

**JIHOČESKÁ UNIVERZITA
V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH**

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

Senzoricky aktivní sloučeniny houževnatce jedlého

bakalářská práce

Iveta Štefanová

Školitel: doc. Ing. Roman Kubec, Ph.D.

(Katedra aplikované chemie, ZF JU)

České Budějovice 2013

Štefanová, I. (2013): Sensoricky aktivní sloučeniny houževnatce jedlého. [Sensory active compounds of shiitake mushroom]- 29 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace

Tato bakalářská práce se zabývá studiem sirných sloučenin houby houževnatce jedlého (*Lentinula edodes*) z čeledi Agaricaceae.

Teoretická část popisuje její výskyt, umělou kultivaci a také shrnuje současný stav problematiky týkající se nejvýznamnějších sloučenin této houby. Hlavní pozornost je soustředěna na sensoricky aktivní sirné sloučeniny vznikající z netěkavého prekursoru, lentinikové kyseliny.

Experimentální část je zaměřena na izolaci a spektrální charakterizaci nejvýznamnějších sensoricky aktivních sloučenin. Dalším cílem bylo testování antimikrobiální aktivity hlavní sirné sloučeniny, lenthioninu (1,2,3,5,6-pentathiepanu), mikrodiluční metodou. Zjištěné minimální inhibiční koncentrace byly porovnány s aktivitou komerčně dostupných antibiotik.

Annotation

This Bachelor's thesis deals primarily with sulfur-containing compounds of the mushroom *Lentinula edodes* which belongs to the family Agaricaceae.

The theoretical part describes its occurrence, artificial cultivation, and also summarizes the current state of knowledge related to the most important compounds found in this mushroom. It is focused mainly on the sensory active compounds formed from a non-volatile precursor lentinic acid.

The experimental part was focused on the isolation and spectral characterization of the most important sensory active compounds. The other aim of this thesis was to test the antimicrobial activity of lenthionine (1,2,3,5,6-pentathiepane) by the microplate method. The minimal inhibitory concentration observed was compared to the activity of several commercially available antibiotics.

Prohlášení

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne 23. 4. 2013

.....

Poděkování

Touto cestou bych ráda poděkovala doc. Ing. Romanu Kubcovi, Ph.D. za cenné rady a trpělivost při vedení této bakalářské práce.

Další velký dík patří Ing. Petře Krejčové a Ing. Petře Kučerové za odbornou pomoc a přátelské prostředí, které mi bylo poskytnuto.

V neposlední řadě patří mé poděkování doc. Ing. Ivanu Mrázovi, CSc. z Ústavu molekulární biologie rostlin (Biologické centrum AV ČR) za možnost testovat antimikrobiální aktivitu získaných látek.

Obsah

1	CÍLE PRÁCE.....	1
2	ÚVOD	2
2.1	HOUŽEVNATEC JEDLÝ.....	3
2.2	BIOLOGICKY AKTIVNÍ SLOUČENINY HOUŽEVNATCE JEDLÉHO.....	6
2.2.1	<i>Lentiniková kyselina</i>	<i>6</i>
2.2.2	<i>Těkavé sírné sloučeniny.....</i>	<i>8</i>
2.2.3	<i>Biologická aktivita sloučenin.....</i>	<i>9</i>
3	MATERIÁL A METODY	11
3.1	MATERIÁL	11
3.1.1	<i>Chemikálie.....</i>	<i>11</i>
3.1.2	<i>Přístroje a zařízení</i>	<i>12</i>
3.2	METODY	12
3.2.1	<i>Izolace sensoricky aktivních sloučenin metodou přímé extrakce</i>	<i>12</i>
3.2.2	<i>Separace majoritních sloučenin</i>	<i>13</i>
3.2.3	<i>Identifikace sensoricky aktivních sloučenin pomocí GC/MS.....</i>	<i>14</i>
3.2.4	<i>Antimikrobiální aktivita.....</i>	<i>14</i>
4	VÝSLEDKY	17
4.1	HPLC/PDA ANALÝZA ZÍSKANÝCH EXTRAKTŮ.....	17
4.2	IDENTIFIKACE SENZORICKY AKTIVNÍCH SLOUČENIN POMOCÍ GC/MS.....	18
4.3	ANTIMIKROBIÁLNÍ AKTIVITA.....	21
5.	DISKUZE	22
6	ZÁVĚR	25
7	REFERENCE	26
8	POUŽITÉ ZKRATKY	29
9	PŘÍLOHY	30

1 Cíle práce

- A. optimalizace metody pro izolaci senzoričky aktivních sloučenin houževnatce jedlého,
- B. izolace nejvýznamnějších sloučenin metodou HPLC/PDA,
- C. spektrální charakterizace frakcí,
- D. testování antimikrobiální aktivity vybraných frakcí mikrodiluční metodou.

2 Úvod

Infekční onemocnění zůstávají i nadále jednou z hlavních hrozeb pro lidské zdraví. Mnoho antibiotik pro klinické využití bylo izolováno z plísní nebo z bakterií řádu *Actinomycetales*. Ačkoliv produkce významných antibiotik (penicilin, cefalosporin a griseofulvin) některými druhy hub je dobře známa, výskyt sloučenin s antimikrobiální aktivitou v houbách je stále nedostatečně zdokumentovaný (YAMAC & BILGILI, 2006).

Houby potřebují pro přežití v jejich přirozeném prostředí antibakteriální a antimykotické látky. Není proto překvapivé, že antimikrobiální sloučeniny s různou aktivitou mohou být izolovány z mnoha druhů hub, a mohou tak být výrazným přínosem pro lidské zdraví (LINDEQUIST *et al.*, 1990). Mezi jedlé houby, u kterých byly prokázány léčivé účinky, patří již od starověku houževnatec jedlý (*Lentinula edodes* (Berk.) Pegler 1976). Tato houba potenciálně představuje obrovský a přesto do značné míry nevyužitý zdroj nových biologicky aktivních sloučenin. Zejména se jedná o velké množství polysacharidů s protinádorovými a imunomodulačními vlastnostmi (WASSER, 2002). Antibakteriální aktivita je další velmi zajímavou vlastností této houby prokázanou několika studiemi (MORITA & KOBAYASHI, 1967; ISHIKAWA *et al.*, 2001; BISEN, 2010). S rostoucí odolností bakterií vůči antibiotikům mohou být tyto studie cestou vpřed v boji proti bakteriálním infekcím (HASSEGAWA *et al.*, 2005). Antimikrobiální aktivita byla zjištěna u různých extraktů z *Lentinula edodes*. Vykazují např. aktivitu proti některým kvasinkám, grampozitivním i gramnegativním bakteriím. Příkladem může být *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* či *Escherichia coli* (BISEN *et al.*, 2010).

Díky svým biologickým účinkům našla tato houba také uplatnění v léčbě nebo prevenci závažných zdravotních onemocnění jako je např. rakovina nebo syndrom získaného selhání imunity (BISEN *et al.*, 2010).

Přestože mnoho studií prokázalo léčebné účinky této houby, zůstává stále mnoho nepoznaných oblastí, pro které si *Lentinula edodes* zaslouží detailnější zkoumání.

2.1 Houževnatec jedlý

Shiitake, česky houževnatec jedlý (*Lentinula edodes* (Berk.) Pegler 1976), dále jen *LE*, se řadí do říše *Fungi* - houby, oddělení *Basidiomycota* - houby stopkovýtrusé a čeledi Agaricaceae - pečárkovité. Druhy z čeledi Agaricaceae jsou saprofyty, způsobující degradaci dřeva a ligninových/celulosových materiálů. Některé z nich, včetně *LE*, se staly populárními díky svým senzoryckým vlastnostem (zejména chuti a vůni). Stopkovýtrusé houby (*Basidiomycota*) jsou na základě způsobu degradace dřeva klasifikovány jako houby bílého tlení a houby hnědého tlení. *LE* patří mezi houby bílého tlení, které produkují komplex enzymů umožňující degradaci všech dřevěných komponentů (SILVA *et al.*, 2007).



a)



b)

Obrázek 1: Plodnice *Lentinula edodes* a) čerstvé^a, b) sušené^b.

LE (Obrázek 1) je jedlá houba pocházející z východní Asie. Jedná se o dřevokaznou houbu napadající v teplém a vlhkém klimatu zejména listnaté stromy, např. dub, kaštan, buk, javor, topol, olši a moruši (RAHMAN & CHOUDHURY, 2012).

V různých částech světa je *LE* známý pod různými jmény. Název shiitake je odvozen od japonských slov „shii“ znamenající dub a „take“ ve významu houba. Shiitake je zdaleka nejpopulárnějším označením této houby. V USA je však také známa jako černá lesní houba,

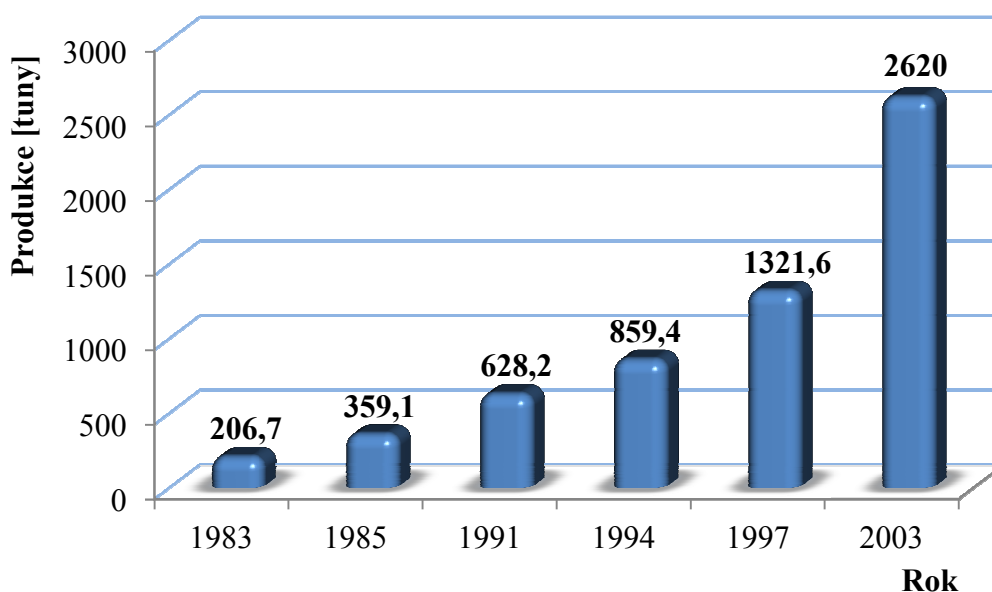
Zdroj:

^a <http://foodsforlonglife.blogspot.cz/2011/02/spicy-vegan-quinoa-with-asparagus-and.html> k 1. 8. 2012

^b http://1.bp.blogspot.com/_OPKpPIV_46E/SvBjW9CnICI/AAAAAAAAAIIs/rC7HDh_RkJE/s1600-h/320+med.jpg k 1. 8. 2012

ve Francii jako lektin a v Číně např. xiang-gu, vonné žampiony, gong-du, zimní houby nebo hua-gu (CHEN, 2001).

LE obsahuje ergosterol, který se působením UV záření rozkládá na vitamin D₂. Další předností je vysoký obsah nenasycených mastných kyselin, vitaminů, minerálů a všech esenciálních aminokyselin. Své uplatnění stále častěji nachází jako součást pokrmů zdůrazňujících chuť. Po uvaření dodává pokrmům výrazné česnekové aroma a chuť při současném zachování barvy a struktury. Využívá se v čerstvé i sušené formě. Aroma čerstvých a sušených plodnic *LE* je ovšem výrazně odlišné. Za tuto skutečnost nese odpovědnost různý obsah těkavých sloučenin, který se jakoukoliv úpravou značně mění. Obecně sušené plodnice *LE* vykazují intenzivnější sensorické vlastnosti (LEATHAM, 1982; BISEN, 2010).



Obrázek 2: Světová produkce *Lentinula edodes* (CHANG, 2002; CHANG, 2005).

Světová produkce *LE* (Obrázek 2) byla v roce 1983 zhruba 206 700 tun. Do roku 1997 se zvýšila na 1 321 600 tun. Během těchto 14 let bylo dosaženo nárůstu v produkci o 539 % s průměrným ročním zvýšením o 38 %. Světová produkce v roce 2003 pokořila hranici 2 620 000 tun, což od roku 1986 představuje zvýšení produkce o 734 % (CHANG, 2002; CHANG, 2005).

Velký nárůst produkce a využití *LE* je způsoben pokrokem technologií umělého kultivačního procesu, zejména kultivací plodnic na umělých substrátech v plastových pytích.



Obrázek 3: *Lentinula edodes*: a) kultivace na kmenech stromů^c, b) detail růstu^d.

Za tradiční metodu však lze označit pěstování na kmenech stromů (Obrázek 3). Tento způsob kultivace využívá lesního prostředí a má stále několik výhod před kultivací na umělých substrátech. Kůra stromu poskytuje, díky nízkému obsahu vody, ochranu mycelia před mikroorganismy (LEATHAM, 1982). Obecně, platí, že *LE* produkované kultivací na kmenech stromů obsahují mnohem více polysacharidů než při kultivaci na umělém substrátu (BRAUER *et al.*, 2002).

Geografická distribuce *LE* v přírodě zasahuje i mimo severovýchodní Asii, ale přesné hranice rozšíření nejsou dosud známy. Minimálně se však vyskytuje na území od severního Japonska přes Tasmanii, Nový Zéland a himalájské oblasti Bhútánu, Nepálu a Indie (PEGLER, 1983; SHIMOMURA *et al.*, 1992). Divoké populace houby *LE* se také objevily na pobřeží Mexického zálivu v Severní Americe, Karibiku, Střední Americe a v severních částech Jižní Ameriky. Pouze Evropa a Afrika zatím nezaznamenaly výskyt této jedlé houby (PEGLER, 1983).

Zdroj:

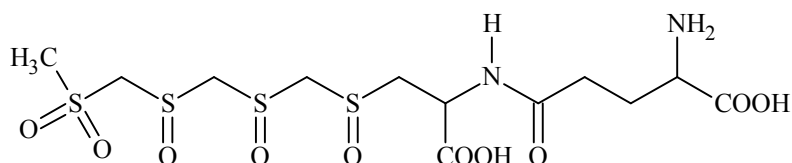
^c <http://www.flickr.com/photos/cornellfungi/4696543564/sizes/n/in/photostream/> k 1. 8. 2012

^d <http://www.bioart.co.uk/culture/shiitake.html> k 1. 8. 2012

2.2 Biologicky aktivní sloučeniny houževnatce jedlého

2.2.1 Lentiniková kyselina

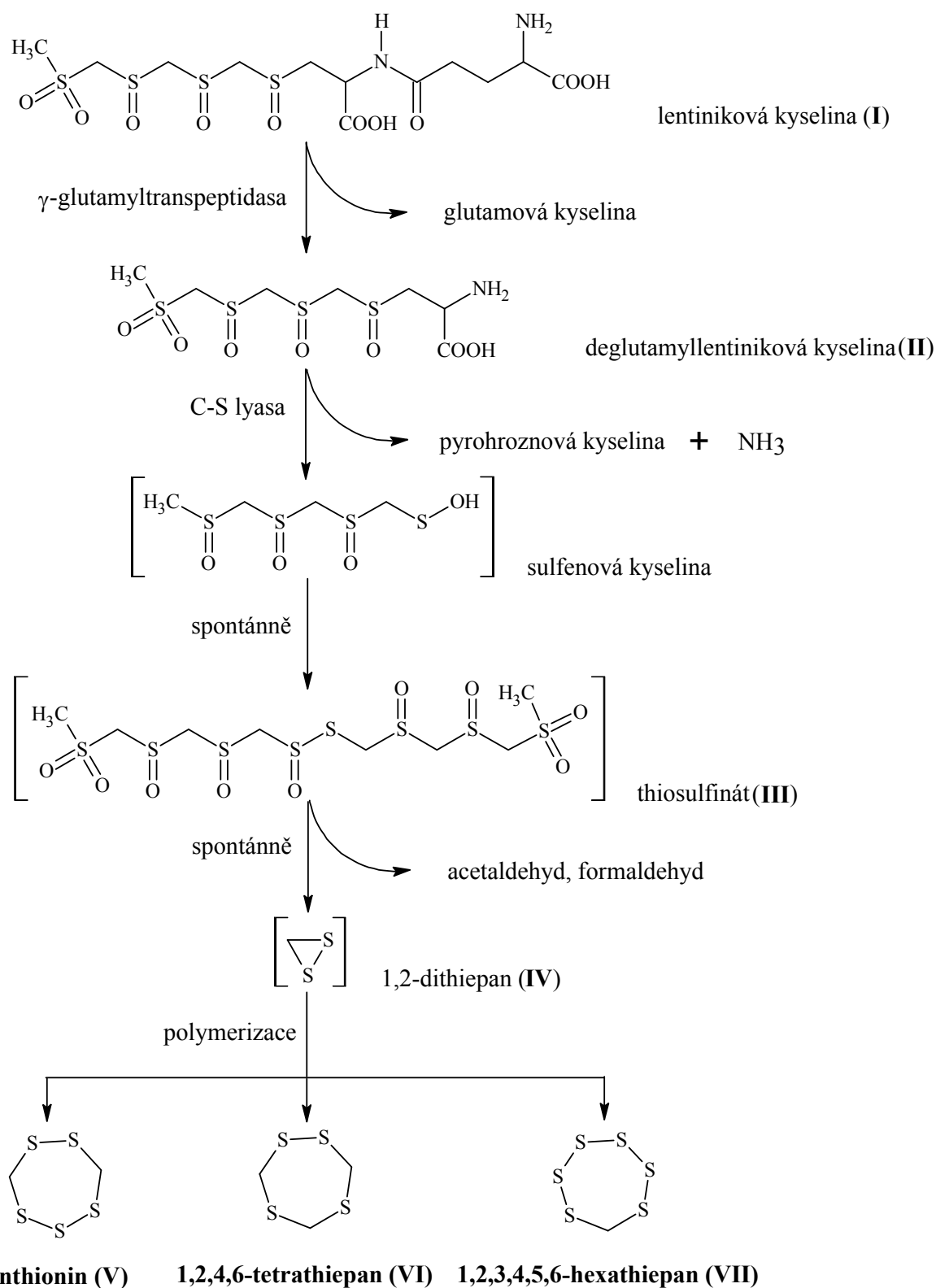
Provedené studie (YASUMOTO *et al.*, 1971) ukázaly, že hlavní chuťová složka *LE*, lenthionin (**V**) (1,2,3,5,6-pentathiepan), vzniká enzymaticky z netěkavého prekurzoru triviálně nazývaného lentiniková kyselina (**I**). Tato sloučenina byla identifikovaná jako 2-(γ -glutamylamino)-4,6,8,10,10-pentaoxo-4,6,8,10-tetrathioundekanová kyselina. Strukturu lentinikové kyseliny (**I**) uvádí Obrázek 4.



Obrázek 4: Struktura lentinikové kyseliny (**I**).

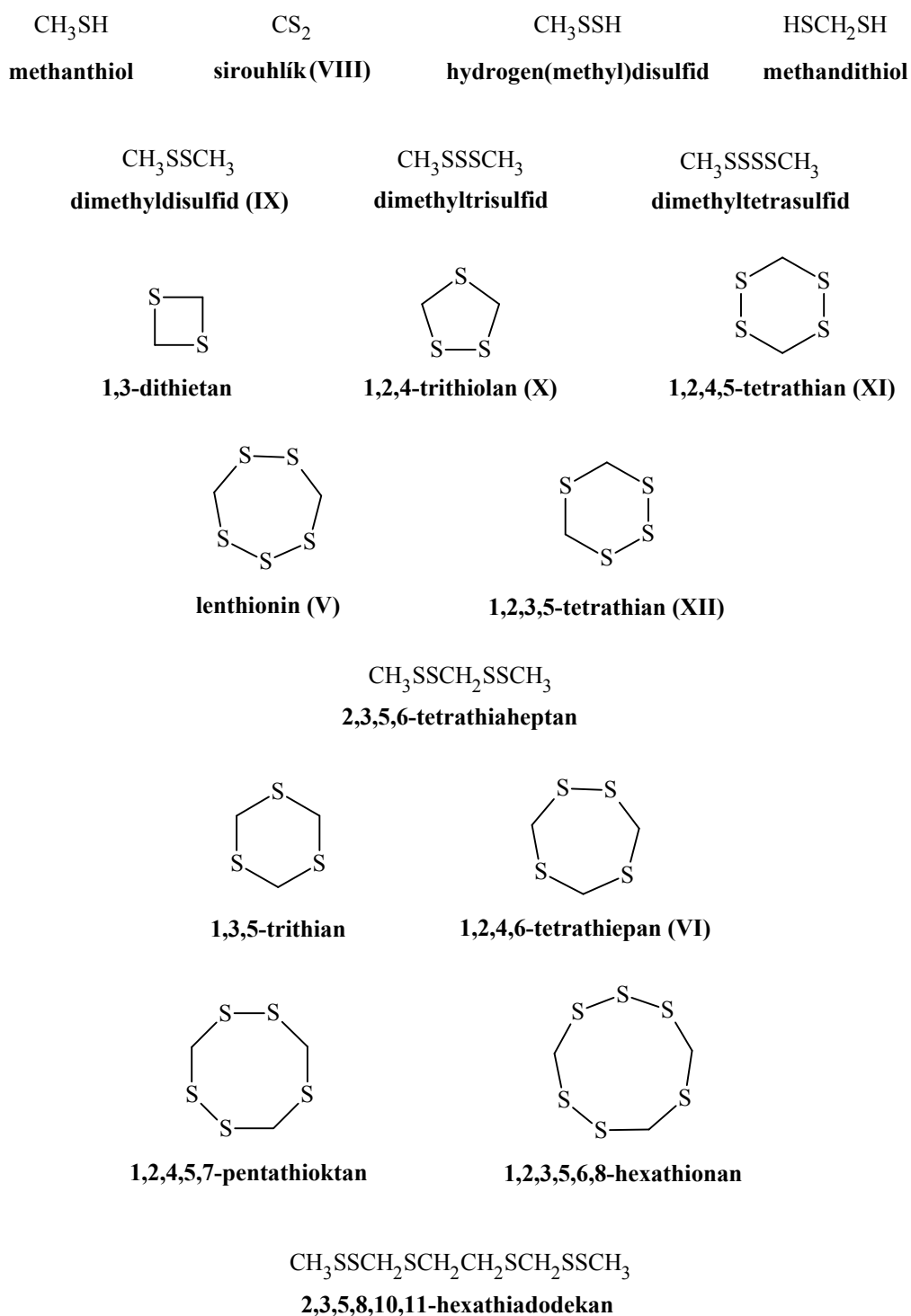
Tvorba senzorycky aktivních sírných sloučenin z lentinikové kyseliny zahrnuje dvě hlavní fáze. Enzymově katalyzovaný rozklad lentinikové kyseliny a poté spontánní polymeraci vzniklého 1,2-dithiepanu (**IV**). Přeměnu lentinikové kyseliny (**I**) na těkavé sírné sloučeniny katalyzují enzymy γ -glutamyltransferasa a C-S lyasa.

γ -Glutamyltransferasa zajišťuje rozštěpení dipeptidické vazby v lentinikové kyselině (**I**) a C-S lyasa následně katalyzuje β -eliminaci vytvořené deglutamyl-lentinikové kyseliny (**II**) za vzniku amoniaku, pyrohroznové kyseliny a thiosulfinátu (**III**). Tento thiosulfinát (**III**) spontánně podléhá přeměně na cyklické polythiepany včetně lenthioninu (**V**) (IWAMI *et al.*, 1975). Mechanismus tvorby sírných sloučenin z lentinikové kyseliny (**I**) uvádí Obrázek 5.



Obrázek 5: Mechanismus tvorby sírných sloučenin z lentinikové kyseliny (CHEN & HO, 1986).

2.2.2 Těkávé sirné sloučeniny

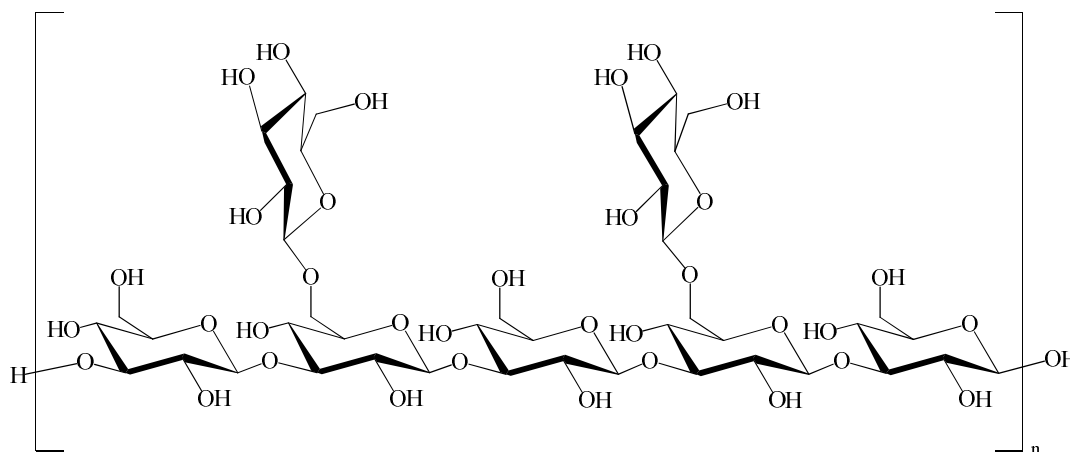


Obrázek 6: Struktura sirných sloučenin identifikovaných v *Lentinula edodes* (CHEN & HO, 1986).

Celkově lze těkavé sírné sloučeniny identifikované v *LE* rozdělit do čtyř hlavních skupin, a sice na látky obsahující jeden, dva, tři nebo šest atomů uhlíku (Obrázek 6). S výjimkou sirouhlíku obsahují všechny sírné sloučeniny $-\text{CH}_2-\text{S}-$ nebo $-\text{S}-\text{CH}_2-\text{S}-$ uskupení, která pocházejí z 1,2-dithiepanu (IV), pravděpodobného prekursoru těchto látek (MORITA & KOBAYASHI, 1967).

2.2.3 Biologická aktivita sloučenin

Pravděpodobně nejlépe prozkoumanou sloučeninou izolovanou z *LE* je polysacharid lentinan (Obrázek 7), který vykazuje výrazné protinádorové účinky (WASSER, 2002). Tento polysacharid nenapadá nádorové buňky přímo, ale aktivuje imunitní systém hostitele (BORCHERS *et al.*, 1999). Zvyšuje odolnost organismu proti bakteriálním, plísňovým, parazitálním a virovým infekcím, včetně původce AIDS. Lentinan snižuje toxicitu azidothymidinu (AZT), léku běžně využívaného v léčbě pacientů s HIV nebo AIDS (BISEN, 2010).



Obrázek 7: Struktura lentinanu.

LE je znám také pro svojí antimikrobiální aktivitu, která byla zjištěna u chloroformových, ethylacetátových i vodných extraktů. Tyto extrakty jsou aktivní proti některým kvasinkám, grampozitivním i gramnegativním bakteriím (BISEN, 2010). Z individuálních sírných sloučenin *LE* byla antimikrobiální aktivita doposud stanovena

pouze u lenthioninu (V) a 1,2,4,6-tetrathiepanu (VI). Bylo zjištěno, že zejména lenthionin (V) vykazuje poměrně silné inhibiční účinky proti řadě mikroorganismů, včetně bakterií, plísní a kvasinek. Minimální inhibiční koncentraci (dále jen MIC) lenthioninu (V) a 1,2,4,6-tetrathiepanu (VI) zjištěnou pomocí mikrodiluční metody shrnuje Tabulka I (MORITA & KOBAYASHI, 1967).

Tabulka I: Antimikrobiální aktivita lenthioninu (V) a 1,2,4,6-tetrathiepanu (VI) (MORITA & KOBAYASHI, 1967).

Mikroorganismus	živné médium [*] / podmínky kultivace	MIC (µg/ml)	
		LEN [*]	TTP [*]
<i>Bacillus subtilis</i>	MPA/ 37 °C, 24 h	50	250
<i>Staphylococcus aureus</i>	MPA/ 37 °C, 24 h	250	250
<i>Escherichia coli</i>	MPA/ 37 °C, 24 h	250	250
<i>Proteus vulgaris</i>	MPA/ 37 °C, 24 h	50	250
<i>Glomerella cingulata</i>	MPAG/ 27 °C, 72 h	12,5	125
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	MPAG/ 27 °C, 72 h	3,12	125
<i>Candida albicans</i>	MPAG/ 27 °C, 72 h	6,25	125
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	MPAG/ 27 °C, 27 h	6,25	–
<i>Cryptococcus neoformans</i>	MPAG/ 27 °C, 72 h	6,25	–
<i>Trichophyton rubrum</i>	MPAG/ 27 °C, 72 h	3,12	–

^{*}MPAG - masopeptonový agar s přidavkem glukózy; **LEN** - lenthionin (V), **TTP** - 1,2,4,6-tetrathiepan (VI).

3 Materiál a metody

3.1 Materiál

Plodnice *LE* byly získány od firmy ČESKÉ HOUBY a.s., Soběslav (www.ceskehouby.cz).

Mikrobiální kultury pochází ze dvou sbírek mikroorganismů CCM (Česká sbírka mikroorganismů, Brno) a ATCC (American Type Culture Collection).

Sterilní filtr Millex-GW (0,22 μm , průměr 13 mm) od firmy SIGMA-ALDRICH (Německo), mikrotitrační destičky Costar 3799 s vydutým dnem od firmy CORNING (Tewksbury, USA).

3.1.1 Chemikálie

Pro izolaci senzoričky aktivních sloučenin byl použit dichlormethan (99,5 %), bezvodý síran hořečnatý (99 %) a hydroxid sodný (98 %) od firmy LACH-NER (Neratovice, ČR), diethylether (99,7 %) a pentan (99,5 %) od firmy PENTA (Chrudim, ČR), redestilovaná voda.

Při HPLC analýzách byl použit acetonitril (pro HPLC) od firmy T. J. BAKER (Dublin, Irsko) a redestilovaná voda.

K antimikrobiálnímu testování extraktů byl použit trypton od firmy SCHARLAU (Barcelona, Španělsko) a chlorid sodný (min 99,9 %) od firmy PENTA (Chrudim, ČR), sojový pepton od firmy FLUKA (Buchs, Švýcarsko), agar od firmy IMUNA PHARM a. s. (Šarišské Michl'any, SR), ethanol (96 %) od firmy MERCK (Darmstadt, Německo) a vybraná antibiotika (chloramfenikol^e, tioconazol^f) od firmy SIGMA-ALDRICH (Steinheim, Německo).

^e Syntetické širokospektré bakteriostatické antibiotikum určené k léčbě těžkých infekcí, které nelze léčit méně toxickými antibiotiky (www.sukl.cz).

^f Běžně se pro léčbu onemocnění způsobené kvasinkou *Candida albicans* používá nystatin, který je však pro laboratorní testování z důvodu nízké stability nevhodný.

3.1.2 Přístroje a zařízení

Chromatografický systém pro HPLC/PDA, Varian

- binární systém vysokotlakých pump Varian ProStar 210
- PDA detektor Varian ProStar 210
- analytická kolona: Varian Microsorb-MV 100-5 C18, 250 × 4,6 mm (5 μm)
- preparativní kolona: Varian Dynamax Microsorb 100-5 C18, 250 × 21,4 mm (5 μm)

Plynový chromatograf Varian 3800 s hmotnostním detektorem (GC/MS)

- MS detektor Varian 4000
- kolona Varian-5VF MS (30 m × 0,25 mm × 0,25 μm)
- nosný plyn He

Spektrometr TECAN SPECTRA

- měření absorpance zákalu při vlnové délce 405 nm během antimikrobiálního testování

3.2 Metody

3.2.1 Izolace senzoričky aktivních sloučenin metodou přímé extrakce

Cílem tohoto kroku bylo optimalizovat izolaci nejvýznamnějších senzoričky aktivních sloučenin *LE* pro následnou identifikaci a antimikrobiální testování extraktů. Pro extrakci byl použit diethylether a dichlormethan.

Bylo zhomogenizováno 506 g plodnic s 1200 ml destilované vody pomocí kuchyňského mixéru. Po 30 minutách macerace byla hodnota pH macerátu 6,25. Poté bylo pH upraveno 0,1M NaOH na hodnotu 9,0. Po 24 hodinách macerování klesla hodnota pH na 7,36. Směs byla zfiltrována přes tkaninu a extrahována dvakrát dichlormethanem v poměru 1:0,75 (v/v). Celkově bylo k extrakci 1800 ml směsi použito 1000 ml

dichlormethanu. Extrakt byl přesušen bezvodým MgSO_4 a opět zfiltrován. Po zakoncentrování na rotační vakuové odparce (dále jen RVO) při teplotě do $25\text{ }^\circ\text{C}$ byl extrakt před dalšími analýzami uchován v mrazicím boxu při teplotě $-28\text{ }^\circ\text{C}$.

Při extrakci pomocí diethyletheru bylo homogenizováno 400 g plodnic s 1000 ml destilované vody. Po 30 minutách macerace byla hodnota pH 6,24. Hodnota pH byla upravena pomocí 0,1M NaOH na pH 9,0. Po 24 hodinách kleslo pH homogenátu na hodnotu 7,55. Po zfiltrování přes tkaninu následovala extrakce v poměru 1:0,75 (v/v) pomocí diethyletheru. Extrakce byla dvakrát opakována. Celkově bylo použito 900 ml diethyletheru na extrakci 1500 ml směsi. V důsledku neúplného rozdělení obou fází bylo nutno směs odstředit při 12000 rpm po dobu 4 minut. Extrakt byl přesušen bezvodým MgSO_4 a extrakční činidlo odpařeno na RVO. Získaný extrakt byl před dalšími analýzami uchován v mrazicím boxu při teplotě $-28\text{ }^\circ\text{C}$.

Oba extrakty byly analyzovány metodou HPLC/PDA s použitím analytické kolony C18 s nastříkovaným objemem vzorku 20 μl a průtokem 0,9 ml/min. Složení mobilní fáze v průběhu analýzy uvádí Tabulka II.

Tabulka II: Gradient mobilní fáze.

Mobilní fáze* [%]	Čas [min]			
	0:00	40:00	45:00	50:00
A	75	5	5	75
B	25	95	95	25

*A – destilovaná voda, B – acetonitril.

3.2.2 Separace majoritních sloučenin

Chromatografická separace majoritní frakce ze získaných extraktů byla provedena metodou HPLC/PDA s použitím preparativní kolony C18 a nastříkovaným objemem vzorku 1 ml a průtokem 18 ml/min. Gradient mobilní fáze (Tabulka II) byl shodný s gradientem pro analýzu získaných extraktů.

Z najímané frakce byl pomocí RVO při 25 °C odpařen acetonitril. Frakce byla poté extrahována dvakrát dichlormethanem v poměru 1:1 (v/v), spojené organické fáze byly přesušeny bezvodým MgSO₄ a odpařeny na RVO při 25 °C. Získaný vzorek byl uchováván v mrazicím boxu při teplotě –28 °C.

3.2.3 Identifikace sensoricky aktivních sloučenin pomocí GC/MS

Majoritní izolovaná sloučenina a získané extrakty byly analyzovány pomocí GC/MS pro identifikaci nejvýznamnějších sloučenin. Pro GC/MS analýzu byl použit plynový chromatograf Varian 3800. Podmínky GC/MS analýzy shrnuje Tabulka III.

Tabulka III: Podmínky GC/MS analýzy.

nosný plyn	He
průtok	1,3 ml/min
nástrík vzorku	1 µl
split	1:30
iontový zdroj	elektronová ionizace 70 eV
teplota při analýze	0–3 min 40 °C, dále zvyšování teploty o 4 °C/min do 240 °C
teplota detektoru	250 °C
doba analýzy	50 min

3.2.4 Antimikrobiální aktivita

Antimikrobiální aktivita získaných látek byla testována na Ústavu mikrobiální biologie rostlin (Biologické centrum AV ČR, České Budějovice).

Pro mikrobiální testování byla použita mikrodiluční metoda využívající mikrotitrační destičky s 96 jamkami (Obrázek 8). Antimikrobiální aktivita byla testována pro lenthionin a extrakty získané přímou extrakcí pomocí dichlormethanu (dále jen DCM ex)

a diethyletheru (dále jen DEE ex). Pro porovnání antimikrobiální aktivity bylo pro bakterie použito antibiotikum chloramfenikol, pro kvasinku tioconazol.

Antimikrobiální vlastnosti látek byly testovány na bakteriích *Bacillus cereus* CCM 869, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Escherichia coli* CCM 3954, *Micrococcus luteus* CCM 1048 a kvasince *Candida albicans* ATCC 10231.

Při antimikrobiálním testování byl použit trypton - sojový bujón (dále jen TSB), pro kultivaci mikroorganismů trypton - sojový agar (dále jen TSA). Složení TSB/TSA uvádí Tabulka IV. Hodnota pH připravených médií TSA/TSB byla upravena 1M NaOH na hodnotu 7,2. Média byla sterilizována v autoklávu po dobu 30 minut při teplotě 121 °C.

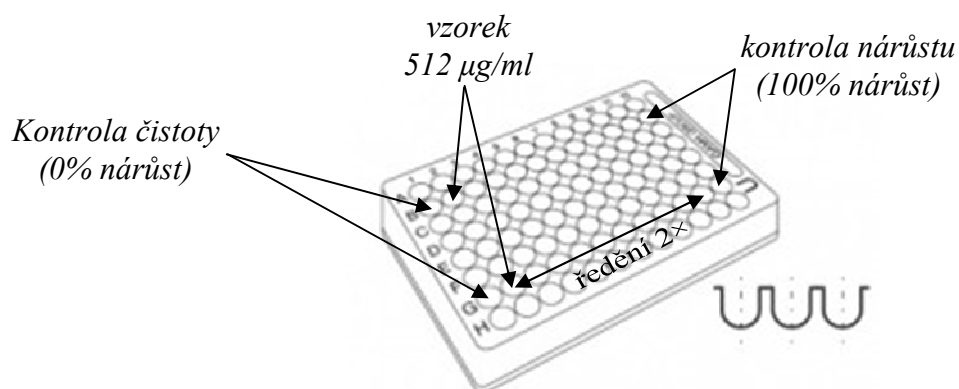
Tabulka IV: Složení trypton - sojového agaru/bujónu (na 250 ml destilované vody).

Látka	Navážka [g]
trypton	3,75
sojový pepton	1,25
NaCl	1,25
agar*	3,75

*přidává se pouze při přípravě TSA.

Z hlavní izolované sloučeniny (lenthioninu) a obou extraktů (DEE ex, DCM ex) byly připraveny roztoky o koncentraci 5120 µg/ml rozpuštěním v ethanolu. Ze zvolených antibiotik byly připraveny roztoky o koncentracích 640 µg/ml v ethanolu. Testované roztoky byly zfiltrány přes sterilní filtr (0,22 µm). Roztoky byly dále ředěny 10× bujónem (TSB). Další ředění (2×) bylo provedeno přímo na destičce (Obrázek 8).

Pro roztoky lenthioninu, DEE ex a DCM ex byl rozsah koncentrací na destičce od 512 µg/ml do 1 µg/ml. V případě zvolených antibiotik od 64 µg/ml do 0,125 µg/ml. Celkový objem roztoku v každé jamce po ředění byl 100 µl. Každá jamka (kromě kontroly čistoty) byla zaočkována 5 µl mikrobiální suspenze o koncentraci 10⁷ CFU/ml ve sterilním bujónu.



Obrázek 8: Mikrodiluční metoda^g.

Mikrotitrační destičky byly kultivovány při teplotě 37 °C po dobu 24 hod v případě bakterií, 48 hod v případě kvasinky. Po kultivaci byla změřena hodnota absorbance zákalu při vlnové délce 405 nm na spektrofotometru TECAN SPECTRA, od které byla odečtena hodnota absorbance před kultivací.

Rozdíl absorbancí byl porovnán s absorbancí zákalu při optimálním růstu mikroorganismů (tj. bez testovaných látek - kontrola nárůstu). Bylo tak stanoveno procento nárůstu mikroorganismů v bujónu s obsahem testovaných látek. V případě inhibice $\geq 80\%$ byla koncentrace látky stanovena jako minimální inhibiční koncentrace (dále jen MIC).

Hodnota absorbance nárůstu mikroorganismů byla u bakterií měřena po 24 hodinách, u kvasinky po 48 hodinách kultivace. Test byl prováděn ve dvou nezávislých experimentech, popř. do doby, dokud dvě měření nebyla shodná.

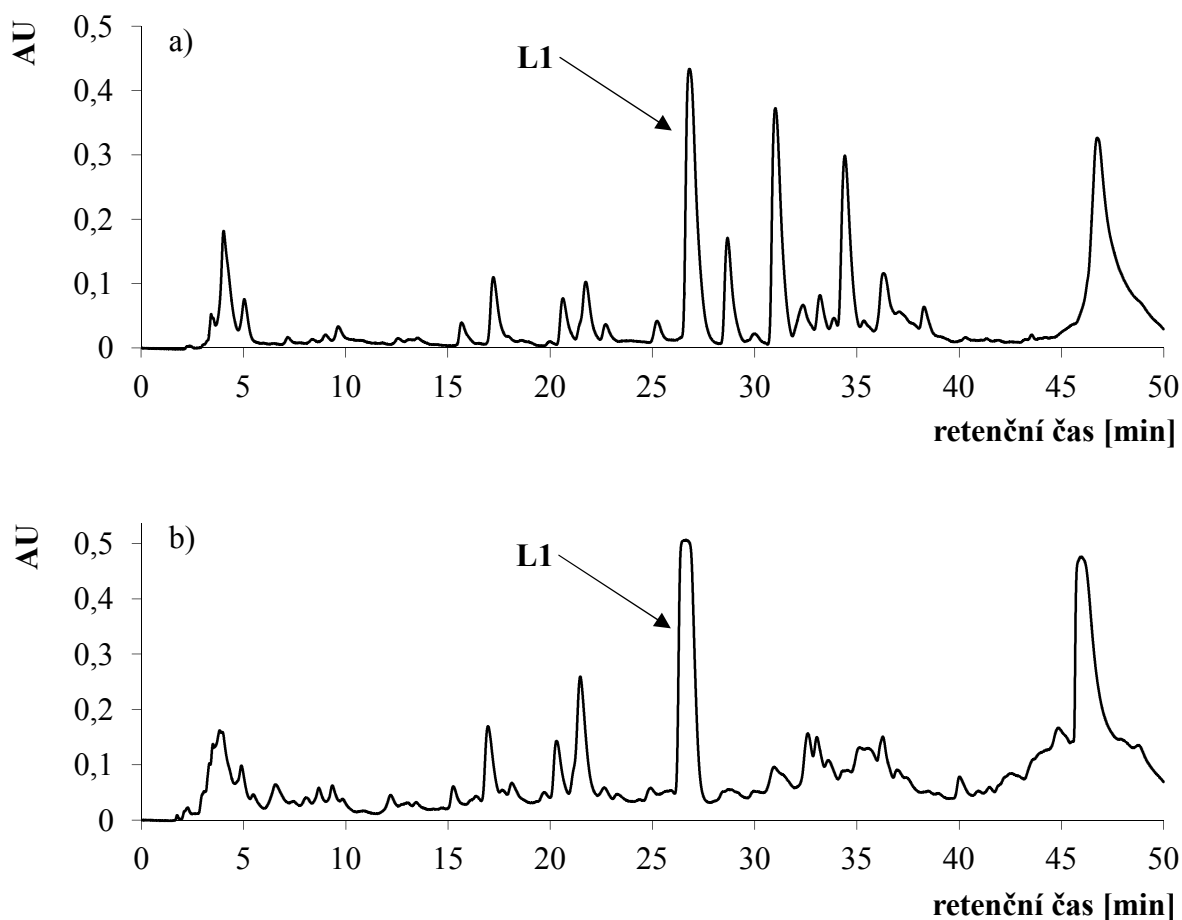
Zdroj:

^g <http://www.gama.cz/product.php?id=368&lang=cs> k 3. 4. 2013, upraveno

4 Výsledky

4.1 HPLC/PDA analýza získaných extraktů

Při optimalizaci metody pro izolaci senzoričky aktivních sloučenin *LE* byla analyzována účinnost extrakce při použití dichlormethanu (DCM ex) a diethyletheru (DEE ex). Extrahované sloučeniny byly detekovány metodou HPLC/PDA (Obrázek 9).



Obrázek 9: HPLC/PDA chromatogram (při λ 210 nm) a) DCM ex, b) DEE ex.

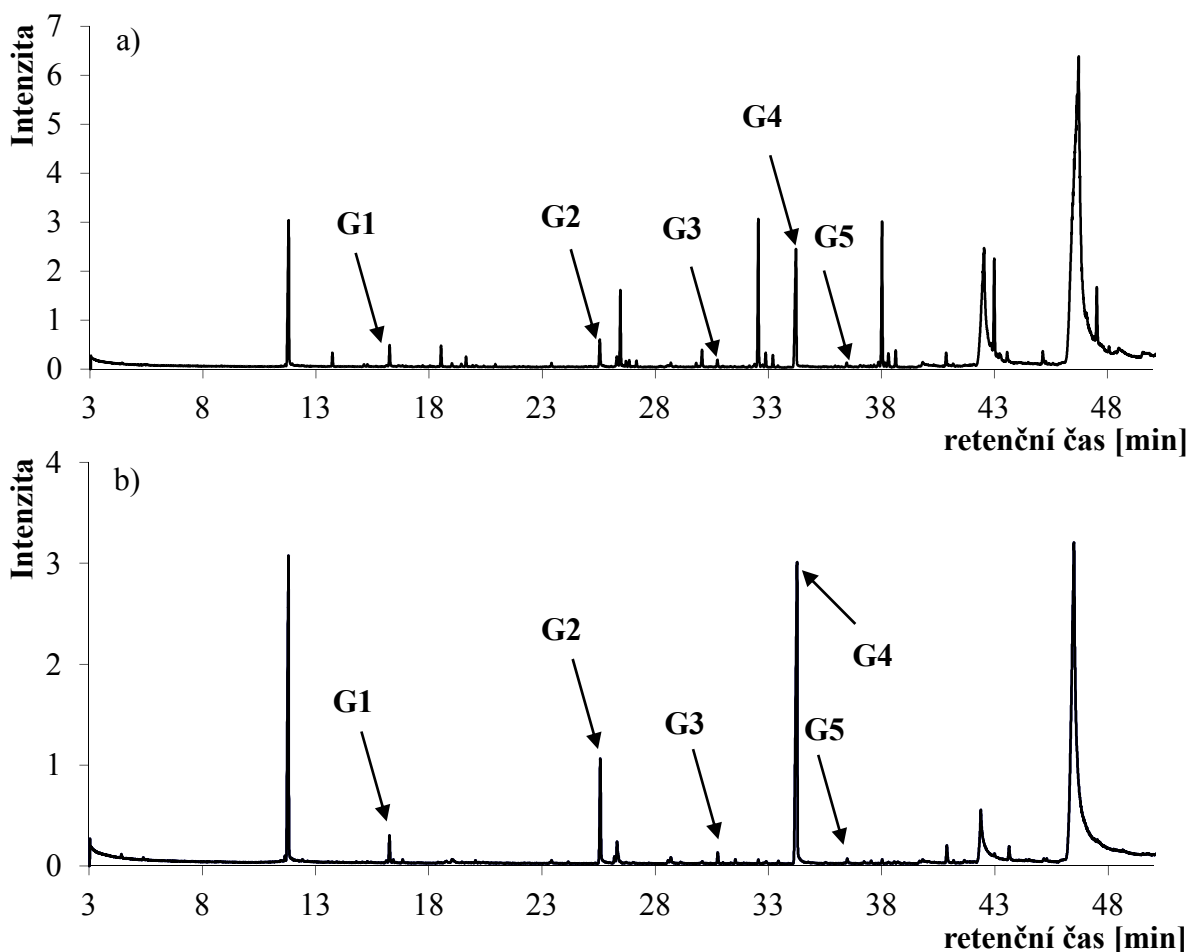
HPLC/PDA analýzou bylo v DEE ex detekováno méně extrahovaných sloučenin než v DCM ex. Vhodnějším extrakčním činidlem byl tedy dichlormethan, jehož použití vedlo

k účinnější extrakci sloučenin z homogenizovaných plodnic *LE*. Pro chromatografickou separaci byly tedy použity extrakty z *LE* získané extrakcí dichlormethanem.

Z obou chromatogramů uvedených na Obrázek 9 je jasně patrná přítomnost majoritní sloučeniny (**L1**), na kterou byla zaměřena hlavní pozornost. Tato sloučenina byla posléze získána pomocí preparativní HPLC, identifikována pomocí GC/MS a byla u ní studována její antimikrobiální aktivita.

4.2 Identifikace senzoričky aktivních sloučenin pomocí GC/MS

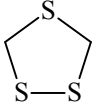
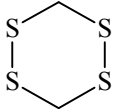
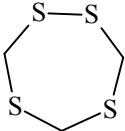
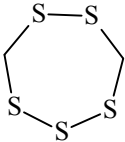
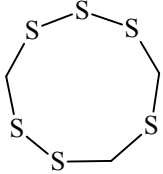
Získané extrakty DEE ex a DCM ex byly také analyzovány pomocí GC/MS pro identifikaci nejvýznamnějších sloučenin *LE*. Výsledné chromatogramy uvádí Obrázek 10.



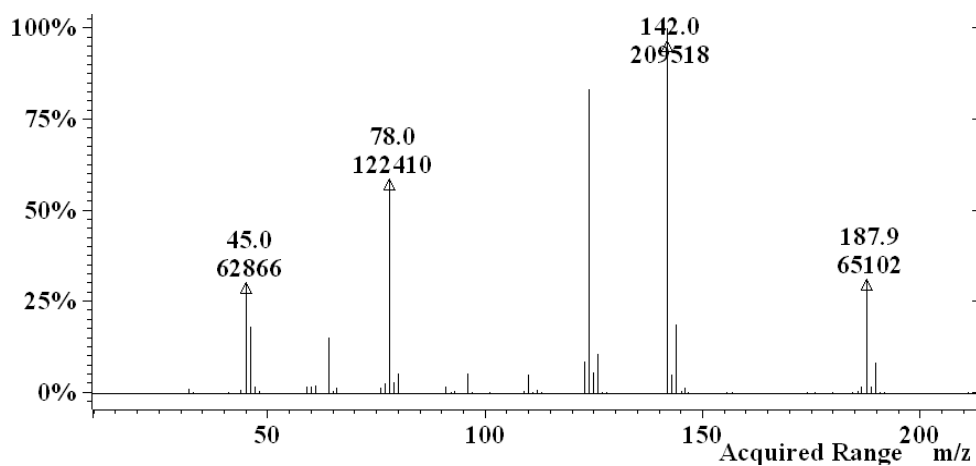
Obrázek 10: GC/MS chromatogram a) DMC ex, b) DEE ex.

Na základě MS dat byla stanovena molekulová hmotnost i pravděpodobná struktura nejvýznamnějších senzoryicky aktivních sloučenin (**G1** až **G5**) přítomných v analyzovaných extraktech. Identifikované sloučeniny uvádí Tabulka V.

Tabulka V: Identifikace sloučenin v DEE ex a DCM ex analyzovaných pomocí GC/MS.

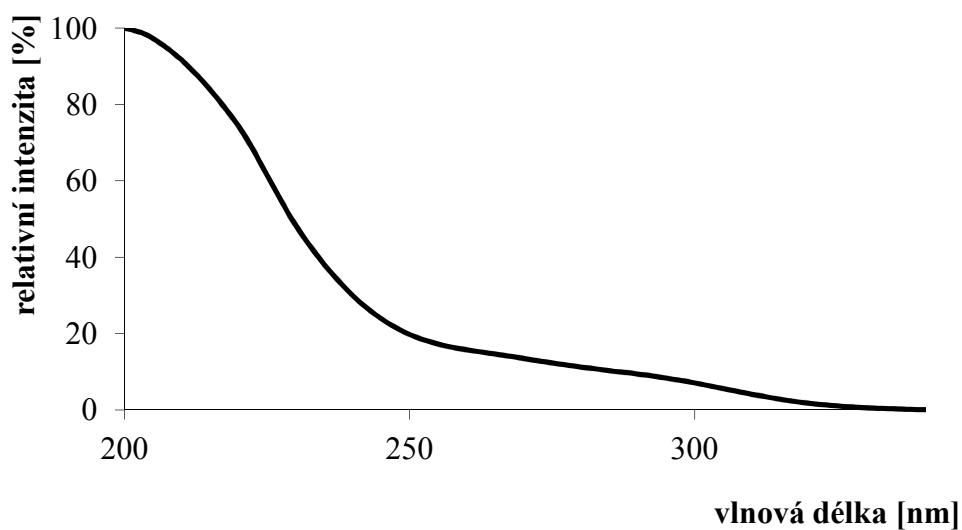
Sloučenina	M [Da]	Hmotnostní spektrum (m/z, %)	Pravděpodobná struktura
G1	124	126 (12, M ⁺ +2), 124 (100, M ⁺), 78 (78), 59 (19), 45 (48), 46 (17)	 1,2,4-trithiolan (X)
G2	156	158 (19, M ⁺ +2), 156 (100, M ⁺), 110 (68), 64 (26), 46 (34), 45 (45)	 1,2,4,5-tetrathian (XI)
G3	170	172 (7, M ⁺ +2), 170 (56, M ⁺), 124 (54), 78 (100), 46 (28), 45 (46)	 1,2,4,6-tetrathiepan (VI)
G4, L1	188	190 (9, M ⁺ +2), 188 (37, M ⁺), 142 (100), 124 (92), 78 (61), 45 (31),	 lenthionin (V)
G5	206	208 (9, M ⁺ +2), 206 (33, M ⁺), 142 (100), 78 (63), 64 (55), 32 (24)	 1,2,3,5,6,8-hexathionan (VII)

Analýze GC/MS byla podrobena i izolovaná sloučenina (**L1**) získaná chromatografickou separací HPLC/PDA z DCM ex. Frakce **L1** byla identifikována jako lenthionin (**V**), který byl shodný s identifikovanou sloučeninou **G4**. Hmotnostní spektrum lenthioninu (**V**) je uvedeno na Obrázek 11.



Obrázek 11: Hmotnostní spektrum lethioninu (V).

Obrázek 12 uvádí UV spektrum lenthioninu (V). Absorbční maximum této sloučeniny je při 200 nm.



Obrázek 12: UV spektrum lenthioninu (V).

4.3 Antimikrobiální aktivita

Byla testována antimikrobiální aktivita obou získaných extraktů, jakož i aktivita hlavní složky těchto extraktů, lenthioninu. Pro testování byly použity celkem čtyři bakterie (jedna G⁻ a tři G⁺) a jedna kvasinka. Získané hodnoty minimální inhibiční koncentrace (MIC) DEE ex, DCM ex a lenthioninu (V) uvádí Tabulka VI.

Tabulka VI: Minimální inhibiční koncentrace testovaných látek.

Mikroorganismus/ testovaná látka*	MIC [$\mu\text{g/ml}$]				
	DEE ex	DCM ex	LEN	CH	T
<i>Bacillus cereus</i> (G ⁺)	32	32	64	2	–
<i>Enterococcus faecalis</i> (G ⁺)	256	256	128	8	–
<i>Escherichia coli</i> (G ⁻)	512	512	128	4	–
<i>Micrococcus luteus</i> (G ⁺)	64	64	32	1	–
<i>Candida albicans</i>	128	128	32	–	1

*Testované látky: **LEN** – lenthionin, **CH** – chloramfenikol, **T** – tioconazol.

5 Diskuze

Byla potvrzena přítomnost nejvýznamnějších sensoricky aktivních sloučenin houževnatce jedlého, které byly uvedeny v několika předchozích studiích (CHEN & HO, 1986; YASUMOTO *et al.*, 1971; IWAMI *et al.*, 1975; KOBAYASHI, 1967). Bylo prokázáno, že naprostá většina těchto látek jsou heterocyklické sirné sloučeniny. V připravených extraktech houževnatce jedlého se podařilo pomocí GC/MS analýzy spektrálně charakterizovat následující sensoricky aktivní sloučeniny: 1,2,4-trithiolan (**X**), 1,2,4,5-tetrathian (**XI**), 1,2,4,6-tetrathiepan (**VI**), lenthionin (**V**) a 1,2,3,4,5,6-hexathiepan (**VII**). HPLC/PDA analýzami připravených extraktů během optimalizace metody izolace sensoricky aktivních sloučenin byla zjištěna účinnější extrakce při použití extrakčního činidla dichlormethan. Pro následnou chromatografickou separaci byly proto použity extrakty připravené pomocí tohoto extrakčního činidla.

Chromatografickou separací dichlormethanového extraktu pomocí HPLC/PDA byla izolována a následně metodou GC/MS identifikována bílá krystalická sloučenina lenthionin (**V**), která byla majoritní sloučeninou v extraktech houževnatce jedlého. Typickou vlastností této sloučeniny bylo velmi výrazné houbové aroma.

Mezi hlavními cíly této bakalářské práce bylo testování antimikrobiální aktivity izolovaného lenthioninu a získaných extraktů (DEE ex a DCM ex) zaměřené na bakterie napadající lidský organismus. Byla proto volena kultivační teplota 37 °C a získané hodnoty MIC byly porovnány s antimikrobiálními vlastnostmi komerčně dostupných antibiotik chloramfenikol a tioconazol. Nejvyšší antimikrobiální aktivitu (32 µg/ml) vykazovaly oba extrakty proti grampozitivní bakterii *Bacillus cereus*. Lenthionin (**V**) inhiboval růst této bakterie méně. Dá se tedy předpokládat, že není hlavní účinnou složkou extraktů v inhibici *Bacillus cereus*. Antimikrobiální aktivita lenthioninu (**V**) byla nejvyšší u grampozitivní bakterie *Micrococcus luteus* (32 µg/ml) a kvasinky *Candida albicans* (32 µg/ml). S výjimkou *Bacillus cereus* vykazoval lenthionin (**V**) vždy vyšší antimikrobiální aktivitu než oba extrakty.

Antimikrobiální aktivita lenthioninu, jakož i dichlormethanového a diethyletherového extraktu, které jsou zmiňovány v publikovaných pracích (MORITA & KOBAYASHI, 1967,

ISHIKAWA *et al.*, 2001, BISEN, 2010), byla tedy potvrzena a blíže specifikována. Porovnání získaných výsledků s publikovanou prací MORITY & KOBAYASHIHO (1967) je poměrně obtížné, neboť obě práce se lišily podmínkami kultivace, zejména použitou kultivační teplotou, jakož i testovanými kmeny mikroorganismů a živným médiem. Porovnatelné výsledky shrnuje Tabulka VII.

Tabulka VII: Porovnání získaných výsledků se studií MORITY & KOBAYASHIHO (1967).

Mikroorganismus	Živné médium/ podmínky kultivace	MIC (µg/ml)			
		LEN	TTP	DEE ex	DCM ex
<i>Bacillus cereus</i>	*TSA/ 37 °C, 24 h	64	–	32	32
<i>Bacillus subtilis</i>	MPA/ 37 °C, 24 h	50	250	–	–
<i>Escherichia coli</i>	MPA/ 37 °C, 24 h	250	250	–	–
	*TSA/ 37 °C, 24 h	128	–	512	512
<i>Candida albicans</i>	MPAG/ 27 °C, 72 h	6,25	125	–	–
	*TSA/ 37 °C, 78 h	32	–	128	128

*Označení řádků s vlastními výsledky; – data nejsou k dispozici.

Testované látky: **LEN** – lenthionin (**V**), **TTP** – 1,2,4,6-tetrathiepan (**VI**), **DEE ex** – diethyletherový extrakt, **DCM ex** – dichlormethanový extrakt.

Výrazné rozdíly byly pozorovány u lenthioninu v inhibici kvasinky *Candida albicans*. Hodnota MIC lenthioninu byla v případě této kvasinky výrazně závislá na teplotě. Při 37 °C lenthionin dosahoval zhruba pětkrát nižší účinnosti než při 27 °C. Dalším zajímavým závěrem je také srovnání antimikrobiální aktivity senzoričky aktivní sloučeniny 1,2,4,6-tetrathiepanu (**VI**) ve výše uvedené studii s aktivitou získaných extraktů (DEE ex, DCM ex). Hodnoty MIC 1,2,4,6-tetrathiepanu (**VI**) se téměř shodovaly s antimikrobiálními aktivitami obou extraktů. Téměř shodné aktivity dosahuje také lenthionin v inhibici testovaných bakterií rodu *Bacillus*. V případě bakterie *Bacillus cereus* však vyšší aktivitu vykazují oba extrakty (DEE ex a DCM ex). Bohužel, nejsou k dispozici data, která by uváděla antimikrobiální aktivitu extraktů houževnatce jedlého proti bakterii *Bacillus subtilis*. Pokud by extrakty vykazovaly podobnou aktivitu jako při inhibici *Bacillus cereus*, dala by se

předpokládat přítomnost účinnější sloučeniny v extraktech vykazující vyšší antimikrobiální aktivitu v inhibici rodu *Bacillus* než lenthionin (V).

Vyhodnocením výsledků lze konstatovat, že lenthionin (V) patří mezi sloučeniny houževnatce jedlého s nejvyšší antimikrobiální aktivitou. Přesto v porovnání s komerčně dostupnými antibiotiky vykazuje obecně nižší účinnost v inhibici těchto mikroorganismů. Antimikrobiální aktivita však byla porovnáвана se širokospektrými antibiotiky, prioritně určenými pro léčbu těžkých infekcí, které nelze léčit jinými, méně toxickými antibiotiky. Toxicita lenthioninu (V) pro lidský organismus by tedy mohla být předmětem dalších studií.

6 Závěr

Byla optimalizována metoda pro izolaci hlavních sensoricky aktivních sloučenin houževnatce jedlého. Následnou GC/MS analýzou získaných extraktů byly nejvýznamnější sensoricky aktivní sloučeniny této houby identifikovány jako 1,2,4-trithiolan (**X**), 1,2,4,5-tetrathian (**XI**), 1,2,4,6-tetrathiepan (**VI**), lenthionin (**V**) a hexathiepan (**VII**).

Pomocí preparativní HPLC byla izolována majoritní složka těchto extraktů a následně identifikována jako lenthionin (**V**, 1,2,3,5,6-pentathiepan).

U získaných extraktů i majoritní sloučeniny houževnatce jedlého, lenthioninu (**V**), byly prokázány antimikrobiální účinky proti bakteriím *Bacillus cereus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus* a kvasince *Candida albicans*.

7 Reference

BISEN, P. S.; BAGHEL, R. K.; SANODIYA, B. S.; THAKUR, G. S.; PRASAD, G. B. K. S. (2010): *Lentinus edodes*: A Macrofungus with Pharmacological Activities. *Curr. Med. Chem.*, **17**, 2419–2430.

BORCHERS, A. T.; STERN, J. S.; HACKMAN, R. M.; KEEN, C. L.; GERSHWIN, E. M. (1999): Mushrooms, Tumors, and Immunity. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **221**, 281–293.

BRAUER, D.; KIMMONS T.; PHILLIPS M. (2002): Effects of Management on the Yield and High-molecular-weight Polysaccharide Content of Shiitake (*Lentinula edodes*) Mushrooms. *J. Agric. Food Chem.*, **50**, 5333–5337.

HASSEGAWA, R. H.; KASUYA, M. C. M.; VANETTI, M. C. D. (2005): Growth and Antibacterial Activity of *Lentinula edodes* in Liquid Media Supplemented with Agricultural Wastes. *Electron. J. Biotechnol.*, **8**, 212–217.

CHANG, S. T. (2002): Past and Present Trends in the Production of *Lentinula edodes* in Asia. *Mushroom Biology and Mushroom Products*, editor Sánchez a kol., ISBN 968878-105-3.

CHANG, S. T. (2005): “Witnessing the Development of the Mushroom Industry in China.” In Q. Tan *et al.*, eds. *Mushroom Biology and Mushroom Products*, Proceedings of the Fifth International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products, April 8–12, Shanghai, China

CHEN, A. W. (2001): Cultivation of *Lentinula edodes* on Synthetic Logs. *Mushroom Growers' Newsletter* **10**, 3–9.

CHEN, C. C.; HO, C. T. (1986): Identification of Sulfurous Compounds of Shiitake Mushroom (*Lentinus edodes* Sing). *J. Agric. Food Chem.*, **34**, 832–833.

- ISHIKAWA, N. K.; KASUYA, M. C. M.; VANETTI, M. C. D. (2001): Antimicrobial Activity of *Lentinula edodes* Grown in Liquid Medium. *Braz. J. Microbiol.*, **32**, 206–210.
- IWAMI, K., YASUMOTO, K., NAKAMURA, K.; MITSUDA, H. (1975): Reactivity of *Lentinus* Gamma-glutamyltransferase with Lentinic Acid as the Principal Endogenous Substrate. *Agric. Biol. Chem.*, **39**, 1941-1947.
- LEATHAM, G. F. (1982): Cultivation of Shiitake the Japanese Forest Mushroom, on Logs: a Potential Industry for the United States. *For. Prod. J.*, **32**, 30–31.
- LEATHAM, G. F. (1987): Cultivation of Shiitake, the Japanese Forest Mushroom, on Logs: a Potential Industry for the United States. *Forest Prod. J.*, **32**, 29–34.
- LINDEQUIST, U.; TEUSCHER, E.; NARBE, G. (1990): Neue Wirkstoffe aus Basidiomyceten. *Phytother*, **11**, 139–49.
- MORITA, K.; KOBAYASHI, S. (1967): Structure, and Synthesis of Lenthionine and Its Analogs. *Chem. Pharm. Bull.*, **15**, 988–993.
- PEGLER, D. N. (1983): The Genus *Lentinula* (Tricholomataceae Tribe Collybieae). *Sydowia*, **36**, 227–239.
- RAHMAN, T.; CHOUDHURY, M. B. K. (2012): Shiitake Mushroom: A Tool of Medicine. *Bangladesh J. Med. Biochem.* **5**, 24–32
- SHIMOMURA, N.; HASEBE, K.; NAKAI-FUKUMASA, Y.; KOMATSU, M. (1992): Intercompatibility Between Geographically Distant Strains of *L. edodes*. *Rept. Tottoi Mycol. Inst.*, **30**, 26–29.
- SILVA, É. S.; CAVALLAZZI, J. R. P.; MULLER, G.; SOUZA, J. V. B. (2007): Biotechnological Applications of *Lentinus edodes*. *J. Food Agric. Environ.*, **5**, 403–407.

WASSER, S. P. (2002): Medicinal Mushrooms as a Source of Antitumor and Immunomodulating Polysaccharides. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **60**, 258–274.

YAMAC, M.; BILGILI, F. (2006): Antimicrobial Activities of Fruit Bodies and/or Mycelial Cultures of Some Mushroom Isolates. *Pharm. Biol.*, **40**, 660–667.

YASUMOTO, K.; IWAMI, K.; MITSUDA, H. (1971): A New Sulphur-containing Peptide from *Lentinus edodes* Acting as Precursor for Lenthionine. *Agric. Biol. Chem.* **35**, 2059–2069.

Internetové zdroje:

STÁTNÍ ÚSTAV PRO KONTROLU LÉČIV: Souhrn údajů o přípravku [online]. [citováno 6. 4. 2013]. Dostupné z

<http://www.sukl.cz/modules/medication/download.php?file=SPC93904.doc&type=spc&as=c-hloramphenicol-valeant-spc>

CZECH COLLECTION OF MICROORGANISMS: Katalog kultur [online]. [citováno 7. 4. 2013].

Dostupné z <http://www.sci.muni.cz/ccm/indexCZ.html>

8 Použité zkratky

ATCC	American Type Culture Collection
AZT	azidothymidin
CCM	Česká sbírka mikroorganismů
CFU	colony-forming unit, český ekvivalent KTJ (kolonie tvořící jednotky)
DCM ex	dichlormethanový extrakt z <i>Lentinula edodes</i>
DEE ex	diethyletherový extrakt z <i>Lentinula edodes</i>
GC	plynová chromatografie
GC/MS	plynová chromatografie s hmotnostní detekcí
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HPLC/DAD	vysokoúčinná kapalinová chromatografie s detektorem diodového pole
CH	chloramfenikol
<i>LE</i>	<i>Lentinula edodes</i> ((Berk.) Pegler 1976)
LEN	lenthionin (V)
MIC	minimální inhibiční koncentrace
MPA	masopeptonový agar
MPAG	masopeptonový agar s přídavkem glukózy
rpm	počet otáček za minutu
RVO	rotační vakuová odparka
SÚKL	Státní ústav pro kontrolu léčiv
T	tioconazol
TSA	trypton - sójový agar
TSB	trypton - sójový bujon
TTP	1,2,4,6-tetrathiepan (VI)

9 Přílohy

Tabulka VIII: Seznam uvedených mikroorganismů.

<i>Bacillus cereus</i> Frankland and Frankland 1887
<i>Bacillus subtilis</i> (Ehrenberg 1835) Cohn 1872
<i>Candida albicans</i> (C. P. Robin) Berkhout 1923
<i>Cryptococcus neoformans</i> (San Felice) Vuill. 1901
<i>Enterococcus faecalis</i> (Andrewes and Horder 1906) Schleifer and Kilpper-Bälz 1984
<i>Escherichia coli</i> (Migula 1895) Castellani and Chalmers 1919
<i>Glomerella cingulata</i> (Stoneman) Spauld. & H. Schrenk 1903
<i>Micrococcus luteus</i> (Schroeter 1872) Cohn 1872
<i>Proteus vulgaris</i> Hauser 1885
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Meyen ex E. C. Hansen 1883
<i>Staphylococcus aureus</i> (Rosenbach 1884) De La Fuente et al. 1985
<i>Trichophyton mentagrophytes</i> (C. P. Robin) Sabour. 1895
