

Effect of dietary supplementation with dry and raw white button mushroom (*Agaricus bisporus*) on biochemical blood parameters of Lika pramenka lambs

A. Shek Vugrovečki¹
 M. Popović^{2*}
 M. Belić³
 M. Živković⁴
 D. Špoljarić²
 B. Špoljarić⁵
 H. Brzica⁶
 G. Mršić⁷
 Z. Flegar – Meštrić⁸
 Ž. Mikulec⁹
 M. Šimpraga¹

A porított és nyers kétspórás csiperkegomba (*Agaricus bisporus*), mint táplálékkiegészítő hatása Lika Pramenka bárányok biokémiai vérértékeire

Ana Shek Vugrovečki¹, Maja Popović^{2*}, Maja Belić³, Mario. Živković⁴, Daniel Špoljarić², Branimira Špoljarić⁵, Hrvoje Brzica⁶, Gordan Mršić⁷, Zlata Flegar-Meštrić⁸, Željko Mikulec⁹, Miljenko Šimpraga¹

ÖSSZEFOGLALÁS

A szerzők vizsgálatának célja az volt, hogy kiderítse, a kétspórás csiperkegombák porított, ill. nyers termőtestének bevitele befolyásolja-e a biokémiai vérértékeket a Lika Pramenka juh fajta bárányaiban. A vizsgálatot 42 klinikailag egészséges, három hónapos bárányon (21 nőstény és 21 hím) végezték, az egyedeket véletlenszerűen három csoportra osztva, amely csoportok mindegyike 14 bárányból állt (hét hím és hét nőstény). Az I. csoport (kontroll) egyedeit kereskedelmi forgalomban kapható báránytáppal etették. A II. csoportot hat héten keresztül szintén így takarmányozták, de 1,5%-os *Agaricus bisporus* porral (ABP) egészítették ki. A III. csoportot szintén kereskedelmi forgalomban kapható báránytáppal takarmányozták, viszont ebben az esetben 15% nyers *Agaricus bisporus*-al (Raw *Agaricus bisporus* – ABR) egészítették ki azt. A takarmánykiegészítő mindkét kezelt csoporton belül mindkét nem esetében szignifikánsan csökkentette a vércukorszintet ($p < 0,0001$) a kontrollhoz és a kiindulási értékhez képest is. A kezelt csoportok közötti vércukorszintet összehasonlítva, szignifikánsan ($p < 0,0001$) kisebb értékeket kaptunk az ABP-csoport esetében, mint az ABR-csoportban. A koleszterin koncentrációja is azonos tendenciát mutatott. Az ABP csoport szignifikánsan ($p < 0,0001$) kisebb totálkoleszterin-koncentrációt mutatott a kontrollhoz és az AB-csoporthoz képest egyaránt. Arra a megállapításra jutottunk, hogy bárányokban az *Agaricus bisporus* gombával kiegészített takarmány csökkentette a vércukorszintet és a totál koleszterin koncentrációját.

SUMMARY

The objective of this study was to examine whether the intake of the dry and raw fruiting bodies of white button mushrooms influence biochemical blood parameters in lambs of the Lika Pramenka sheep breed. This study was performed on 42 clinically healthy, three-month-old lambs (21 females and 21 males), randomly divided into three groups comprised of 14 lambs each (seven males and seven females). The group I was a control, in which lambs were fed on a standard diet. The group II was fed for six weeks on commercial lamb feed supplemented with 1.5% *Agaricus bisporus* powder (ABP), and the group III was fed on a commercial lamb feed supplemented with 15% of raw *Agaricus bisporus* (ABR). Supplementation within both treatment groups significantly reduced blood glucose concentrations ($p < 0.0001$) in both sexes compared to the control and baseline. When the blood glucose level between supplemented groups was compared, there was a statistically significant ($p < 0.0001$) lower level in group ABP than in ABR. Total cholesterol concentrations showed the same trend. Group ABP had a statistically significant ($p < 0.0001$) lower total cholesterol concentration compared with the baseline and the control and ABR groups. It was concluded that feed supplemented with *Agaricus bisporus* mushroom had a lowering effect on the blood glucose and total cholesterol concentrations in lambs.

TAKARMÁNYOZÁSTAN

A gombák gyógyhatása évezredek óta ismert a kelet-ázsiai országokban, de a modern tudomány csak a közelmúltban ismerte fel (4, 5, 22), és bizonyította jótékony hatásukat (30). A gombák termőteste, micéliuma és spórái bioaktív anyagcseretermékeket tartalmaznak, valamint immunmoduláló, gyulladáscsökkentő, daganatellenes, antioxidáns és antimikrobiális hatásúak (23, 28, 29). A gombák immunmoduláló hatását különböző bioaktív vegyületek okozzák, amelyek közül a β -glükánok [β (1,3), β (1,4) és β (1,6) glükozid kötésekkel rendelkező homo- és hetero-glükánok] a legfontosabbak (17). A kétspórás csiperkegomba (*Agaricus bisporus*) az egyik leggyakrabban termesztett ehető gomba a világon. A teljes szárazanyag (5,52%) 59,44% nyersfehérjét, 31,51% szénhidrátot és 6,32% hamut tartalmaz (20). Az *A. bisporus*-ban nagy mennyiségben megtalálható rostok és antioxidánsok, mint pl. a C-, D- és B₁₂-vitaminok, folsav és polifenolok előnyös hatással lehetnek a szív- és érrendszeri betegségek, valamint a cukorbetegség megelőzésére, nem csak emberek, hanem háziállatok esetében is. Az *A. bisporus* jó tápanyag összetétellel rendelkezik – kis zsírtartalmú, nagy fehérjetartalmú (állati fehérjéhez hasonló) és megfelelő szénhidráttartalmú (strukturális poliszacharidok és nem rost szénhidrátok) – emiatt jó minőségű tápláléknak számít (2, 9, 21, 22).

Miután az állati takarmányban betiltották az antibiotikumok hozamfokozóként való alkalmazását (Európai Bizottság, 1831/2003), jelentős erőfeszítések zajlanak a betegségek megelőzésre irányuló kutatások terén és a megfelelő táplálkozási rendszerek kialakításában, különös tekintettel az állatok jólétére. A takarmányozási célra felhasznált adalékanyagokról szóló 1831/2003/EB rendelet 17. cikkével összhangban a Bizottság létrehozta a takarmány-adalékanyagok nyilvántartását, és természetes takarmány-adalékként javasolta a kétspórás csiperkegombát és annak kivonatát (CoE 543). A gomba által termelt, kereskedelmi forgalomban kapható β -glükán termékek részben helyettesíthetik az állatállományokban nem terápiás célokra használt antibiotikumokat, mivel a gomba immunstimuláló tulajdonságokkal rendelkezik, azonban nincs káros hatással az állati termékek mennyiségére vagy minőségére (8, 12, 15, 16, 31).

A közelmúltban végzett kutatások kimutatták, az *A. bisporus*-szal kiegészített takarmány mikrobaellenes és immunstimuláló tulajdonságát brojlercsirkékben, ill. azt, hogy ez a táplálási mód hogyan befolyásolja a hús tápanyag összetételét (10, 18, 26, 27). Mršić és mtsáinak eredményei azt mutatták, hogy kedvező hatást gyakorolt a brojlercsírke húsminőségére, mivel annak zsírtartalma szignifikánsan kisebbnek bizonyult (19). Nyers vagy porított *A. bisporus*-al kiegészített takarmány, bárányokra gyakorolt hatására vonatkozó kísérlet az eddigiekben nem történt.

The medical effects of mushrooms have been known for thousands of years in the East Asian countries but were only recently recognized by modern science (4, 5, 22), and their beneficial effects have been demonstrated (30). The bodies, mycelia, and spores of mushrooms accumulate bioactive metabolites with immunomodulatory, anti-inflammatory, anti-neoplastic, antioxidant and antimicrobial characteristics (28, 23, 29). The immunomodulatory activity of mushrooms is due to their various bioactive compounds, among which β -glucans (homo- and hetero-glucans with β (1,3), β (1,4) and β (1,6) glucoside linkages) are the most important ones (17). *Agaricus bisporus* (white button mushroom) is one of the most frequently cultivated edible mushrooms in the world. The total dry matter (5.52 %) contains 59.44% crude protein, 31.51% carbohydrates and 6.32% ash (20). The high levels of fibre and antioxidants including vitamins C, D, and B₁₂, folate, and polyphenols in *A. bisporus* may provide beneficial effects against cardiovascular diseases and diabetes not only for humans but also for domestic animals. Its good nutritive properties with low fat and high protein content, comparable to animal proteins, and its carbohydrate content (structural polysaccharides and non-fibre carbohydrates) make *A. bisporus* a very acceptable food (2, 9, 21, 22).

After the prohibition of antibiotic use as a growth promoter in animal feed (Regulation of the European Commission, No 1831/2003), significant efforts are being made towards disease prevention research and establishing proper nutritional systems with an emphasis on animal well-being. In accordance with Article 17 of Regulation (EC) No. 1831/2003 on additives for use in animal nutrition, the Commission established the Register of Feed Additives and recommended a natural feed additive, the white button mushroom and its extract CoE 543. Commercially produced β -glucans from the mushrooms can partly replace the antibiotics used in livestock for non-therapeutic purposes, as the mushrooms have immunomodulatory properties without having adverse effects on the size or quality of the animals produced (8, 12, 15, 16, 31).

Recent research showed the antimicrobial and immunomodulatory properties of feed supplemented with *A. bisporus* in broilers and how it affects the nutritional composition of meat (10, 18, 26, 27). Mršić (19) demonstrated a beneficial effect on broiler meat as it had a significantly lower fat content. Research on the effects of feed supplementation with raw or powdered *A. bisporus* in lambs is so far unknown.

The objective of this study was to examine that the ingestion of the dry and raw fruiting bodies of *A.*

A vizsgálat célja annak kiderítése, hogy az *A. bisporus* szárított, ill. nyers termőtestének elfogyasztása befolyásolja-e a biokémiai vérparamétereket a Lika Pramenka juh fajta bérányaiban.

ANYAG ÉS MÓDSZER

GOMBÁK

A kereskedelmi forgalomban kapható *A. bisporus* gombák a GEA-com Ltd., Horvátország gombatermelőtől származnak, az *A. bisporus* termesztésének technológiai folyamata megfelel az Európai Unió előírásainak. 100 g frissen kiválasztott, nyers *A. bisporus* kémiai összetétele 88,1% nedvességtartalom, 3,5% nyersfehérje, 6,5% nyersrost és 0,4% zsír (GEA-com Ltd., Horvátország). A porított *A. bisporus* a gomba termesztől vásárolt friss, nyers termőtestből lett előállítva. Az egész gombát 6 órán át 42 °C-on szárították egy kereskedelmi szárítóban (GEA-com Ltd, Horvátország). Szárítás után a termőtesteket porrá őrölték. Tíz kilogramm nyers gomba felhasználásával 1 kg *A. bisporus* port kaptak. Az *A. bisporus* kémiai összetétele 59,44% fehérje, 31,51% szénhidrát és 6,32% hamu (GEA-com Ltd., Horvátország).

bisporus influence biochemical blood parameters in lambs of the Lika Pramenka sheep breed.

MATERIALS AND METHODS

MUSHROOMS

The commercial *A. bisporus* mushrooms were obtained from the mushroom producer GEA-com Ltd., Croatia, whose technological process of growing *A. bisporus* meets the high standards of organic production by the European Union. The chemical composition of 100 g of freshly picked, raw *A. bisporus* is made up of 88.1% moisture, 3.5% crude protein, 6.5% crude fibre and 0.4% fat (GEA-com Ltd., Croatia). The dry formulation of *A. bisporus* was made after obtaining fresh fruiting bodies from the mushroom grower. The whole mushroom was dried out at 42 °C for six hours in a commercial dryer (GEA-com Ltd, Croatia). After drying, fruiting bodies were milled to a powder. Ten kilograms of raw mushrooms were used to obtain 1 kg of *A. bisporus* powder. The chemical composition of the *A. bisporus* powder was 59.44% protein, 31.51% carbohydrate and 6.32% ash (GEA-com Ltd., Croatia).



1. ÁBRA. Nyers fehér csiperke (*Agaricus bisporus*)

FIGURE 1. Raw white button mushroom (*Agaricus bisporus*) from the mushroom producer GEA-com Ltd., Croatia



2. ÁBRA. Szárított fehér csiperke (*Agaricus bisporus*)

FIGURE 2. Dry white button mushroom (*Agaricus bisporus*) from the mushroom producer GEA-com Ltd., Croatia

BÁRÁNYOK

42 (21 nőstény és 21 hím), 3 hónapos Lika Pramenka bárány (horvát őshonos fajta) szerepelt a kísérletben. A bárányok egy gazdaságból ("Živković", Kvarter, Perušić, Horvátország) - félextenzív tartásból származtak. A születéstől az elválasztásig és a kezelés első napjáig a bárányok ugyanazt a takarmányt kapták, hasonló tartási körülmények között. Az elválasztás után a bárányok születési idejüknek megfelelően (90 napos korban) kerültek kiválasztásra a kísérlethez. A kísérlet megkezdése előtt az összes kiválasztott bárányt egy közös karámban tartották, más állatoktól elkülönítve, egy nagy téli istállóban, három napon át.

3. ÁBRA. Három hónapos Lika Pramenka bárány

FIGURE 3. Three-month-old lamb of the Lika Pramenka sheep breed (Croatian indigenous breed), from a commercial farm (farm „Živković“, Kvarter, Perušić, Croatia)



VIZSGÁLATI ELRENDEZÉS

A bárányokat véletlenszerűen három csoportra osztották (kontrollcsoport és két kísérleti csoport), mindegyik csoportban 14 bárány volt (hét nőstény és hét hím), a csoportokat külön karámban, de ugyanazon istállóban tartották. A 93 napos bárányok átlagos testtömege körülbelül $22,5 \pm 1,7$ kg volt. A kísérlet hat hétig tartott. A kontrollcsoportba tartozó bárányokat standard takarmánnyal etették (kukorica 45%, árpa 20%, búzakarpa 10%, szójabab 20%, vitamin és ásványi anyag keverék "Kruškovit bárányoknak" 5%), amelynek kémiai összetétele a következő volt: szárazanyag 87,8%, nyersfehérje 16,02%, nyersrost 4,65%, nyerszsír 2,50%, Ca 0,70%, P 0,51%. A "Kruškovit bárányoknak" (Kušić Promet d.o.o., Sv. Ivan Zelina, Horvátország) egy kg-ja tartalmaz: A vitamin (160,000 NE), D₃ vitamin (20 000 NE), E vitamin (400 mg), B₁ vitamin (20 mg), B₂ vitamin (35 mg), B₁₂ vitamin (200 µg), Niacin (250 mg), Pantoténsav (200 mg), kolin-klorid (2000 mg), Ca (125 g), P (30g), Fe (1,200 mg), I (15 mg), Mn (725 mg), Zn (1,275 mg), Se (3 mg).

A kísérleti csoportokat az *A. bisporus*-al kiegészített standard takarmánnyal etették. Az első kísérleti csoportban (ABP-csoport) a bárányokat 1,5%-os porított *A. bisporus* készítménnyel kiegészített takarmánnyal etették.

A második kísérleti csoportban (ABR-csoport) lévő bárányokat 15%-os nyers *A. bisporus*-al kiegészített táp-

LAMBS

Forty-two three-month-old lambs (21 female and 21 male), of the Lika Pramenka sheep breed (Croatian indigenous breed), were obtained from a commercial farm (farm „Živković“, Kvarter, Perušić, Croatia) reared in semi-extensive conditions. From birth to weaning and until the first day of treatment the lambs received the same diet and lived under the same husbandry conditions. After weaning, lambs were selected for this study according to their date of birth (90 days old). Before the experiment, all selected lambs were kept in one joint compartment, separated from other animals but within one large winter barn for three days to accommodate.

STUDY DESIGN AND PROCEDURES

Lambs were randomly divided into three groups (control group and two experimental groups) with 14 lambs in each group (seven females and seven males) and kept in individual pens within the same barn. Average body mass of the 93-day-old lambs was approximately 22.5 ± 1.7 kg. The experiment lasted six weeks. Lambs in the control group were fed on a standard diet (corn 45%, barley 20%, wheat bran 10%, soybean meal 20% and vitamin-mineral mixture "Kruškovit for lambs" 5%) of the following chemical composition: dry matter 87.80%, crude protein 16.02%, crude fibre 4.65%, crude fat 2.50%, Ca 0.70%, P 0.51%. "Kruškovit for lambs" (Kušić Promet d.o.o., Sv. Ivan Zelina, Croatia) per one kilogram contains Vit. A 160,000 IU, Vit. D₃ 20 000 IU, Vit. E 400 mg, Vit. B₁ 20 mg, Vit. B₂ 35 mg, Vit. B₁₂ 200 µg, Niacin 250 mg, Pantothenic acid 200 mg, Colin chloride 2.000 mg, Ca 125 g, P 30g, Fe 1,200 mg, I 15 mg, Mn 725 mg, Zn 1,275 mg, Se 3 mg).

Experimental groups were given the standard diet supplemented with *A. bisporus*. In the first experimental group (ABP group) lambs were fed on the standard diet supplemented with 1.5% of the dry formulation of *A. bisporus*. In the second experimental group (ABR group) lambs were fed on the standard diet supplemented with 15% of the raw formulation of

pal etették. A kísérlet során a bárányoknak *ad libitum* hozzáférést biztosítottak friss vízhez és ásványi sókhoz. A jelen kutatásban alkalmazott eljárások összhangban voltak az állatok kutatási célú gondozásával és használatával foglalkozó európai irányelvekkel (2010/63 / EK irányelv). A kísérletek a Zágrábi Egyetem Állatorvos-tudományi Karának, Állatkísérletek Etikai Bizottságának jóváhagyásával zajlottak (nyilvántartási szám: 640-01/13-17/36; ügyiratszám: 251/61-01/139-13-2).

MINTAVÉTELEK ÉS VIZSGÁLATOK

Hét nap elteltével, a reggeli etetés után (a kísérlet 0. napján), vérmintákat gyűjtöttek, a kiindulási értékek meghatározásának céljából. A második mintavételre a kontroll, ABP- és ABR-csoportok esetében, hat hét után került sor, amely idő alatt az *A. bisporus* nyers (ABR), ill. porított (ABP) formáját kapta a két csoport kiegészítő takarmányként. A vérvétel (5 ml) a *v. jugularis*-ból történt, véralvadásgátlót nem tartalmazó vákuumcsövekbe, 21G-s tűk (Beckton Dickinson, Plymouth, UK) segítségével. A biokémiai paraméterek meghatározására kereskedelmi forgalomban kapható kitéket használtak (Beckman Coulter Biomedical Limited, Lismeehan, O' Callaghan's Mills, Co. Clare, Ireland). A méréseket biokémiai automata segítségével végezték (Beckman Coulter AU 680, Beckman Coulter Biomedical Ltd., Ireland). A vizsgált paraméterek a glükóz (GLU), húgysav (BUN), koleszterin (CHOL), kreatinin (CREA), totál protein (TP), albumin (ALB) és totál bilirubin (TB), valamint az aszpartát aminosztransferáz aktivitásának (AST), az alanin transzamináz (ALT) és a gamma-glutamil transzferáz (GGT) voltak. A tanulmányban alkalmazott összes módszer a HRN EN ISO 15189 Medical Laboratories - Requirements for Quality and Competence (Orvosi Laborok - Minőségi és Kompetenciára vonatkozó) szabványainak megfelelő.

STATISZTIKAI ELEMZÉS

Az SAS 9.3 szoftvercsomag (Statistical Analysis Software, 2002 - 2008 by SAS Institute Inc., Cary, USA) segítségével végezték a statisztikai elemzést. Az adateloszlás normalitását a PROC TRANSREG modullal vizsgálták. Az átlánosított lineáris kevert modellt (PROC GLIMMIX) használták a különböző nemek és csoportok esetében, a biokémiai paraméterek koncentrációjának értékelésére. A nem normál eloszlású adatok (ALT) 10-es alapú logaritmusát vették. Az elemzés után, az adatok eredeti értékekre való visszaalakítására került sor, amelyeket a szövegben és a táblázatokban már ebben a formában tüntettünk fel. Az átlagok összehasonlításánál Tukey-Kramer többszörös összehasonlításos módszerét alkalmaztuk. A statisztikai szignifikancia értéke $p < 0.05$. A box plotokat az SAA 9.4 (SAS Institute Inc. Cary, USA) szoftvercsomag SGPLOT moduljával végeztük el, a vizs-

A. bisporus. During the experiment, the lambs always had access to water and mineral salt blocks. All procedures used in this research were in compliance with the European directives for the care and use of animals in research (Directive 2010/63/EC) and with the approval by the Ethics Committee for Animal Experimentation, Faculty of Veterinary Medicine, University of Zagreb, Croatia (records No.: 640-01/13-17/36; file No.: 251/61-01/139-13-2).

BLOOD SAMPLING AND ANALYSIS

After seven days of accommodation, in the morning after feeding (day 0 of the experiment), blood was collected in order to establish baseline levels. A second blood sampling was performed on the control, ABP and ABR groups after six weeks of supplementation with raw (ABR) or powdered (ABP) *A. bisporus*. Blood samples (5 mL) were taken from the jugular vein into vacuum tubes without anticoagulant, with a 21G needle (Beckton Dickinson, Plymouth, UK). Blood in the serum tubes was allowed to clot for at least 30 min prior to centrifugation. Sera samples were kept frozen at -20°C until biochemical analyses were performed. Biochemical parameters were determined by standard commercial kits (Beckman Coulter Biomedical Limited, Lismeehan, O' Callaghan's Mills, Co. Clare, Ireland) via an automatic analyser (Beckman Coulter AU 680, Beckman Coulter Biomedical Ltd., Ireland). Biochemistry panel parameters included glucose (GLU), urea (BUN), cholesterol (CHOL), creatinine (CREA), total protein (TP), albumin (ALB) and total bilirubin (TB), and activity of aspartate aminotransferase (AST), alanine transaminase (ALT) and gamma-glutamyl transferase (GGT). All methods used in this study were accredited according to the norm HRN EN ISO 15189, Medical Laboratories - Requirements for Quality and Competence.

STATISTICAL ANALYSIS

Software package SAS 9.3 (Statistical Analysis Software, 2002 - 2008 by SAS Institute Inc., Cary, USA) was used for statistical analysis. The normality of data distribution was tested using the module PROC TRANSREG. The general linear mixed model (PROC GLIMMIX) was used to analyse the concentrations of the biochemical parameters, based on the group and sex. The statistical model included the fixed effects group and sex, and their mutual interactions. Not normally distributed data (ALT) were transformed with a log transformation on the basis of 10. After analysis, the data were back-transformed to the original values and presented in the text or tables. Tukey-Kramer's method of multiple comparisons was used for means comparison. The level of statistical significance was $p < 0.05$. Box plots were made with the software package SAA 9.4 (SAS Institute Inc.

gált értékek osztályozása csoportok, ill. nemek alapján történt. Az összes adat átlaga, valamint a hozzájuk tartozó standard hiba (SE) került feltüntetésre.

EREDMÉNYEK

A vér biokémiai értékeinek eredményeit, beleértve a 0. napra vonatkozó kiindulási, a kontroll, ill. az ABR- és ABP-csoportok hat héttel később mért értékeit, a 1. táblázatban tüntettük fel (Táblázat). A vér biokémiai para-

Cary, USA) using module SGPLOT, and studied parameters were categorized by the group and grouped by gender. All data are presented as a mean \pm standard error of the mean (SE).

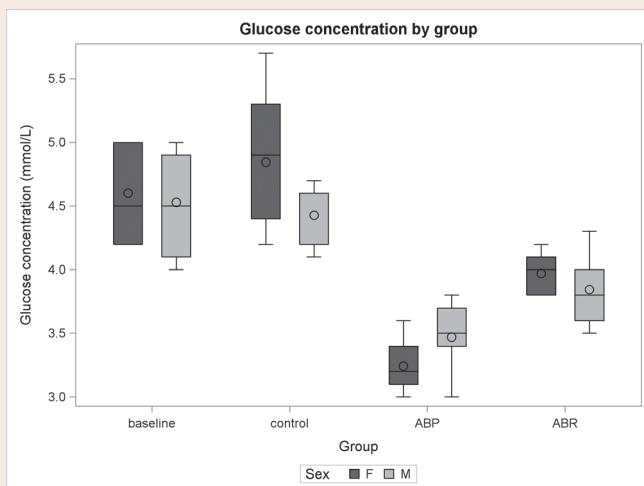
RESULTS

The results of the blood biochemical parameters including the baseline on day 0, and the control, ABR and ABP groups after six weeks are shown in Table.

TÁBLÁZAT. Az *Agaricus bisporus*-ból készített táplálékkiegészítő hatása a vér biokémiai paramétereire kos és jerke Lika Pramenka bárányoknál

TABLE. Effects of dietary supplementation with *Agaricus bisporus* on some blood biochemical parameters in male and female lambs, Lika Pramenka sheep breed

Parameters	Unit	*kiindulási/baseline (n = 14)				†control (n = 14)			
		nőstény/female		hím/male		nőstény/female		hím/male	
		Átlag/Mean	SE	Átlag/Mean	SE	Átlag/Mean	SE	Átlag/Mean	SE
GLU	(mmol/L)	4.60 ^{efgh}	0.12	4.52 ^{efgh}	0.12	4.84 ^{efgh}	0.12	4.43 ^{efgh}	0.12
CHO	(mmol/L)	1.51 ^{efgh}	0.05	1.48 ^{efgh}	0.05	1.48 ^{efgh}	0.05	1.51 ^{efgh}	0.05
BUN	(mmol/L)	4.79	0.14	4.80	0.14	4.80	0.14	4.76	0.14
CREA	(μ mol/L)	95.14	3.14	97.86	3.14	97.00	3.14	99.57	3.14
TB	(μ mol/L)	6.00	0.40	6.14	0.40	6.00	0.40	5.86	0.40
TP	(g/L)	75.21	0.95	75.24	0.95	74.86	0.95	74.76	0.95
ALB	(g/L)	28.83	1.21	30.56	1.21	28.19	1.21	30.54	1.21
AST	(U/L)	138.00	3.95	137.43	3.95	139.71	3.95	138.43	3.95
ALT	(U/L)	19.28	2.01	18.28	2.01	20.28	2.01	18.28	2.01
GGT	(U/L)	52.29	2.65	59.29	2.65	51.85	2.65	60.57	2.65



4. ÁBRA. Az *Agaricus bisporus* hatása táplálékkiegészítőként alkalmazva. Szérum glükóz-koncentráció értékek (mmol/L) Lika Pramenka kos és jerke bárányokban. Átlag \pm SE
Jelmagyarázat: kiindulási értékek – 42 egyedet számláló bárány-csoport (21 kos és 21 jerke) a kísérlet 0. napján; kontroll – 6 héti általános takarmányozással; ABP – 14 egyedet számláló bárány-csoport (7 kos és 7 jerke) hat héti általános takarmányozás kiegészítve porított *A. bisporus*-szal, f, ABR – 14 egyedet számláló bárány-csoport (7 kos és 7 jerke) hat héti általános takarmányozás kiegészítve nyers *A. bisporus*-szal

FIGURE 4. Effects of dietary supplementation with *Agaricus bisporus* on mean values (\pm SE) of blood glucose concentration (mmol/L) of male and female lambs, Lika Pramenka sheep breed

Legend: *baseline – group of 42 lambs (21 male and 21 female) on the day null of the experiment; †control – group of 14 lambs (7 male and 7 female) fed 6 for weeks on commercial diet; ‡ABP – group of 14 lambs (7 male and 7 female) fed for 6 weeks on commercial diet and powdered *A. bisporus*, §ABR – group of 14 lambs (7 male and 7 female) fed for 6 weeks pn commercial diet and raw *A. bisporus*

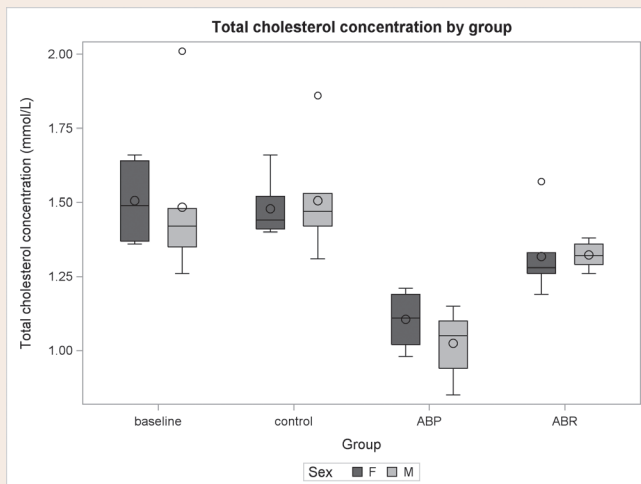
métereinek kiindulási értékei a KANEKO szerinti, juhokra vonatkoztatott referenciatartományba esnek (14), kivételt képez azonban a nagyobb vércukorszint, az emelkedett GGT-koncentráció, valamint az kisebb CREA- és ALT-koncentráció. A kisebb CREA- és nagyobb GGT-koncentráció a ŠIMPRAGA által meghatározott vérre vonatkozó kémiai paraméterek referencia tartományán belül található (25). A nemek között nem volt szignifikáns eltérés.

A nyersen, ill. porított formában *A. bisporus*-t tartalmazó táplálékkiegészítő hat hétig tartó etetését követően, statisztikai módszerekkel kimutatható eltérések voltak a vércukor, valamint a totálkoleszterin-értékeket tekintve a kontroll, az ABR és az ABP csoportok között. A vér glükózkoncentrációja szignifikánsan csökkent ($p < 0,0001$) mindkét nem esetében

The baseline levels of the blood chemistry parameters fit within the reference intervals for sheep as given from Kaneko (14), except for higher blood glucose and GGT concentrations and lower CREA and ALT concentrations. The lower CREA and higher GGT concentrations fit within the blood chemistry parameter reference intervals given from Šimpraga (25). There were no significant variations between sexes.

After six weeks of feed supplementation with either raw or powdered *A. bisporus*, there were no statistically significant variations in the biochemical parameters of either sex between the control, ABR and ABP groups, with the exception of blood glucose and total cholesterol. The blood glucose level significantly decreased ($p < 0.0001$) in groups ABP and

†ABP (n = 14)				§ABR (n = 14)			
nőstény/female		hím/male		nőstény/female		hím/male	
Átlag/Mean	SE	Átlag/Mean	SE	Átlag/Mean	SE	Átlag/Mean	SE
3.24 ^{abcdh}	0.12	3.47 ^{abcdh}	0.12	3.97 ^{abcdef}	0.12	3.84 ^{abcdef}	0.12
1.11 ^{abcdh}	0.05	1.02 ^{abcdh}	0.05	1.32 ^{abcdef}	0.05	1.32 ^{abcdef}	0.05
4.56	0.14	4.63	0.14	4.51	0.14	4.50	0.14
95.29	3.14	101.57	3.14	97.00	3.14	92.43	3.14
6.00	0.40	5.57	0.40	5.43	0.40	5.71	0.40
73.59	0.95	74.03	0.95	75.17	0.95	74.61	0.95
28.69	1.21	31.03	1.21	28.33	1.21	26.89	1.21
138.14	3.95	135.86	3.95	137.57	3.95	140.43	3.95
19.14	2.01	21.71	2.01	21.14	2.01	15.86	2.01
52.14	2.65	56.71	2.65	54.29	2.65	60.57	2.65



5. ÁBRA. Az *Agaricus bisporus* hatása táplálékkiegészítőként alkalmazva. Teljes koleszterin-koncentráció értékek (mmol/L) Lika Pramenka kos és jerke bárányokban. Átlag \pm SE
Jelmagyarázat: kiindulási értékek – 42 egyed számú báránycsoport (21 kos és 21 jerke) a kísérlet 0. napján; kontroll – 6 hétig általános takarmányozással; ABP – 14 egyed számú báránycsoport (7 kos és 7 jerke) hat hétig általános takarmányozás kiegészítve porított *A. bisporus*-szal. f, ABR – 14 egyed számú báránycsoport (7 kos és 7 jerke) hat hétig általános takarmányozás kiegészítve nyers *A. bisporus*-szal

FIGURE 5. Effects of dietary supplementation with *Agaricus bisporus* on mean values (\pm SE) of blood total cholesterol concentration (mmol/L) of male and female lambs, Lika Pramenka sheep breed

Legend: *baseline – group of 42 lambs (21 male and 21 female) on the day null of the experiment; †control – group of 14 lambs (7 male and 7 female) fed 6 for weeks on commercial diet; ‡ABP – group of 14 lambs (7 male and 7 female) fed 6 for weeks on commercial diet and powdered *A. bisporus*; §ABR – group of 14 lambs (7 male and 7 female) fed for 6 weeks on commercial diet and raw *A. bisporus*

az ABP-, valamint az ABR-csoportokban, a kontrollcsoporthoz, valamint a kiindulási értékekhez viszonyítva. A vér glükózsintjét összehasonlítva a kiegészítő takarmányt fogyasztó csoportok között azt tapasztaltuk, hogy az ABP-csoport értékei szignifikánsan kisebbek ($p < 0,0001$) voltak az ABR csoporthoz képest (4. ábra). A totálkoleszterin-koncentrációk ugyanezt a tendenciát követték. Az ABP-csoportban szignifikánsan kisebb ($p < 0,0001$) totálkoleszterin-koncentrációt figyeltünk meg a kiindulási értékekkel, valamint az ABR-csoport értékeivel összehasonlítva. A nemek között szignifikáns eltérés nem volt megfigyelhető (5. ábra).

MEGVITATÁS

Korábbi kutatások kimutatták, hogy az *A. bisporus* használatok kezelésében kiválóan helyettesíti a nem terápiai célból alkalmazott antibiotikumokat, immunstimuláló tulajdonságának (10, 11, 18, 26), valamint az állati termék mennyiségére és minőségére kifejtett negatív hatásoktól való mentességének köszönhetően.

Jelen kísérlet keretein belül szemléltettük, hogy a nyersen alkalmazott *A. bisporus*, valamint a belőle készített por egyaránt szignifikánsan csökkentette bárányokban a szérum glükóz koncentrációját, ill. a szérum totálkoleszterin-koncentrációját, amely eredmény összhangban van korábbi kutatások eredményeivel (3, 13). Az említett közleményekben a szerzők kísérleteiket kettős típusú cukorbetegségben szenvedő patkányokon végezték, amelyek eredményeképpen arra jutottak, hogy az *A. bisporus* hatása a glükóz- és koleszterin-anyagcserére a gomba nagy rosttartalmának (19%), továbbá vélhetőleg egyéb szénhidrát-összetevőnek köszönhető. Felmerült továbbá, hogy a porított forma vércukorszint-csökkentő hatásáért a poliszacharidokban és oligoszacharidokban gazdag *A. bisporus* bakterális fermentációja felel. A bakterális fermentáció eredményeképpen a szénhidrátokból rövidláncú zsírsavak keletkeznek, úgymint acetát, propionát és butirát (13), amit a kérődzők azonnal hasznosítani tudnak a mikrobiális ATP-szintézishez (24). A glükózsint változása lehet egy lecithinhez hasonló molekula hatása is, amelyet az *A. bisporus* tartalmaz. *In vitro* kísérletekben kimutatták, hogy ez a molekula stimulálja az inzulin és glukagon felszabadulást a Langerhans-szigetek sejtjeiből (1), ami szabályozza a glükózanyagcserét. Bárányokban nem tisztázott a koleszterinszint-csökkentő hatás folyamata, azonban patkányokban, a rövidláncú zsírsavak, úgy mint a rostból, bakterális emésztés következtében létrejövő propionát, gátolta a máj koleszterinszintézisét (6). CHEUNG szintén leírta a gombarostok esetleges epesavkötő hatását, amely eredményezheti azok csökkent belépését az enterohepatikus körforgásba (7). Ebben az esetben a máj,

ABR in both sexes compared to the control group and baseline. When the blood glucose levels were compared between the supplemented groups, there was a significantly ($p < 0.0001$) lower level in the ABP group than in the ABR group (Figure 4.).

Total cholesterol concentrations showed the same trend. The ABP group had a significantly ($p < 0.0001$) lower total cholesterol concentration compared with the baseline and the control and ABR groups. There was no significant variation between sexes (Figure 5.).

DISCUSSION

Previous research showed that *A. bisporus* is a good replacement for the non-therapeutic antibiotics used in livestock due to its immunostimulatory properties (10, 11, 18, 26) and absence of adverse effects on the size and the quality of the animals produced.

In the present study, we demonstrated that the raw fruiting bodies of *A. bisporus* and the *A. bisporus* powder have significant decreasing effects on serum glucose and total serum cholesterol activities in lambs, which agrees with results reported from Bobek (3) and Jeong (13). Those authors did their research on rats with type 2 diabetes, and they concluded that the effect of *A. bisporus* on glucose and cholesterol metabolism could be a result of the high dietary fibre content (19%) of the mushroom and possibly other carbohydrate components. They also suggested that another explanation for the glucose-lowering effect of ABP could be bacterial fermentation of *A. bisporus* which is rich in polysaccharides and oligosaccharides. Bacterial fermentation of these carbohydrates leads to production of short-chain fatty acids such as acetate, propionate, and butyrate (13), which in ruminants are readily used by rumen micropopulations for microbial ATP synthesis (24). Glucose modulation could also be an effect of a lecithin-like molecule that *A. bisporus* contains. It has been shown *in vitro* that this molecule stimulates insulin and glucagon release from the islet cells (1) which regulate glucose metabolism. The mechanism of the total cholesterol-lowering effect in lambs is unclear, but in rats, short chain fatty acids such as propionate, generated by bacterial fermentation of dietary fibre, have inhibited hepatic cholesterol synthesis (6). Also, Cheung (7) suggested that mushroom dietary fibre might bind bile acids which could result in their decreased entry into the enterohepatic circulation. In that case, the liver would respond by increasing cholesterol transformation into bile acids which results in lower blood cholesterol concentrations (13).

This is the first investigation on the effects of dietary supplementation with *A. bisporus* performed in

a koleszterin epesavakká történő transzformációját növelné, ami kisebb plazma koleszterin-koncentrációt eredményezne (13).

Jelen vizsgálat az első az *A. bisporus* táplálékkiegészítőként történő alkalmazásának hatásaira vonatkozóan, amit kérődzőkön végeztek. Az eredmény összhangban van a különböző fajoknál tapasztaltakkal.

Jelen kísérlet az *A. bisporus*nak bárányok takarmányozásában táplálékkiegészítőként való alkalmazásának a vér glükóz és totál koleszterin koncentrációjának csökkentő hatását támasztotta alá. A négy és fél hónapos bárányokon végzett vizsgálatok természetesen nem általánosíthatók az összes kérődzőre. A korcsoport kiválasztásának magyarázata, hogy Horvátországban a Lika Pramenka bárányokat 90 és 160 nap között vágják le. További kutatások szükségesek hogy pontosan megismerjük a glükóz és koleszterin anyagcseréjében bekövetkező változásokat, és ha bebizonyosodik, hogy a glükóz és a koleszterin csökkenése, a bárányhús kisebb koleszterintartalmát eredményezi, az nagyban segítheti a fogyasztó társadalom emelkedett koleszterinszintjének és anyagcserezavarainak esetleges megelőzését is.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Jelen tanulmány a Horvát Tudományos Alapítvány (Croatian Science Foundation) támogatását élvezte az INNOVATIVE FUNCTIONAL LAMB MEAT PRODUCTS (HRZZ-IP-06-2016-3685), azaz az innovatív funkcionális bárányhúsból készült termékek projektjének keretein belül.

ruminants, and the results indicate a similarity between species that have significantly different digestive physiologies and metabolism.

Other mushroom constituents should not be forgotten as they may also play an important role in both glucose and cholesterol modulation. In this study, the mechanism of how supplements from *A. bisporus* modulates glucose and cholesterol was not addressed, and further research is indisputably necessary to investigate the exact changes in glucose and cholesterol metabolism not only in ruminants but also in other productive animals.

Our study indicated that feed supplementation with *A. bisporus* had lowering effects on both blood glucose and total cholesterol concentrations in lambs. Although four and a half months old lambs do not seem as a good model for a ruminant, we have chosen this age group due to the traditional age of lika pramenka lambs slaughtered in Croatia (between 90 to 160 days). Further research is necessary to determine the exact effect on glucose and cholesterol metabolism and if the decrease in glucose and cholesterol leads to lower cholesterol in lamb meat because that could help prevent hypercholesterolemia and metabolic disturbances in human consumers.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work has been fully supported by Croatian Science Foundation under the project INNOVATIVE FUNCTIONAL LAMB MEAT PRODUCTS (HRZZ-IP-06-2016-3685).

MUNKAHELYEK / AFFILIATIONS

1. Department of Physiology and Radiobiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Zagreb, Zagreb, Croatia
2. Department of Biology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Zagreb, Zagreb, Croatia
*e-mail: mpopovic22@gmail.com
3. Department of Pathophysiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Zagreb, Zagreb, Croatia
4. OPG Živković, Kvarter, Perušić, Croatia
5. Department of Obstetrics and Reproduction, Faculty of Veterinary Medicine, University of Zagreb, Zagreb, Croatia
6. Department of Anatomy, Histology and Embryology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Zagreb, Zagreb, Croatia
7. Forensic Science Centre "Ivan Vučetić", Ministry of Interior Business, Zagreb, Croatia
8. Institute of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, Merkur University Hospital, Zagreb, Croatia
9. Department of Animal Nutrition, Faculty of Veterinary Medicine, University of Zagreb, Zagreb, Croatia

IRODALOM / BIBLIOGRAPHY

1. AHMAD, N. – BANSAL, R. et al.: Effect of PHA-B fraction of *Agaricus bisporus* lectin on insulin release and $^{45}\text{Ca}^{2+}$ uptake by islets of Langerhans *in vitro*. *Acta Diabetol. Lat.*, 1984. 21. 63–70.
2. BARROS, L. – BAPTISTA, P. I. C – FERREIRA, F. R.: Effect of *Lactarius piperatus* fruiting body maturity stage on antioxidant activity measured by several biochemical assays. *Food Chem. Toxicol.*, 2007. 45. 1731–1737.
3. BOBEK, P. – GINTER, E. et al.: Cholesterol-lowering effect of the mushroom *Pleurotus ostreatus* in hereditary hypercholesterolemic rats. *Ann. Nutr. Metab.*, 1991. 35. 191–195.
4. CHANG, S. T. – MILES, P. G.: Mushrooms cultivation, nutritional value, medicinal effect and environmental impact. *CRC Press Boca Raton, Second Edition* London, New York, Washington DC. 2004. 451.
5. CHANG, S. T. – WASSER, S. P.: The role of culinary-medicinal mushrooms on human welfare with a pyramid model for human health. *Int. J. Med. Mushrooms*, 2012. 14. 95–134.
6. CHEN, W. J. – ANDERSON, J. W. – JENNINGS, D.: Propionate may mediate the hypocholesterolemic effects of certain soluble plant fibers in cholesterol-fed rats. *P. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1984. 175. 215–218.
7. HEUNG, P. C. K.: The hypocholesterolemic effect of two edible mushrooms: *Auricularia auricula* (tree-ear) and *Tremella fuciformis* (white jelly-leaf) in hypercholesterolemic rats. *Nutr. Res.*, 1996. 16. 1721–1725.
8. CUENO, R. P. – MORILLO, T. B. et al.: Evaluation of Beta-Glucan and Antibiotics on Growth Performance and Carcass Traits of Weanling and Finishing Pigs. Copyright Oklahoma Agriculture Experiment Station. 2004.
9. FERREIRA, I. C. F. R. – BARROS, L. – ABREU, R. M. V.: Antioxidants in wild mushrooms. *Curr. Med. Chem.*, 2009. 16. 1543–1560.
10. GIANNENAS, I. – TONTIS, D. et al.: Influence of dietary mushroom *Agaricus bisporus* on intestinal morphology and microflora composition in broiler chickens. *Res. Vet. Sci.*, 2010. 89. 78–84.
11. GIANNENAS, I. – TSALIE, E. et al.: Consumption of *Agaricus bisporus* mushroom effects the performance, intestinal microbiota composition and morphology, and antioxidant status of turkey poults. *Anim. Feed Sci. Tech.*, 2011. 165. 218–229.
12. HAHN, T. W. – LOHAKARE, J. D. et al.: Effects of supplementation of β -glucans on growth performance, nutrient digestibility. *J. Anim. Sci.*, 2006. 84. 1422–1428.
13. JEONG, S. C. – JEONG, Y. T. et al.: White button mushroom (*Agaricus bisporus*) lowers blood glucose and cholesterol levels in diabetic and hypercholesterolemic rats. *Nutr. Res.*, 2010. 30. 49–56.
14. KANEKO, J. J. – HARVEY, J. W. – BRUSS, M. L.: *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. 6th ed., Academic Press, Inc., San Diego, London, Boston, New York, Sydney, Tokyo, Toronto. 2008. 882–888.
15. KHALKHANE, A. S. – ABBASI, K. et al.: Effect of dietary beta-glucan supplementation on humoral and cellular immunologic factors in lambs. *Global Veterinaria* 1, 2013. 11. 38–43.
16. LI, J. – LI, D. F. et al.: Effects of β -glucan extracted from *Saccharomyces cerevisiae* on growth, performance and immunological and somatotrophic responses of pigs challenged with *Escherichia coli* lipopolysaccharide. *J. Anim. Sci.*, 2006. 84. 2374–2381.
17. MANZI, P. – PIZZOFRERATO, L.: Beta-glucans in edible mushrooms. *Food Chem. Toxicol.*, 2000. 68. 315–318.
18. MRŠIĆ, G. – ŠPOLJARIĆ, D. et al.: Immunomodulatory effects of white button *Agaricus bisporus* supplementation in broiler chickens. *Vet. Stanica*, 2011. 42. 431–439.
19. MRŠIĆ, G. – PETEK, M. J. et al.: Chemical evaluation of the quality of meat of broilers fed with the supplement from button mushroom. *Agaricus bisporus*. (*In Croatian*), 2013. 4. 321–327.
20. NOVAK, B.: Farming of eatable and curative mushrooms. Croatian Agricultural Society, Zagreb. 1997.
21. PEREIRA, E. – BARROS, L. et al.: Towards chemical and nutritional inventory of Portuguese wild edible mushrooms in different habitats. *Food Chem.*, 2012. 130. 394–403.
22. REIS, F. S. – BARROS, L. et al.: Chemical composition and nutritional value of the most widely appreciated cultivated mushrooms: an inter-species comparative study. *Food Chem. Toxicol.*, 2012. 50. 191–197.
23. SANTA, H. S. D. – RUBEL, R. et al.: *Agaricus brasiliensis* – enriched functional product promotes in mice increase in HDL levels and immunomodulate to Th1 CD4-T subsets. *Curr. Trends Biotechnol. Pharm.*, 2010. 4. 957–970.
24. SEJRSEN, K. – HVELPLUND, T. – NIELSEN, M. O.: Ruminant physiology: Digestion, metabolism and impact of nutrition on gene expression, immunology and stress. *Wageningen Academic Publishers, Netherlands*, 2008. 55. 135.
25. ŠIMPRAGA, M. – ŠMUC, T. et al.: Reference intervals for organically raised sheep: Effects of breed, location and season on hematological and biochemical parameters. *Small Ruminant Res.*, 2013. 112. 1–6.
26. ŠPOLJARIĆ, D. – SREČEC, S. et al.: The effects of feed supplemented with *Agaricus bisporus* on health and performance of fattening broilers. *Vet. Arhiv*, 2015. 85. 309–322.
27. ŠPIRANEC, K. – POPOVIĆ, M. et al.: The metabolic properties of quadriceps femoris muscle of Lika pramenka sheep breed, fed with a supplement from button mushrooms (*Agaricus bisporus*). *Vet. Arhiv*, 2016. 86. 541–551.
28. WASSER, S. P.: Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. *Appl. Microbiol. Biot.*, 2002. 60. 258–274.
29. WASSER, S. P.: Medicinal mushroom science: History, current status, future trends, and unsolved problems. *Int. J. Med. Mushrooms*, 2010. 12. 1–16.
30. WU, D. – PAE, M. et al.: Dietary supplementation with white button mushroom enhances natural killer cell activity in C57BL/6 mice. *J. Nutr.*, 2007. 137. 1472–1477.
31. ZHANG, B. – GUO, Y. – WANG, Z.: The modulating effect of β -1, 3/1, glucan supplementation in the diet on performance and immunological responses of broiler chickens. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.*, 2008. 21. 237–244.

Közlésre érkezik: 2016. nov. 25.