*, **88**: 568.

Ceruti A., Fontana A., Nosenzo C. 2003. *Le specie europee del genere. Una revisione storica*. Torino: Regione Piemonte

Culleré L., Ferreira V., Chevret B., Venturini M. E., Sánchez-Gimeno A. C., Blanco D. 2010. Characterisation of aroma active compounds in black truffles (*Tuber melanosporum*) and summer truffles (*Tuber aestivum*) by gas chromatography-olfactometry. *Food Chemistry*, **122**: 300.

Ferreira I. C. F. R., Barros L., Abreu R. M. V. 2009. Antioxidants in wild mushrooms. *Curr. Med. Chem.*, **16** (12): 1543.

Fratianni F., Di Luccia A., Coppola R., Nazzaro F. 2007. Mutagenic and antimutagenic properties of aqueous and ethanolic extracts from fresh and irradiated *Tuber aestivum* black truffle: A preliminary study. *Food Chemistry*, **102**: 471.

Guillemaud T., Raymond M., Callot G., Cleyet-Marel J.-C., Fernandez D. 1996. Variability of nuclear mitochondrial ribosomal DNA of a truffle species (*Tuber aestivum*). *Mycology Research*, **100**: 547.

Hilszczanska D., Sierota Z., Palenzona M. 2008. New *Tuber* species found in Poland. *Mycorrhiza*, **18**: 223.

Kitzberger C. S. G., Smania Jr A., Pedrosa R. C., Ferreira S. R. S. 2007. Antioxidant and antimicrobial activities of shiitake (*Lentinula edodes*) extracts obtained by organic solvents and superficial fluids. *Journal of Food Engineering*, **80**: 631.

Pérez-Jiménez J. 2010. Systematic Analysis of the Content of 502 Polyphenols in 452 Foods and Beverages: An Application of the Phenol-Explorer Database. *J. Agric. Food Chem.*, **58**: 4959.

Poma A., Pacioni G., Ranalli R., Miranda M. 1998. Ploidy and chromosomal number in *Tuber aestivum*. *FEMS, Microbiology Letters*, **167**: 101.

Prior R. L. 2005. Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. *J. Agric. Food Chem.*, **53**: 4290.

Riousset L., Riousset G., Chevalier G., Bardet M. C. 2001. *Truffes d'Europe et de Chine*. Paris: INRA

Yang J. H., Lin H. C., Mau J. L. 2002. Antioxidant properties of several commercial mushrooms. *Food Chemistry*, **77**: 229.

---

*Ivan Milenković*

### Antioxidative Properties and Total Polyphenolic Content in Black Summer Truffle *Tuber aestivum*

The aim of this research was to determine the antioxidative features of the black summer truffle *Tuber aestivum*, as well as the nature of the molecules which could potentially influence these features. Based on the measured absorbances of the reaction mixtures, the percent of inhibition was calculated, as well as the concentration of total polyphenols according to a calibration curve made with quercetin. It was proven that truffle extracts have a high antioxidative capacity, and the concentration of polyphenols is lower when compared to commercial mushrooms. It is important to continue further research in this direction because other molecules' nature in the structure of truffles should be examined as well. Further more, researches with other species of truffles which have not been examined yet should be done as well. 