

BIOLOGICAL FUNCTION OF CAROTENOIDS AND THEIR OCCURRENCE IN THE FRUITING BODIES OF MUSHROOMS

(Oryg. Karotenoidy rola biologiczna i występowanie w owocnikach grzybów)

MUSZYŃSKA Bożena, MASTEJ Małgorzata, SUŁKOWSKA – ZIAJA Katarzyna

Katedra i Zakład Botaniki Farmaceutycznej Uniwersytetu Jagiellońskiego, Collegium Medicum, ul. Medyczna 9, 30-688 Kraków

Abstract

Due to the valuable properties of carotenoids the interest in new methods of obtaining them is still increasing. For this purpose, since the 60s of the twentieth century, scientists conducted numerous studies to recognize the processes in which carotenoids could be produced.

Carotenoids, revealing a strong antioxidant activity, act as free radical scavengers. These compounds can support many beneficial processes such as the stimulation of the immune system, the modulation of intracellular signaling pathways, the regulation of the cell cycle and apoptosis as well as the regulation of growth factors.

*Carotenoids were determined by spectrophotometric analysis in the following fungal species: *Leucopaxillus giganteus*, *Sarcodon imbricatus*, *Lactarius piperatus*, *Lactarius deliciosus*, *Agaricus arvensis*, *Agaricus bisporus*, *Agaricus romagnesii*, *Agaricus silvaticus*, *Agaricus silvicola*, *Hypholoma fasciculare*, *Calocybe gambosa*, *Craterellus cornucopioides*, *Marasmius oreades*. High performance liquid chromatography (HPLC) coupled with a UV detector detected β , β -carotene in *Agaricus bisporus*, *Polyporus squamosus*, *Lepista nuda*, *Russula delicata*, *Verpa conica*, *Pleurotus ostreatus* and *Hypsizygus marmoreus*. β -carotene and lycopene were also found in three wild species of edible mushrooms: *Leucopaxillus giganteus*, *Sarcodon imbricatus* and *Agaricus arvensis*. These compounds were isolated in several species of the family *Cantharellus* as well. One example is *Cantharellus cibarius*, which contains mainly β , β -carotene and minor amounts of lycopene, α -carotene and other carotenoids, which may be δ - and γ - isomers.*

Key words: carotenoids, edible mushrooms, β , β -carotene, antioxidant activity

Corresponding author: Bożena Muszyńska e-mail: muchon@poczta.fm

Charakterystyka karotenoidów

Karotenoidy pod względem funkcjonalnym i strukturalnym stanowią zróżnicowaną grupę barwników naturalnych o charakterze polienów (mogą to być: węglowodory, alkohole, estry, ketony i kwasy) (1,2). Warunkiem występowania żółtej, pomarańczowej, bądź czerwonej barwy jest obecność w strukturze minimum 7 sprzężonych wiązań podwójnych. Związki o mniejszej ilości wiązań podwójnych w cząsteczce są bezbarwne (np. fitoen, czy fitofluen). Natomiast karotenoidy w połączeniu z odpowiednimi białkami, zwanymi karotenoproteinami, mogą przyjmować również inne zabarwienie (od niebieskiego do purpurowego, czy zielonego), jednakże tego typu kompleksy spotykane są głównie u bezkręgowców morskich (3,4). Związki te są wytwarzane w sposób naturalny przez rośliny,

niektóre bakterie i grzyby. W przeciwieństwie do roślin, zwierzęta nie potrafią samodzielnie syntetyzować karotenoidów na drodze procesów biochemicznych, natomiast muszą dostarczać je wraz z pokarmem. Zainteresowanie tą grupą barwników ma swoje początki w 1800 roku, kiedy zostały one wyodrębnione, oczyszczone, a następnie została ustalona ich struktura (5,6). Do tej pory udało się zidentyfikować i opisać ponad 700 karotenoidów, z czego ok. 50 jest w składzie codziennej diety człowieka, natomiast jedynie 20 można wykryć we krwi i tkankach człowieka. Karotenoidy stanowią, więc bardzo dużą grupę substancji o różnych cechach strukturalnych i działaniach biologicznych.

Główny trzon cząsteczki karotenoidów 40-węglowych terpenoidów (=tetraterpenów), stanowi osiem jednostek izoprenowych, które tworzą

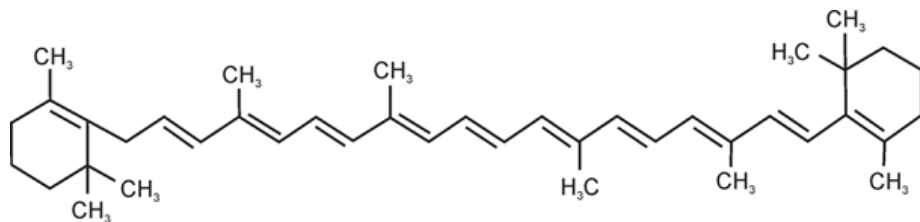
dwa pierścienie cykloheksylowe połączonych łańcuchem, w którym występuje układ sprzężonych wiązań podwójnych typu węgiel-węgiel (6). Struktura C40 obecna jest w większości związków z tej grupy, ale łatwo ulega modyfikacjom. Należą do nich zmiany w poziomie uwodornienia, izomeryzacji *cis-trans*-, cyklizacji przy jednym lub obydwu końcach łańcucha lub dodanie grup bocznych (często zawierających tlen), dzięki czemu mogą ulegać glikozylacji bądź acetylacji. Bardziej zaawansowane zmiany struktury są powiązane z wydłużeniem łańcucha węglowego, co może prowadzić do powstawania karotenoidów C50. Z kolei poprzez kondensację dwóch jednostek farnesylu mogą się tworzyć karotenoidy C30. Jedną z najbardziej charakterystycznych cech karotenoidów jest ich silne zabarwienie, co jest konsekwencją absorpcji światła o odpowiedniej długości fali, a wynikającą z obecności systemu sprzężonych wiązań podwójnych. Obecność sprzężonego łańcucha warunkuje właściwości i działanie karotenoidów (7). Związki te są nierozpuszczalne w wodzie, natomiast bardzo dobrze rozpuszczają się w tłuszczach, z którymi mogą tworzyć estry (4). Ze względu na różnice w budowie łańcucha poliizoprenoidowego karotenoidy można podzielić na dwie grupy. Pierwszą stanowią związki, których cząsteczki zawierają jedynie atomy węgla i wodoru, najczęściej są to bardziej stabilne termodynamicznie izomery *trans*. Zmiana izomerii (*cis-trans*) jest możliwa w podwyższonej temperaturze i/lub w obecności intensywnego promieniowania. Do tej grupy można również zaliczyć związki o krótszych łańcuchach węglowych, ale zawierające centralny fragment karotenu z czterema grupami metylowymi. Ze względu na taką budowę karotenoidy są substancjami mało polarnymi, które absorbują promieniowanie o długości fali: 400-650 nm. Związki należące do drugiej grupy określa się mianem ksantofili. Zawierają one przynajmniej

jeden atom tlenu w cząsteczce (np. w grupie hydroksylowej, karboksylowej, czy karbonylowej). Są to związki bardziej polarne absorbujące promieniowanie o mniejszych długościach fali niż większość karotenoidów (4). Karotenoidy, jako wysoce lipofilne cząsteczki są zwykle umieszczone w wewnętrznej błonie komórkowej. I tak np. związki takie jak β -karoten, czy likopen są umieszczone wyłącznie po wewnętrznej stronie podwójnej warstwy lipidowej (Ryc.1).

Wbudowanie karotenoidów w strukturę błon komórkowych modyfikuje właściwości błon takie jak: sztywność, wytrzymałość mechaniczna, grubość, płynność czy przepuszczalność warunkując ich prawidłowe funkcjonowanie. Karotenoidy mogą więc wpływać na transdukcję sygnału, czy inne powiązane z błoną komórkową procesy. Dalsze modyfikacje mogą skutkować znacznym zwiększeniem odporności błon na ROS (reaktywne formy tlenu), mając tym samym pozytywny wpływ na zdrowie człowieka (7).

Biosynteza karotenoidów

Ze względu na korzystne właściwości karotenoidów, ciągle wzrasta zainteresowanie metodami ich pozyskiwania i wzbogacania nimi produktów spożywczych. W tym celu już od lat 60. XX wieku naukowcy prowadzili liczne badania, aby poznać procesy, w których powstają karotenoidy (4). Wydajna synteza tych związków stała się możliwa dzięki wykorzystaniu drobnoustrojów do ich otrzymywania. Karotenoidy mogą być syntetyzowane przez różne grupy drobnoustrojów, jednak biorąc pod uwagę efektywność procesu oraz czynniki ekonomiczne najlepiej sprawdzają się grzyby z gatunku *Rhodotorula*. Nie bez znaczenia jest też możliwość ich hodowli na tanich i powszechnie dostępnych podłożach, takich jak: melasa, syrop glukozowy, ekstrakt sojowy, kukurydziany lub filtrat serwatki (2). Z licznych badań wynika, że zawartość oraz jakość



Ryc. 1. β -karoten

wyprodukowanych przez biomasę organizmów grzybowych związków karotenoidowych zależy od wielu czynników środowiskowych i genetycznych. O wydajności biosyntezy związków karotenoidowych decyduje dobór odpowiedniego podłoża oraz parametrów procesu. W badaniach uwzględniano przede wszystkim rodzaj i stężenie źródła węgla oraz azotu w podłożu, pH i temperaturę hodowli, a także czas inkubacji i napowietrzenie (2). Szczególnie wysoką wydajność w otrzymywaniu karotenoidów (600-700 mg/g) zaobserwowano u przedstawicieli następujących gatunków: *Cystofilobasidium capitatum*, *Rhodospodium diobovatum*, *Rhizophyidium sphaerocarpum*, *Rhodotorula glutinis*, *Rhodotorula minuta*, i *Sporobolomyces roseus*. Badane były także proporcje głównych barwników: torlenu, torularodny i β -karotenu (6).

Z wyjątkiem gatunków z rodzaju *Taphrina* i *Protomyces* (Ascomycota – Workowce) wszystkie znane barwne jednokomórkowe organizmy grzybowe są zaliczane do podstawczaków (Basidiomycota). Wśród nich, przedstawiciele tylko kilku małych grup taksonomicznych zostały przebadane na zawartość karotenoidów. Skład i ilość barwników karotenoidowych w licznych ekstraktach z rodzaju *Rhodotorula/Rhodospodium* i *Sporobolomyces/Sporidiobolus* były badane w sposób szczegółowy w latach 70. Niestety nie jest możliwa dokładna interpretacja tych danych w odniesieniu do współczesnej koncepcji taksonomii organizmów należących do podstawczaków. Istnieją też pewne dane co do ilościowego składu karotenoidów u przedstawicieli rodzajów *Cryptococcus* (Tremellales), *Cystofilobasidium* i *Dioszegia* (6).

Synteza karotenoidów zachodzi w organizmach żywych przy udziale następujących enzymów: syntazy fitoenu (wytwarza początkowy 40-węglowy trzon cząsteczek karotenoidów), desaturazy karotenu (tworzy podwójne wiązania pomiędzy sąsiednimi resztami węglowymi) i cyklazy karotenu (powoduje przyłączenie sześciowęglowych pierścieni na końcach 40-węglowego szkieletu). Dodatkowe enzymy obecne w poszczególnych grupach organizmów mogą prowadzić do modyfikacji takich jak np. przyłączenie grupy hydroksylowej, czy skrócenie lub wydłużenie szkieletu węglowego. Podstawowy zestaw enzymatyczny niezbędny do produkcji karotenoidów jest zakodowany w genomach wielu bakterii, jednokomórkowych eukariontów, grzybów i roślin. Zwierzęta wymagają obecności

karotenoidów jako prowitamin do prawidłowego procesu widzenia, zabarwienia skóry, jako antyoksydantów, a ze względu na to, że większość z nich nie posiada genów kodujących enzymy niezbędne do biosyntezy karotenoidów to muszą dostarczać te związki wraz z pożywieniem (8).

Proces biosyntezy karotenoidów został opisany na przykładzie syntezy astaksantyny, karotenoidowego barwnika o dużym biotechnologicznym znaczeniu (9), również w gatunku *Xanthophyllomyces dendrorhous*. Są to grzyby zaliczane do podstawczaków, zdolne do syntezy tego barwnika. Uważa się, że karotenogeneza mogła powstać, jako mechanizm obronny komórek przed uszkodzeniem oksydacyjnym przez reaktywne formy tlenu (ROS) wytwarzane przez biochemiczne i fotochemiczne układy. Wśród karotenoidów astaksantyna wyróżnia się silnymi właściwościami przeciwutleniającymi (9). Karotenoidy są tetraterpenoidowymi związkami, które są biosyntetyzowane na drodze izoprenoidowego szlaku (zwanego także terpenoidowym) (ryc.2). Podstawową jednostką do ich syntezy jest IPP (pirofosforan izopentenyłu), którego izomerem jest DMAPP (pirofosforan dimetyloalilu). Pomimo, że zostały odkryte i opisane różne alternatywne szlaki, IPP w większości eukariotycznych organizmów jest syntetyzowany z acetylo-CoA na drodze szlaku przemian mewalonianu. Istnieje pięć genów kontroli tego szlaku, a wśród nich ważną rolę odgrywa ekspresja genu HMGR kodującego reduktazę hydroksymetyloglutarylo-CoA i jest silnie regulowana na różnych poziomach (transkrypcji, przemian potranslacyjnych i proteolizy). Na kolejnych etapach szlaku DMAPP i IPP ulegają kondensacji, z wytworzeniem pirofosforanu geranylu (GPP) przy udziale transferazy prenylowej, a następnie przyłączeniu kolejnej cząsteczki IPP, co prowadzi do utworzenia pirofosforanu farnezylu (FPP). Kolejne dwie cząsteczki FPP mogą ulec kondensacji, przy udziale syntazy skwalenowej, prowadząc do powstania skwalenu, prekursora steroli, lub w przypadku dalszej syntezy karotenoidów do FPP może przyłączyć się kolejna cząsteczka IPP, tworząc geranylgeranylo pirofosforan (GGPP). Następnie kondensacja dwóch cząsteczek GGPP prowadzi do powstania symetrycznego szkieletu fitoenu – pierwszego karotenu w tym szlaku biosyntezy. W kolejnych etapach karotenogenezy przeprowadzanej przez *X. dendrorhous* poprzez cztery kolejne desaturacje fitoenu powstaje likopen, natomiast β -karoten powstaje poprzez

cyklizację na końcach likopenu. Następnie poprzez reakcje hydroksylacji i wprowadzenia grupy ketonowej tworzona jest astaksantyna. Ta ostatnia reakcja katalizowana jest przez enzym syntazę astaksantyny (9).

Aktywność biologiczna karotenoidów

Wiele doniesień naukowych wskazuje na to, że karotenoidy pełnią ważne funkcje niemal we wszystkich żywych organizmach. Prowadzono liczne eksperymenty, które miały na celu identyfikację, oraz przede wszystkim wyjaśnienie ich enzymatycznego i genetycznego wpływu na organizmy (4,7). Struktura karotenoidów, a zwłaszcza obecność sprzężonego układu podwójnych wiązań determinuje specyficzne właściwości tych związków (6). Karotenoidy, wykazując silne działanie przeciwutleniające, pełnią funkcję zmiataczy wolnych rodników, oraz biorą udział w fotoprotekcji. U niektórych bakterii (i innych organizmów zdolnych do fotosyntezy) związki te biorą udział w procesie fotosyntezy, ze względu na zdolność do absorpcji światła (6). Udowodniono też, że karotenoidy mogą wspomagać wiele korzystnych procesów takich jak: stymulacja systemu odpornościowego, modulacja międzykomórkowych ścieżek sygnałowych, regulacja cyklu komórkowego, apoptozy, oraz regulacja czynników wzrostu (7). Szeroki zakres reaktywności chemicznej karotenoidów sprawia, że mogą one wywierać bioochronny wpływ na ludzki organizm. Niektóre z nich wykazują aktywność witaminy A (np. β -karoten), a jako antyoksydanty mają zdolność do wygaszania tlenu singletowego oraz do eliminacji organicznych wolnych rodników. W rezultacie mogą być skuteczne w profilaktyce nowotworów oraz chorób układu sercowo-naczyniowego (2). Ze względu na prozdrowotne właściwości karotenoidy znalazły zastosowanie nie tylko w medycynie (w leczeniu niektórych rodzajów nowotworów, miażdżycy tętnic czy choroby tętnic wieńcowych), ale też przemysłe spożywczym i kosmetycznym. Barwniki te są również powszechnie wykorzystywane w rolnictwie jako dodatek do pasz np. w celu barwienia żółtek jaj (2,6).

Brak karotenoidów prowadzi do zaburzeń funkcji fizjologicznych, a w konsekwencji nawet do śmierci (5).

Jedną z substancji, która może przekształcić się do witaminy A jest β -karoten. Właściwość ta jest ściśle związana ze strukturą chemiczną danej cząsteczki. Podstawowym warunkiem, jaki

musi być spełniony, aby dany związek mógł zostać przekształcony do witaminy A jest obecność niepodstawionego pierścienia β . Aktywności tej nie posiadają karotenoidy, które nie mają tego pierścienia, lub jest on podstawiony przez grupę hydroksylową, karbonylową lub epoksydową (4). Witamina A jest tworzona na skutek zaleźnego od obecności tlenu centralnego rozszczepienia β -karotenu i innych karotenoidów będących pro-witaminą witaminy A (5). Prawdopodobne stężenie witaminy A w organizmie chroni przed wieloma poważnymi chorobami. Witamina ta jest składnikiem rodopsyny. Odgrywa również bardzo ważną rolę w procesie wzrostu tkanki kostnej i komórek nabłonkowych, zwłaszcza błony śluzowej jamy ustnej, dróg oddechowych, przewodu pokarmowego, czy pęcherza moczowego.

Działanie antyoksydacyjne

Stres oksydacyjny został uznany za jedną z głównych przyczyn szeregu współczesnych chorób cywilizacyjnych. Niemniej jednak, przybiera dowodów, że przeciwutleniacze, jak np. karotenoidy, mogą ograniczać objawy, a nawet zapobiegać rozwojowi różnych zaburzeń wywołanych przez ROS. Dane pochodzące z obserwacji, badań epidemiologicznych i interwencyjnych, jak również badań klinicznych zazwyczaj potwierdzają tę opinię, choć niektóre z nich są niejednoznaczne (7).

Będąc związkami polienowymi karotenoidy są bardzo silnymi, naturalnymi antyoksydantami, aktywnymi zarówno *in vitro* jak i *in vivo* (7,10,11). Aktywność ta związana jest z dezaktywacją tlenu singletowego (1O_2) i usuwaniem wolnych rodników, które mogą doprowadzić do uszkodzenia komórek. Zdolność do wygaszania 1O_2 jest proporcjonalna do ilości sprzężonych wiązań podwójnych w cząsteczce. Aktywność karotenoidów wiąże się ściśle ze strukturą chemiczną tych związków i często zależy od obecności tlenowych grup funkcyjnych, środowiska w jakim karotenoidy się znajdują i rodzaju substancji oksydacyjnej (7,11).

Ze względu na działanie w obecności tlenu, białkowe składniki mitochondrialnego łańcucha transportu elektronów, elementy cyklu kwasu cytrynowego, wraz z innymi enzymami (np. monoaminooksydazą i manganową dysmutazą ponadtlenkową (MnSOD)) są uważane za główne mitochondrialne źródła reaktywnych form tlenu (ROS, z ang. reactive oxygen species). Inne miejsca komórkowego powstawania ROS stanowią

mikrosomy oraz peroksyssomy. Ponadto niektóre enzymy cytoplazmatyczne, jak np. oksydaza ksantynowa, reduktaza cytochromu P-450, lub oksydaza NADPH zostały uznane za silne generatory ROS. Oprócz tego, za powstawanie aktywnych form tlenu w komórkach są odpowiedzialne również liczne egzogenne czynniki fizyczne i chemiczne, jak: promieniowanie UV, promieniowanie jonizujące, związki chemiczne (np. ksenobiotyki) (7). Reaktywne formy tlenu są przede wszystkim traktowane, jako czynniki potencjalnie szkodliwe. Jednak z drugiej strony, znane są również pozytywne, regulacyjne funkcje ROS. Rola ROS w zewnątrzkomórkowych i wewnątrzkomórkowych procesach sygnalizacyjnych została dobrze udokumentowana (7). Przykładowo reaktywne formy tlenu powstające w mitochondriach są uważane za składniki TNF (czynnik martwicy nowotworu) w trakcie jego apoptozy. Mogą one również wpływać na ekspresję genów lub fosforylację białek. W niektórych przypadkach, ROS mają korzystny wpływ na przebieg stanu zapalnego. Jednak ilość reaktywnych form tlenu w komórkach musi być utrzymywana pod ścisłą kontrolą. Rodzaj i złożoność przeciwutleniaczy decyduje o ich efektywności wobec ROS. Najbardziej oczywistą grupą komórkowych przeciwutleniaczy są enzymy, takie jak np. dysmutazy ponadtlenkowe (SOD), czy katalazy (CAT). Do ważnych przeciwutleniaczy należą również witaminy: tokoferol (Wit. E), kwas askorbinowy (Wit. C), czy retinol (Wit. A). Utrata równowagi pomiędzy generowaniem, a neutralizowaniem reaktywnych form tlenu, może prowadzić do ich nadprodukcji i w konsekwencji do akumulacji, prowadząc do chorób i zaburzeń. Do najczęstszych zaliczyć możemy: nowotwory, choroby układu krążenia, cukrzycę, zaburzenia neurologiczne, czy różnego rodzaju stany zapalne, oraz przyspieszenie procesów związanych ze starzeniem się organizmu. Dla tego związku zdolne do zapobiegania nadmiernemu powstawaniu ROS, dzięki regulacji ich stężenia, mają znaczenie dla zdrowia człowieka. Szczególną rolę odgrywają karotenoidy dezaktywujące tlen singletowy (1O_2), jak również usuwające wolne rodniki działające w obrębie lipidowej dwuwarstwy błony komórkowej (7). Nienasycone kwasy tłuszczowe znajdujące się w błonach komórkowych są głównymi związkami degradowanymi przez wolne rodniki. Mogą one zainicjować reakcję łańcuchową, która powoduje najpierw peroksydację lipidów i w konsekwencji może doprowadzić do

znacznego uszkodzenia błony, enzymów i kwasów nukleinowych. Chociaż w pierwszej kolejności badano β -karoten, teoretycznie wszystkie karotenoidy o podobnym systemie sprzężonych wiązań podwójnych powinny mieć podobne działanie (5). Działanie przeciwutleniające tych barwników na błony lipidowe zależy od ich lokalizacji, orientacji i organizacji w błonie. Polarne i niepolarne karotenoidy w różny sposób oddziałują na strukturę i fizjologię komórek. Tak na przykład astaksantyna, która jest substancją polarną, ogranicza utlenianie lipidów poprzez utrzymywanie sztywnej struktury błony (4).

W badaniach *in vitro* wykazano, że β -karoten hamuje peroksydację lipidów w niskim stężeniu tlenu, lecz nie hamuje tego procesu, gdy stężenie tlenu jest duże (12,13).

Karotenoidy mając zdolność do dezaktywacji tlenu singletowego, są skuteczne u osób chorych na porfirię, u których w wyniku naświetlania światłem słonecznym powstają zmiany na powierzchni skóry będące efektem działania właśnie tlenu singletowego (12). Dezaktywacja 1O_2 oparta jest na przetwarzaniu nadmiaru energii i rozprzianiu jej w postaci ciepła przez najniższy wzbudzony stan trypletowy karotenoidów. Możliwe szkodliwe skutki wzbudzonych karotenoidów mogą być ignorowane głównie ze względu na ich niską energię i krótki czas trwania.

Ponadto karotenoidy oprócz reaktywnych form tlenu (ROS), skutecznie neutralizują również inne wolne rodniki różnego pochodzenia, zapewniając ochronę przed uszkodzeniem oksydacyjnym zarówno organizmom fotosyntetyzującym, jak i tym niezdolnym do przeprowadzania fotosyntezy.

Porównując β -karoten z innymi antyoksydantami takimi jak witaminy C i E, udowodniono, że wykazuje on wyższą aktywność wobec tlenu singletowego. Ponadto β -karoten hamuje fazę początkową, jak również etap propagacji peroksydacji lipoprotein (4).

Właściwości przeciwnowotworowe karotenoidów

Od czasów pojawienia się pierwszych sugestii, że karotenoidy mogą chronić przed rozwojem nowotworów, wiele badań epidemiologicznych zostało przeprowadzonych w celu określenia związku pomiędzy dietą, a rodzajem nowotworu w różnych populacjach. Z badań epidemiologicznych najbardziej użyteczne okazały się być te perspektywne, w których informacje o diecie i wskaźnikach biochemicznych są uzyskiwane

również przed rozwojem choroby. Zależności z nich otrzymane mogą nie być związane przyczynowo, więc dane epidemiologiczne muszą być łączone z innymi metodami eksperymentalnymi w celu określenia związków przyczynowo-skutkowych. Ponad 20 badań epidemiologicznych, zarówno prospektywnych jak i retrospektywnych, wykazało, że ryzyko zachorowania lub zgonu, z powodu określonego rodzaju nowotworu jest odwrotnie proporcjonalne do ilości spożywanego produktu bogatych w karotenoidy i poziomu β -karotenu w osoczu krwi. Wykazano, iż u osób z najniższym spożyciem karotenoidów lub niskim stężeniem β -karotenu w osoczu występuje 2 do 7-krotnie większe ryzyko zachorowania na nowotwór płuc, niż u osób z wysokim poziomem karotenów w surowicy. Według innych badań, ryzyko rozwoju raka było bardziej powiązane z karotenoidami nie będącymi prekursorami witaminy A. Należy wziąć pod uwagę, że w wielu badaniach palenie papierosów nie było ściśle kontrolowane, ponadto inne składniki środków spożywczych bogatych w karotenoidy, jak błonnik, witaminy C i E, indole, czy polifenole mogą również odgrywać ochronną rolę, co w rezultacie może prowadzić do wyciągnięcia sprzecznych wniosków (5). Niektóre badania potwierdzają działanie karotenoidów, a zwłaszcza β -karotenu zapobiegające oparzeniom skóry u osób zdrowych, pomimo że jego współczynnik ochrony przeciwsłonecznej jest stosunkowo niski (SPF-2). Dodatkowo meta analiza suplementacji β -karotenem w porównaniu do placebo również pozwoliła stwierdzić jego ochronne działanie przeciw poparzeniom słonecznym. Działanie to niewątpliwie wiąże się ze zdolnością dezaktywacji reaktywnych form tlenu tworzących się podczas ekspozycji skóry na promieniowanie UV, oraz zdolności karotenoidów do pochłaniania promieni UV (4). Barwniki te gromadzą się bowiem w skórze i absorbują mutagenne i onkogenne promieniowanie. Również kosmetyki zawierające karotenoidy i wyciągi z roślin karotenoidowych (np. ekstrakty olejowe z marchwi) zabezpieczają skórę przed szkodliwym wpływem promieni UV (tzw. fotoprotektory).

W modelach *in vitro* hodowli komórek i narządów, narażonych na działanie czynników mutagennych, takich jak nukleofilowe środki chemiczne, reaktywne związki tlenu, oraz promieniowanie-X wykazano, że β -karoten w stężeniach sięgających do $3 \mu\text{M/L}$ chroni przed wymianą chromatyd siostrzanych i innymi

uszkodzeniami wewnątrz jąder komórkowych. Zarówno kantaksantyna jak i β -karoten, z wartościami ED_{50} 0,2 do 0,6 M/L, także hamują transformację fibroblastów poddanych na ekspozycję metylocholanrenem lub promieniowaniem X. Tak, więc karotenoidy, z lub bez aktywności prowitaminy A, chronią przed uszkodzeniami jądro komórkowe w stężeniach podobnych do tych oznaczonych w tkankach. Natomiast w modelach zwierzęcych związki te wykazują aktywność głównie jako środki chemoprotekcyjne lub chemoprewencyjne w kilku rodzajach raka, w tym raku skóry. Udowodniono, że wstrzykiwany β -karoten spowalnia rozrost nowotworu skóry u bezwłosych myszy wystawianych na działanie światła ultrafioletowego (UV-A, UV-B). Podobnie podawanie w pożywieniu β -karotenu, kantaksantyny lub fitoenu bezwłosym myszom wystawionym na działanie promieniowania UV-B opóźniało pojawienie się guzów skóry lub redukowało ich ilość. Podobne obserwacje zostały opisane w odniesieniu do raka skóry wywołanego promieniowaniem UV, próbki skóry z bezwłosych myszy leczonych karotenoidami tworzą mniej singletowego tlenu po wystawieniu na działanie światła niż próbki z myszy nieleczonych. Stwierdzono obniżenie poziomu karotenoidów mężczyźni i kobiet narażonych przez 2 tygodnie na znaczącą dawkę promieniowania UV-A.

Podawanie zwierzętom narażonym na działanie czynników rakotwórczych karotenoidów, takich jak β -karoten, czy kantaksantyna spowalniało wzrost nowotworu i obniżało masę guza. W przeciwieństwie do modeli nowotworowych skóry cytowanych powyżej, guzy te rozwijają się w miejscach nie narażonych na działanie promieniowania UV generującego powstawanie tlenu singletowego. Stwierdzono jednak, że karotenoidy podawane w wysokich dawkach, nie wykazywały efektów ochronnych (14). Karotenoidy blokują rozwój zdarzeń nowotworowych głównie we wstępnej fazie (5).

Kolejne badania, miały na celu ocenę wpływu karotenoidów dostarczanych do organizmu wraz z pożywieniem na ryzyko wystąpienia złośliwego raka piersi. Badaniem tym poddano 36664 kobiet mieszkających w Szwecji. Udało się wykazać odwrotną zależność pomiędzy spożywaniem karotenów, a ryzykiem wystąpienia podtypów raka zależnych od statusu receptora estrogeny oraz statusu receptora progesteronu (4).

Wykazano, że karotenoidy mogą nasilać odpowiedź immunologiczną. Udowodniono

zwiększoną proliferację zarówno limfocytów T i B w śledzionach szczurów, których pożywienie wzbogacono β -karotenem lub kantaksantyną. W innym eksperymencie wykazano, że chomiki z chemicznie indukowanym nowotworem, które zostały poddane działaniu preparatów zawierających β -karoten, kantaksantynę, bądź inne karotenoidy, posiadały zwiększoną liczbę makrofagów i komórek T cytotoksycznych, jak również wyższe miano czynnika martwicy nowotworu, niż zwierzęta nieleczone (5). Podobnie myszy, które były karmione pokarmem o wysokiej zawartości β -karotenu, kantaksantyny lub astaksantyny, a następnie wstrzyknięto im komórki nowotworowe, rozwinęły mniejszą liczbę wolniej rosnących nowotworów niż te, którym nie podano karotenoidów. Ponadto wykazano, że wstrzyknięcie β -karotenu, kantaksantyny lub witaminy E w guzy woreczka policzkowego chomika, spowodowało znaczną regresję masy guza. W powyższych badaniach wszystkie karotenoidy, zarówno posiadające aktywność witaminy A jak i bez niej, wykazywały podobne działanie. Mechanizm, za pomocą którego karotenoidy wywierają taki wpływ na układ odpornościowy, nie został jeszcze dokładnie wyjaśniony (5).

Karotenoidy w organizmie człowieka

Wiele karotenoidów obecnych w diecie zostało znalezionych we krwi i tkankach człowieka. Istnieje kilka istotnych czynników wpływających na biodostępność, absorpcję, transport, magazynowanie i rozkład karotenoidów. Do najbardziej oczywistych należą: rodzaj, ilość karotenoidów oraz środowisko, w jakim są one wchłaniane. Uwalnianie tych związków z pożywienia w znacznym stopniu zależy od ich stanu, jak i połączeń z innymi cząsteczkami np. białkami. Pozostałe czynniki jak np. czynniki genetyczne, stan odżywienia, płeć, starzenie się, czy infekcje również determinują biodostępność karotenoidów (7). β -Karoten, jako najbardziej aktywny spośród karotenoidów, stanowi 15-30% wszystkich karotenoidów obecnych w surowicy (5).

Karotenoidy są naturalnymi składnikami krwi i tkanek ludzi, krów, ptaków, ryb, skorupiaków i tylko niektórych grzywni, przez co w badaniach dystrybucji tkankowej i metabolizmu karotenoidów nie są one najlepszym modelem w porównaniu do organizmu człowieka. W organizmach ludzi zdrowych karotenoidy są

obecne głównie w tkance tłuszczowej (80-85%), oraz w wątrobie (8-12%) i mniejsze ilości w mięśniach (2-3%) (5). Ich stosunkowo wysoką zawartość stwierdzono również w nadnerczach, ciałku żółtym, jądrach, skórze i siatkówce oka (plamka żółta) (7).

Z całkowitej ilości karotenoidów (100-150 mg) znajdującej się w organizmie, surowica krwi zwykle zawiera około 1% związków, i zazwyczaj wykazuje stężenie 0,4-1,5 $\mu\text{g/mL}$ (0,8-8 $\mu\text{M/L}$). Całkowita ilość i stężenie karotenoidów we krwi i tkankach w znacznym stopniu zależy od średniego dziennego spożycia tych barwników (5). Najpopularniejszymi karotenoidami występującymi w diecie człowieka są: β - i α -karoten, likopen, luteina i β -kryptoksantyna oraz w mniejszym stężeniu zeaksantyna i polienu, takie jak fito i fitofluen (4,6). Większość karotenoidów pochodzących z pożywienia, jest absorbowana w jelicie i transportowana do krwi, która za pomocą lipoprotein, głównie frakcji LDL (lipoproteiny o niskiej gęstości) do poszczególnych tkanek (6). Liczne prace dowodzą, że receptory klasy B typu 1 (SR-B1) oraz różnicowania białka błonowego (CD36), odpowiedzialne za transport cholesterolu, ułatwiają wchłanianie karotenoidów w jelitach (4). Dobrze znany jest fakt, że choroby, którym towarzyszą zaburzenia wchłaniania tłuszczu z przewodu pokarmowego, istotnie wpływają na wchłanianie karotenoidów. Ponadto interakcje z lekami (np. sulfonamidami, czy kwasem acetylosalicylowym) również mogą wpływać na obniżenie ich biodostępności. Karotenoidy mogą oddziaływać między sobą np. podczas wchłaniania, czy przemian metabolicznych, co wykazano poprzez jednoczesne podanie β -karotenu i luteiny (7).

Wchłanianie jelitowe karotenoidów, które są silnie hydrofobowymi cząsteczkami, obejmuje etapy podobne jak w przypadku kwasów tłuszczowych i witamin w nich rozpuszczalnych. Należą do nich: zamknięcie karotenoidów w przestrzeni wewnętrznej mieszaniny miceli w celu zwiększenia ich rozpuszczalności, wychwyt przez błonę śluzową jelita, wbudowanie do chylomikronów i uwalnianie do limfy. Po uwolnieniu karotenoidów z chylomikronów poprzez lipazę lipoproteinową, są one dalej transportowane przez lipoproteiny o małej gęstości (6,7).

Karotenoidy są związane głównie, jeśli nie wyłącznie, z częściami lipidowymi tkanek i błon komórkowych ssaków. Przeprowadzone zostały

badania, które wykazały związek między rodzajem oraz stężeniem tych związków w surowicy i tkance człowieka. Najważniejszymi występującymi w największych ilościach karotenoidami zarówno w tkance tłuszczowej jak i surowicy były: luteina, kryptoksantina, likopen, α -karoten i β -karoten. Ze względu na to, że stężenie karotenoidów w surowicy pacjentów będących na diecie pozbawionej tych związków obniża się bardzo powoli, wykazano, że tkanka tłuszczowa, wątroba (i w mniejszym stopniu inne tkanki) mogą magazynować te związki i uwalniać je w razie potrzeby. Mechanizmy leżące u podstaw wychwytu i uwalniania karotenoidów, nie zostały do końca poznane.

Około 40% wchłoniętej dawki karotenu jest magazynowane w tkance tłuszczowej jako substrat do syntezy witaminy A. Prawidłowe wchłanianie karotenoidów odbywa się wyłącznie w obecności tłuszczów i żółci. Pozostała część wchłoniętego β -karotenu jak i innych karotenoidów będących prekursorami witaminy A (np. β -kryptoksantina oraz α -karoten), ulega przekształceniu do retinalu głównie w błonie śluzowej jelit, ale również do pewnego stopnia w wątrobie i innych narządach. Przemiana ta polega na oksydacyjnym rozpadzie karotenu i jest katalizowana przez enzym 15,15'-dioksygenazę β -karotenową (5). Retinal jest następnie redukowany do retinolu i utleniany do kwasu retinoidowego w wielu tkankach. Jedną cząsteczką β -karotenu ulega rozpadowi do dwóch cząsteczek retinalu, a ten w wyniku redukcji ulega przemianie do dwóch cząsteczek retinolu. Nadmiar karotenoidów jest wydalany z kałem (5).

Karotenoidy w grzybach

Ze względu na korzystne działanie karotenoidów wzrasta zainteresowanie metodami ich pozyskiwania z naturalnych źródeł (15,16).

Wysoką wydajność produkcji karotenoidów stwierdzono u następujących przedstawicieli *Basidiomycota*: *Cystofilobasidium capitatum*, *Rhodospiridium diobovatum*, *Rhodospiridium sphaerocarum* oraz *Rhodotorula glutinis*, w których wykryto wysokie ilości tych związków tzn. powyżej 0,6 mg/g suchej biomasy w przeliczeniu na β -karoten. Nieznacznie niższa całkowita zawartość karotenoidów (około 0,5 mg/g suchej biomasy) była typowa dla szczepów: *Sporobolomyces roseus*, *Rhodotorula minuta* (6). W innych badaniach wysoka zawartość β -karotenu i likopenu ($\leq 0,24$ mg/100 g suchej masy) wykazano w dwóch gatunkach: *Piptoporus betulinus* i *Collybia fusipes* (17).

Ponadto karotenoidy zostały oznaczone z wykorzystaniem analizy spektrofotometrycznej, w następujących gatunkach grzybów: *Leucopaxillus giganteus*, *Sarcodon imbricatus*, *Lactarius piperatus*, *Lactarius deliciosus*, *Agaricus arvensis*, *Agaricus bisporus*, *Agaricus romagnesii*, *Agaricus silvaticus*, *Agaricus silvicolus*, *Hypholoma fasciculare*, *Calocybe gambosa*, *Craterellus cornucopioides*, *Marasmius oreades*, natomiast metodą wysokosprawną chromatografii cieczowej (HPLC) sprzężonej z detektorem UV, β , β -karoten został wykryty w: *Agaricus bisporus*, *Polyporus squamosus*, *Lepista nuda*, *Russula delicata*, *Verpa conica*, *Pleurotus ostreatus* i *Hypsizygus marmoratus* (18,19).

β -Karoten i likopen zostały również znalezione w trzech dziko rosnących gatunkach grzybów jadalnych: *Leucopaxillus giganteus*, *Sarcodon imbricatus* i *Agaricus arvensis* (20). Karotenoidy były także izolowane z kilku gatunków z rodziny *Cantharellus*. Jednym z przykładów jest *Cantharellus cibarius*, który zawiera głównie β -karoten, oraz w mniejszych ilościach likopen, α -karoten i dwa inne karotenoidy, będące prawdopodobnie γ - i δ -izomerami (21).

Barros (2008) wykazał, że z sześciu gatunków *Basidiomycota* zebranych z naturalnych miejsc w północno-zachodniej Portugalii, *Cantharellus cibarius* (Chantarelle) zawierała największe ilości β -karotenu (13,56 μ g/g suchej masy), podczas gdy zawartość tego metabolitu w pozostałych badanych gatunkach grzybów wahała się od 1,95 do 12,77 μ g/g suchej masy (22).

Zawartość tego bardzo ważnego przeciwutleniacza analizowano w ekstraktach z owocników i mycelium z kultur *in vitro* *Calocera viscosa* (23, 24). Zawartość karotenoidów w owocnikach *C. viscosa* rosnących w Polsce oszacowano spektrofotometrycznie na 2,46 mg/g świeżej masy przez Czeżugę (1980) (23). Zawartość wyższą niż oznaczoną przez Czeżugę stwierdzono w biomase tego gatunku otrzymanej z kultur *in vitro*. Hodowle utrzymywano w różnych warunkach w celu optymalizacji wzrostu biomasy oraz ustalenia najbardziej korzystnych warunków dla akumulacji β -karotenu. Zawartość β -karotenu w biomase z kultur stałych jest porównywalna z tą znajdującą się w owocnikach (7,1 i 7,5 μ g/g suchej masy, odpowiednio). Grzybnia z kultur płynnych zawierała połowę zawartości β -karotenu i wynosiła ona 3,5 μ g/g suchej masy (24,25).

Zawartość β -karotenu i likopenu, oraz metody detekcji tych związków w poszczególnych gatunkach grzybów przedstawiono w tabelach 1-3.

Tabela 1. Zawartość β -karotenu w wybranych gatunkach grzybów (18)

Nazwa gatunku	β -karoten [mg/g ekstraktu]	Państwo
<i>Agaricus arvensis</i>	$8,52 \times 10^{-3}$	Portugalia
<i>Agaricus bisporus</i>	$1,95 \times 10^{-3}$	Portugalia
<i>Agaricus bisporus</i>	0,04	Turcja
<i>Agaricus romagnesii</i>	$1,32 \times 10^{-3}$	Portugalia
<i>Agaricus silvaticus</i>	$5,42 \times 10^{-3}$	Portugalia
<i>Agaricus silvicola</i>	$3,02 \times 10^{-3}$	Portugalia
<i>Boletus edulis</i>	$2,73 \times 10^{-3}$	Portugalia
<i>Calocybe gambosa</i>	$6,41 \times 10^{-3}$	Portugalia
<i>Cantharellus cibarius</i>	0,01	Portugalia
<i>Craterellus cornucopioides</i>	0,01	Portugalia
<i>Hypoholoma fasciculare</i>	0,02	Portugalia
<i>Hypsizigus marmoreus</i>	0,02	Tajwan
<i>Lactarius deliciosus</i>	0,09	Portugalia
<i>Lactarius piperatus</i>	0,03	Portugalia
<i>Lepista nuda</i>	$2,52 \times 10^{-3}$	Portugalia
<i>Lepista nuda</i>	$7,00 \times 10^{-3}$	Turcja
<i>Leucopaxillus giganteus</i>	$1,88 \times 10^{-3}$	Portugalia
<i>Lycoperdon molle</i>	$4,48 \times 10^{-3}$	Portugalia
<i>Lycoperdon perlatum</i>	0,01	Portugalia
<i>Marasmius oreades</i>	$1,99 \times 10^{-3}$	Portugalia
<i>Pleurotus ostreatus</i>	0,03	Indie
<i>Polyporus squamosus</i>	0,02	Turcja
<i>Russula delica</i>	$9,00 \times 10^{-3}$	Turcja
<i>Sarcodon imbricatus</i>	$2,53 \times 10^{-3}$	Portugalia
<i>Tricholoma acerbum</i>	0,08	Portugalia

Tabela 3. Zawartość β -karotenu i likopenu w wybranych gatunkach grzybów (18,20)

Nazwa gatunku	B-karoten	Likopen
<i>Agaricus arvensis</i>	2,970,12a	1,00,049a
<i>Amanita porphyria</i>	0,13 0,00b	0,010,00b
<i>Collybia fusipes</i>	0,240,00b	-
<i>Fomitopsis pinicola</i>	0,220,00b	-
<i>Hebeloma sinapizans</i>	0,010,00b	0,060,00b
<i>Inocybe splendens</i>	0,050,00b	0,030,00b
<i>Lactarius hepaticus</i>	-	0,190,00b
<i>Lentinus tigrinus</i>	0,150,00b	-
<i>Leucopaxillus giganteus</i>	1,880,09a	0,690,034a
<i>Piptoporus betulinus</i>	0,090,00b	0,230,00b
<i>Pluteus murinus</i>	0,030,00b	0,010,00b
<i>Russula emetica</i>	0,110,00b	-
<i>Sarcodon imbricatus</i>	2,530,11a	1,30,07a

 a-[μ g/g ekstraktu], b-[mg/100g suchej masy]

Tabela 2. Badania potwierdzające obecność β -karotenu w wybranych gatunkach grzybów (18)

Metodyka	Nazwa gatunku	Państwo
Spektrofotometria	<i>Leucopaxillus giganteus</i> , <i>Sarcodon imbricatus</i>	Portugalia
Spektrofotometria	<i>Lactarius piperatus</i>	Portugalia
Spektrofotometria	<i>Lactarius deliciosus</i>	Portugalia
HPLC-UV	<i>Agaricus bisporus</i> , <i>Polyporus squamosus</i> , <i>Lepista nuda</i> , <i>Russula delica</i> , <i>Verpa conica</i>	Turcja
Spektrofotometria	<i>Agaricus arvensis</i> , <i>Agaricus bisporus</i> , <i>Agaricus romagnesii</i> , <i>Agaricus silvaticus</i> , <i>Agaricus silvicola</i>	Portugalia
Spektrofotometria	<i>Hypoholoma fasciculare</i> , <i>Lepista nuda</i> , <i>Lycoperdon molle</i> , <i>Lycoperdon perlatum</i> , <i>Ramaria botrytis</i> and <i>Tricholoma acerbum</i>	Portugalia
Spektrofotometria	<i>Boletus edulis</i> , <i>Calocybe gambosa</i> , <i>Cantharellus cibarius</i> , <i>Craterellus cornucopioides</i> , <i>Marasmius oreades</i>	Portugalia
HPLC-UV	<i>Pleurotus ostreatus</i>	Indie
HPLC-UV	<i>Hypsizigus marmoreus</i>	Tajwan

Resumo

Pro la valoraj proprajoj de karotenoidoj, ankoraŭ pliigase intereso pri novaj metodoj obteni ilin. Tiucele, ekde la 60-aj jaroj de la dudeka jarcento, sciencistoj faris multajn studojn por ekzoni la procezojn, laŭ kiuj povus esti produktitaj karotenoidoj.

Karotenoidoj, malkaŝante fortan antioksidantan aktivecon, agas kiel forigantoj de liberaj radikaloj, ankaŭ tiuj kemiaj komponaĵoj povas apogi multajn utilajn procezojn kiel stimolon de la imunsystemo, moduladon de intracelaj signalvojoj, reguladon de la ĉela ciklo kaj apoptozon, reguligon de kreskofaktoroj.

Karotenoidoj estis determinitaj per spektrofotometria metodo en la sekvantaj fungaj specioj: *Leucopaxillus giganteus*, *Sarcodon imbricatus*, *Lactarius piperatus*, *Lactarius deliciosus*, *Agaricus arvensis*, *Agaricus bisporus*, *Agaricus romagnesii*, *Agaricus silvaticus*, *Agaricus silvicola*, *Hypholoma fasciculare*, *Calocybe gambosa*, *Craterellus cornucopioides*, *Marasmius oreades* kaj per altefika likvajkromatografio (HPLC) kuplita kun UV detektilo, β -karoteno estis detektitaj en *Agaricus bisporus*, *Polyporus squamosus*, *Lepista nuda*, *Russula delica*, *Verpa conica*, *Ostrofungo* kaj *Hypsizygus marmoreus*. β -karoteno kaj likopeno ankaŭ estas trovitaj en tri sovaĝaj specioj de manĝeblaj fungoj: *Leucopaxillus giganteus*, *Sarcodon imbricatus* kaj *Agaricus arvensis*. Tiuj kemiaj komponaĵoj ankaŭ estis izolitaj el pluraj specioj de la familio *Cantharellus*. Unu ekzemplo estas *Cantharellus cibarius*, kiu enhavas ĉefe β , β -karotenon, kaj malgrandajn kvantojn de likopeno, α -karoteno kaj aliajn karotenoidojn, kiuj povas esti δ - kaj γ -izomeroj.

Piŝmiennictwo:

1. Buzzini, P., Innocenti M., Turchetti B., Libkind D., van Broock M., Mulinacci N.; *Can J Microbiol* 2007, 53, 1024–1031.
2. Lewicka, A., Błażej S., Migdał M.; *ZNTJ* 2009, 3, 19–31.
3. Meléndez-Martínez, A.J., Escudero-Gilete, M.L., Vicario, I.M., Heredia, F.J.; *Food Res Int* 2010; 43, 1289–1296.
4. Grysczyńska, A., Grysczyńska, B., Opala, B.; *Post Fitoter* 2011, 2, 127–143.
5. Bendich, A., Olson, J.A.; *FASEB J* 1989, 3, 1927–1932.
6. Yurkov, A.M., Vustin, M.M., Tyaglov, B.V.,

- Maksimova, I.A., Sineokiy, S.P.; *Microbiol* 2008, 77, 1–6.
7. Fiedor, J., Burda, K.; *Nutrients* 2014, 6, 466–488.
8. Nováková, E., Moran, N.A.; *Mol Biol Evol* 2012, 29, 313–323.
9. Loto, I., Gutiérrez, M.S., Barahona, S., Sepúlveda, D., Martínez-Moya, P., Baeza, M., Cifuentes, V., Alcaino, J.; *BMC Microbiol* 2012, 12, 235.
10. Puzanowska-Tarasiewicz, H., Kuźmicka, L., Tarasiewicz, M.; *Bromat Chem Toksykol* 2010, 1, 9–14.
11. Adamska, A., Rutkowska, J., Białek, M.; *Probl Hig Epid* 2014, 95, 36–40.
12. Sroka, Z., Gamian, A., Cisowski, W.; *Postepy Hig Med Dosw* 2005, 59, 34–41.
13. Zhang, P., Omaye, S.T.; *Toxicol In Vitro* 2001, 15, 13–24.
14. Moon, R.C.; *J Nutr* 1989, 119, 127–134.
15. Lindequist, U., Niedermeyer, T.H.J., Jülich, W.D.; *Evid Based Complement Alternat Med* 2005, 2, 285–299.
16. Zhong, J.J., Xiao, J.H.; *Adv Biochem Eng Biotechnol* 2009, 113, 79–150.
17. Reis, F.S., Pereira, E., Barros, L., Sousa, M.J., Martins, A., Ferreira, I.C.; *Molecules* 2011, 16, 4328–4338.
18. Ferreira, I.C., Barros, L., Aberu, R.M.; *Curr Med Chem* 2009, 16, 1543–1560.
19. Robaszekiewicz, A., Bartosz, G., Ławrynowicz, M., Soszyński, M.; *J Nutr Intermed Metab* 2010, 173274, 1–9.
20. Barros, L., Ferreira, M.J., Queirós, B., Ferreira, I.C., Baptista P.; *Food Chem* 2007, 103, 413–419.
21. Velišek, J., Cejpek, K.; *Czech Food Sci* 2011, 29, 87–102.
22. Barros, L., Dueñas, M., Ferreira, I.C., Baptista, P., Santos-Buelga C.; *Food Chem Toxicol* 2009, 47, 1076–1079.
23. Czczuga, B.; *Acta Mycol* 1980, 16, 115–120.
24. Muszyńska, B., Sułkowska-Ziaja K.; *Acta Pol Pharm* 2012, 47, 57–64.
25. Ohstuka S., Ueno S., Yoshikumi C., Hirose F., Ohmura Y., Wada T., Fujii T., Takahashi E.; 1973 UK Patent 1331513.