



Pedagogická
fakulta
Faculty
of Education

Jihočeská univerzita
v Českých Budějovicích
University of South Bohemia
in České Budějovice

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Pedagogická fakulta

Diplomová práce

Sekundární sirné metabolity v houbách

Vypracovala: Bc. Iveta Štefanová
Vedoucí práce: doc. Ing. Roman Kubec, Ph.D.
(Katedra aplikované chemie, ZF JU)

České Budějovice 2014

Štefanová, I. (2014): Sekundární sirné metabolity v houbách. [Sulfur-containing secondary metabolites in mushrooms] - 67 p., Faculty of Education, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace

Tato diplomová práce se zabývá studiem sekundárních sirných metabolitů hub s výraznými sensorickými vlastnostmi. Pozornost byla zaměřena zejména na jedlou houbu *Lentinula edodes* a některé druhy rodu *Marasmius*, které jsou charakteristické pro svou česnekovou chuť a vůni.

Teoretická část diplomové práce nabízí popis i ostatních druhů hub, u kterých lze díky jejich výrazným sensorickým vlastnostem předpokládat existenci těkavých sirných sloučenin. Tyto vlastnosti jsou typické například pro některé zástupce rodů *Entoloma*, *Gymnopus*, *Mycena*, *Thelephora* nebo rod *Tuber*.

Experimentální část byla zaměřena na izolaci a spektrální charakterizaci prekurzoru sensoricky aktivních sloučenin jedlé houby *Marasmius perforans*, triviálně γ -glutamyl-marasminu. Dalším cílem bylo metodou GC/MS identifikovat těkavé sirné sloučeniny přítomné v plodnicích *Marasmius alliaceus* a *Thelephora palmata*.

Annotation

This thesis was focused on sulfur-containing secondary metabolites of mushrooms with significant sensory characteristics, in particular those exhibiting an alliaceous odor. The attention has been focused especially on the edible mushroom *Lentinula edodes* and some other species of the genus *Marasmius*, which are characteristic mainly for their garlic-like taste and odor.

The experimental part is focused on isolation and spectral characterization of the precursor of sensory active compounds of edible mushroom *Marasmius perforans*, trivially-named γ -glutamyl-marasmin. Furthermore, this thesis focuses on GC/MS analysis of volatile compounds present in extracts of *Marasmius alliaceus* and *Thelephora palmata*.

Prohlášení

Prohlašuji, že svoji diplomovou 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 diplomové 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. 2014

.....

Poděkování

Touto cestou bych ráda poděkovala doc. Ing. Romanu Kubcovi, Ph.D. za odborné vedení, trpělivost a ochotu, kterou mi v průběhu zpracování diplomové práce věnoval.

Mé poděkování patří též Ing. Petře Kučerové, Ph.D. z Mikrobiologického ústavu AV ČR, v. v. i., Sektor fototrofních mikroorganismů v Třeboni za spolupráci při získávání výsledků.

Děkuji i Mgr. Kristýně Kupcové za všestrannou pomoc s experimentální částí diplomové práce.

Obsah

1	CÍLE PRÁCE	1
2	ÚVOD	2
2.1	ROD <i>LENTINULA</i> EARLE (HOUŽEVNATEC)	4
2.1.1	<i>Biologicky aktivní sloučeniny</i>	5
2.1.2	<i>Těkavé sирné sloučeniny</i>	7
2.2	ROD <i>MARASMIUS</i> FR. (ŠPIČKA)	9
2.2.1	<i>Senzoricky aktivní sloučeniny</i>	11
2.2.2	<i>Těkavé sирné sloučeniny</i>	13
2.3	ROD <i>GYMNOPUS</i> (PERS.) ROUSSEL (PENÍZOVKA)	14
2.3.1	<i>Další zástupci rodu <i>Gymnopus</i> s výraznými senzorickými vlastnostmi</i>	15
2.4	ROD <i>TUBER</i> P. MICHELI EX F. H. WIGG. (LANÝŽ)	17
2.5	ROD <i>CORTINARIUS</i> (PERS.) GRAY (PAVUČINEC)	19
2.6	ROD <i>PHALLUS</i> L. (HADOVKA)	21
2.7	DALŠÍ DRUHY HUB S VÝRAZNÝMI SENZORICKÝMI VLASTNOSTMI	22
2.7.1	<i>Rod <i>Amanita</i> Pers. (muchomůrka)</i>	22
2.7.2	<i>Rod <i>Entoloma</i> (Fr.) P. Kumm. (závojenka)</i>	23
2.7.3	<i>Rod <i>Hebeloma</i> (Fr.) P. Kumm. (slzivka)</i>	24
2.7.4	<i>Rod <i>Hygrocybe</i> (Fr.) P. Kumm. (voskovka)</i>	26
2.7.5	<i>Rod <i>Inocybe</i> (Fr.) Fr. (vláknice)</i>	27
2.7.6	<i>Rod <i>Lepiota</i> (Pers.) Gray (bedla)</i>	27
2.7.7	<i>Rod <i>Mycena</i> (Pers.) Roussel (helmovka)</i>	28
2.7.8	<i>Rod <i>Pholiota</i> (Fr.) P. Kumm. (šupinovka)</i>	29
2.7.9	<i>Rod <i>Phyllostopsis</i> J.-E. Gilbert & Donk ex Singer (hlíva)</i>	30
2.7.10	<i>Rod <i>Pluteus</i> Fr. (štítovka)</i>	31
2.7.11	<i>Rod <i>Psilocybe</i> (Fr.) P. Kumm. (lysohlávka)</i>	32
2.7.12	<i>Rod <i>Thelephora</i> Ehrh. ex Willd. (plesňák)</i>	33
2.7.13	<i>Rod <i>Volvariella</i> Speg. (kukmák)</i>	34
2.7.14	<i>Podzemní plodnice s česnekovým nebo cibulovým aroma</i>	35

3	MATERIÁL A METODY	37
3.1	MATERIÁL	37
3.1.1	Chemikálie	37
3.1.2	Analyzované vzorky hub.....	37
3.1.3	Přístroje a zařízení.....	38
3.2	METODY	38
3.2.1	Izolace γ -glutamyl-marasminu.....	38
3.2.1.1	Extrakce aminokyselin	38
3.2.1.2	Iontově výměnná chromatografie	39
3.2.2	Extrakce těkavých látek z <i>Marasmius alliaceus</i>	41
3.2.3	Extrakce těkavých látek z <i>Thelephora palmata</i>	43
3.2.4	Extrakce senzoricky aktivních sloučenin z <i>Lentinula edodes</i>	44
4	VÝSLEDKY	45
4.1	IZOLACE γ -GLUTAMYL-MARASMINU Z <i>MARASMIUS PERFORANS</i>	45
4.1.1	HPLC/PDA analýza.....	45
4.1.2	ESI-MS analýza.....	47
4.1.3	NMR spektroskopie	48
4.2	EXTRAKCE A IDENTIFIKACE TĚKAVÝCH LÁTEK Z <i>MARASMIUS ALLIACEUS</i>	49
4.2.1	GC/MS analýza	49
4.2.2	HPLC/PDA analýza.....	51
4.3	EXTRAKCE A IDENTIFIKACE TĚKAVÝCH LÁTEK Z <i>THELEPHORA PALMATA</i>	52
4.3.1	GC/MS analýza	52
4.4	EXTRAKCE A IDENTIFIKACE SENZORICKY AKTIVNÍCH SLOUČENIN Z <i>LENTINULAEDODES</i> ...	53
4.4.1	GC/MS analýza	53
4.4.2	HPLC/PDA analýza.....	55
5	DISKUZE	56
6	ZÁVĚR	59
7	REFERENCE	60
8	POUŽITÉ ZKRATKY	67

1 Cíle práce

- ✓ Charakterizace rodů hub s výraznými sensorickými vlastnostmi jako potenciálních zdrojů sensoricky aktivních sirných sloučenin.
- ✓ Izolace a spektrální charakterizace prekurzoru sensoricky aktivních sirných sloučenin, γ -glutamyl-3-(methylthiomethylsufinyl)alaninu, triviálně γ -glutamyl-marasminu, z plodnic houby *Marasmius perforans* (špičky provrtané).
- ✓ Identifikace těkavých sirných sloučenin vznikajících v plodnicích *Marasmius alliaceus* (špičky cibulové) a *Thelephora palmata* (plesňáku zápašného) metodou GC/MS.
- ✓ Porovnání těkavých sirných sloučenin *Marasmius alliaceus* a *Thelephora palmata* s *Lentinula edodes* (houževnatce jedlého).

2 Úvod

Charakteristické vůně různých druhů potravin jsou závislé zejména na obsahu těkavých sloučenin. Tyto sensoricky aktivní sloučeniny mohou často být formovány enzymaticky, například během krájení, během něhož se původně oddělené enzymy a prekurzory sensoricky aktivních sloučenin dostanou do přímého kontaktu. K celkovým sensorickým vlastnostem potravin obvykle významnou měrou přispívají také těkavé sirné sloučeniny (SCHUTTE & TERANISHI, 1974).

Houby disponují charakteristickým aroma, které lze v mnohých případech popsat jako typické houbové. Tyto vlastnosti jsou obvykle spojovány zejména s přítomností okt-1-en-3-olu, který byl poprvé izolován jako hlavní těkavá sloučenina houby *Tricholoma matsutake* (S. Ito & S. Imai) Singer a označen jako matsutake alkohol. Vzhledem ke svému výskytu a sensorickým vlastnostem nese nejčastěji triviální označení houbový alkohol. Bylo potvrzeno, že C8 sloučeniny jsou těkavými sloučeninami, které výrazně přispívají k typickým sensorickým vlastnostem velkého množství hub (PYYSALO, 1976; MAGA, 1981).

Výrazně méně studií bylo zaměřeno na identifikaci těkavých sirných sloučenin v houbách, případně na reakční mechanismy vzniku těchto sloučenin či na jejich prekurzory. Výrazným zdrojem sirných sloučenin jsou houby řádu Agaricales – pečárkotvaré. Celá řada těchto hub vykazuje charakteristické sensorické vlastnosti připomínající aroma a chuť česnekovitých rostlin. Kromě velmi podobných sensorických vlastností těchto druhů jsou jasně patrné i podobnosti v biogenezi sirných látek (ESTEVE-RAVENTÓS & ORTEGA, 2003; SNEEDEN *et al.*, 2003).

Nejvíce studií bylo provedeno s jedlou houbou rodu *Lentinula edodes*, celosvětově známou pod názvem shiitake. Problematikou izolace a identifikace sensoricky aktivních sirných sloučenin této houby a jejich netěkavého prekurzoru, lentinikové kyseliny (**1**), případně klíčovými enzymy, které ji rozkládají (γ -glutamyltranspeptidasy a C-S lyasy), se zabývalo velké množství studií (YASUMOTO *et al.*, 1971a; YASUMOTO *et al.*, 1971b; IWAMI *et al.*, 1975; YASUMOTO *et al.*, 1976; CHEN *et al.*, 1984; CHEN & HO, 1986; CHEN *et al.*, 1986; YASUMOTO & IWAMI, 1987). Detailnímu zkoumání byly podrobeny i jednotlivé vznikající

senzoricky aktivní sloučeniny z hlediska jejich antimikrobiálních vlastností, zejména majoritní sloučenina lenthionin (**2**) (MORITA & KOBAYASHI, 1967).

Výrazné sensorické vlastnosti podobné česneku i velmi podobná biogeneze sirných látek jsou typické i pro další rody řádu Agaricales. Zejména zástupci rodu *Marasmius* – *M. alliaceus*, *M. scorodoni*, *M. prasio* nebo *M. copelandi*. V porovnání s houbou *Lentinula edodes* nemají však ani zdaleka takovou výzkumnou historii. Provedené výzkumy byly zaměřeny obvykle na izolaci prekursoru těkavých sensoricky aktivních sloučenin, γ -glutamyl-marasminu (**21**), případně na izolaci antimikrobiálních sloučenin, které ale k sensorickým vlastnostem výrazně nepřispívají (KAVANAGH *et al.*, 1949; ANKE *et al.*, 1981; RAPIOR *et al.*, 1997).

Lanýže (např. *Tuber magnatum* a *Tuber melanosporum*) jsou dalšími zástupci jedlých hub, které jsou charakteristické svými výraznými sensorickými vlastnostmi, pro které jsou velmi ceněny zejména v kulinářství. Těkavé sirné sloučeniny lanýžů však kupodivu byly předmětem jen několika málo vědeckých studií (TALOU *et al.*, 1987; PELUSIO *et al.*, 1995, BELLESIA *et al.*, 1996), které identifikovaly zejména majoritní sloučeninu bis(methylthio)methan (**33**).

Teoretická část diplomové práce nabízí popis i ostatních druhů hub, které jsou svými sensorickými vlastnostmi charakteristické, což v mnohých případech dokládá i jejich rodový nebo druhový název. Zejména aroma těchto hub lze připodobnit například k česneku nebo cibuli, případně k některým druhům brukvovité zeleniny. Podobnost sensorických vlastností tedy poskytuje předpoklad existence podobných těkavých sirných sloučenin, případně jejich prekursorů. Pro tuto domněnku však dosud nejsou k dispozici vědecké studie, které by ji potvrdily, případně vyvrátily.

2.1 Rod *Lentinula* Earle (houževnatec)

Lentinula edodes (Berk.) Pegler (česky houževnatec jedlý, Obrázek 1a-b), dále jen *LE*, je jedlá dřevokazná houba pocházející z východní Asie. Napadá listnaté stromy zejména dub, kaštan, buk či javor. Zdaleka nejpůvodnějším označením této houby je shiitake, pod kterým je známa po celém světě (RAHMAN & CHOUDHURY, 2013).



a)



b)

Obrázek 1: *Lentinula edodes* a) plodnice¹; b) detail růstu².

Taxonomicky se tato houba řadí do oddělení Basidiomycota – houby stopkovýtrusé, třídy Agaricomycetes – stopkovýtrusé, řádu Agaricales – pečárkotvaré a čeledi Marasmiaceae – špičkovité (SERVER BIOLIB.CZ).

LE je jednou z nejpůvodnějších jedlých hub v Japonsku a dalších zemích Dálného východu. V současné době je *LE* jednou z pěti nejpěstovanějších jedlých hub na světě. Zasloužila se o to nejen její charakteristická chuť a vůně, ale i řada výzkumů, které potvrdily výrazné léčivé vlastnosti této houby. Do této doby bylo izolováno již několik sloučenin, u kterých byly vědecky potvrzeny pozitivní účinky na lidské zdraví (RAHMAN & CHOUDHURY, 2013).

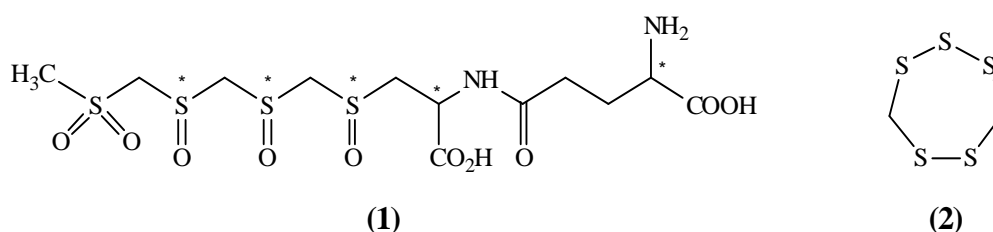
¹ http://www.nahuby.sk/obrazok_detail.php?obrazok_id=373392; staženo 24. 9. 2013

² http://www.nahuby.sk/obrazok_detail.php?obrazok_id=291594; staženo 24. 9. 2013

2.1.1 Biologicky aktivní sloučeniny

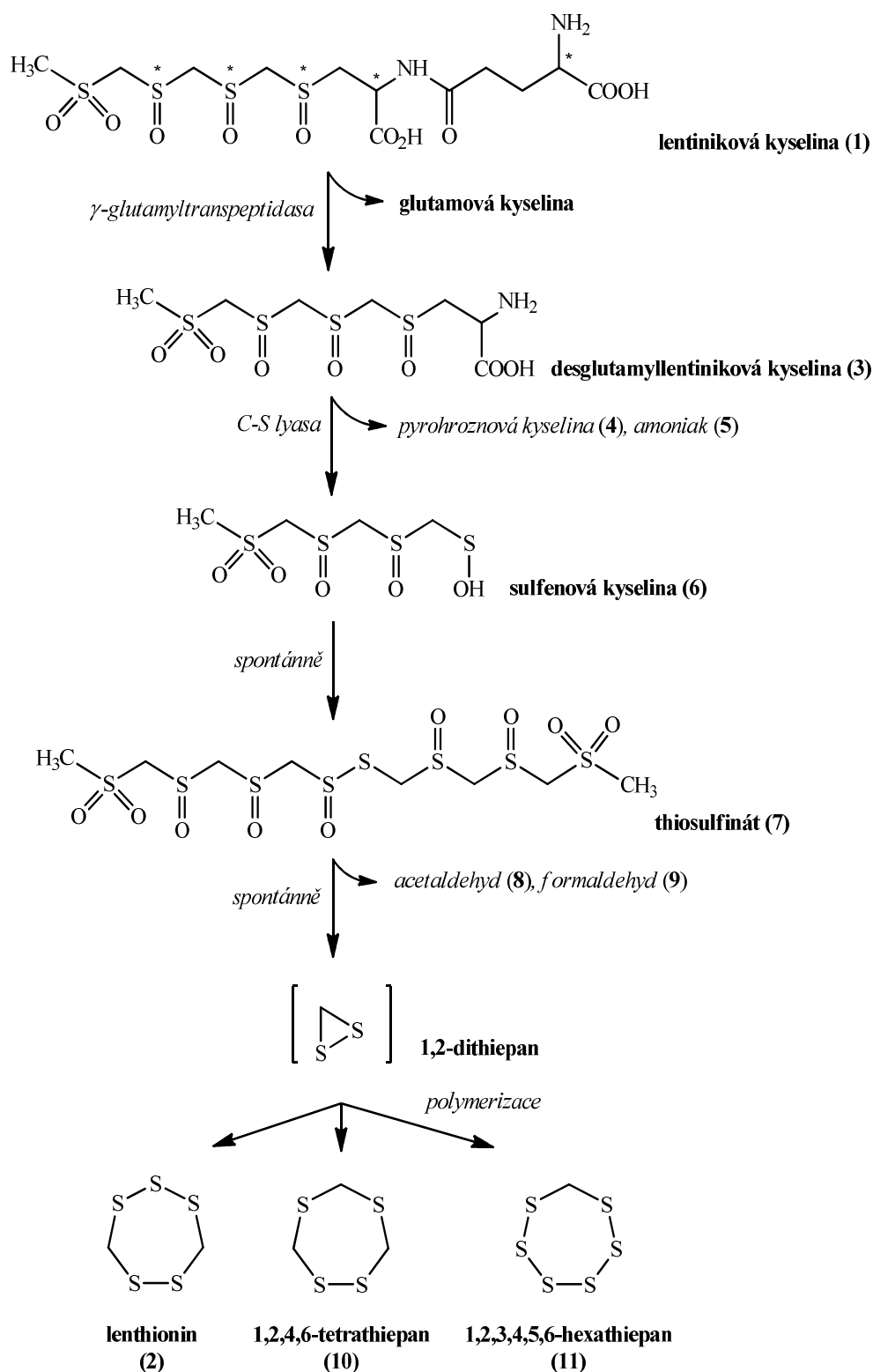
Cyklická sirná sloučenina s triviálním názvem lenthionin (**2**) (1,2,3,5,6-pentathiepan, Obrázek 2) byla identifikována jako hlavní sensoricky aktivní látka, která výrazně přispívá k typickému aroma *LE*. Netěkavým prekurzorem těkavých sirných sloučenin, včetně lenthioninu (**2**), byl určen *S*-substituovaný derivát cysteinu, triviálně lentiniková kyselina (**1**) (Obrázek 2). Přesná struktura této sloučeniny byla po několika letech výzkumů identifikována jako 2-(γ -glutamylamino)-4,6,8,10,10-pentaoxo-4,6,8,10-tetrathiaundekanová kyselina (YASUMOTO *et al.*, 1971a; YASUMOTO *et al.*, 1971b; IWAMI, 1975).

Čerstvé plodnice *LE* vykazují pouze mírné česnekové aroma, zatímco porušením pletiva či během sušení se stává intenzivnějším. Prvotní výzkumy (YASUMOTO *et al.*, 1971b) byly založeny na sledování obsahu lentinikové kyseliny (**1**) v extraktech *LE* v závislosti na intenzitě typických sensorických vlastností této houby. Byl nalezen inverzní vztah mezi obsahem lentinikové kyseliny (**1**) a intenzitou sensorických vlastností houbových extraktů. Tento vztah spolu s poměrně vysokým obsahem síry v lentinikové kyselině (**1**) naznačoval průběh enzymatické reakce, při které je lentiniková kyselina (**1**) převedena na lenthionin (**2**) a další cyklické sirné sloučeniny.



Obrázek 2: Struktura lentinikové kyseliny (**1**), lenthioninu (**2**).

Novější studie (CHEN & HO, 1986; SHIGA *et al.*, 2004) upřesnily dvoukrokovou enzymatickou reakci, při které lenthionin (**2**) vzniká z lentinikové kyseliny (**1**). Této reakce se účastní enzymy γ -glutamyltranspeptidasa a C-S lyasa. YASUMOTO *et al.* (1971a) ve své studii prokázali, že nejvyšší aktivita enzymů katalyzujících rozklad lentinikové kyseliny (**1**) je okolo hodnoty pH 8 až 8,6. K inaktivaci těchto enzymů dochází při pH nižším než 5.



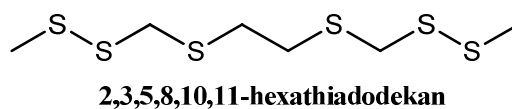
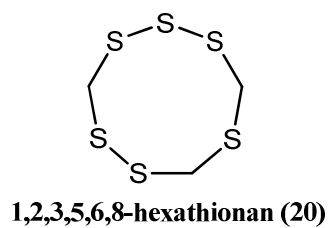
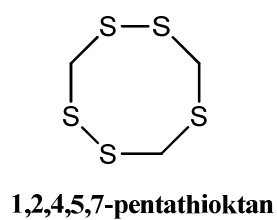
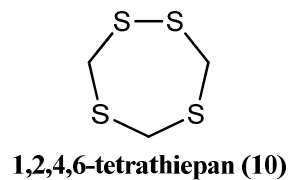
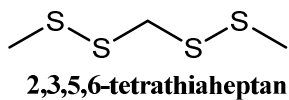
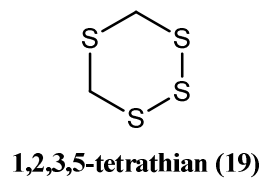
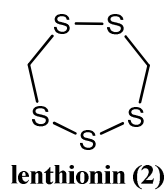
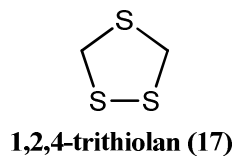
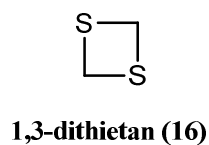
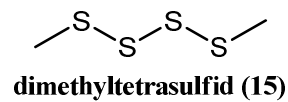
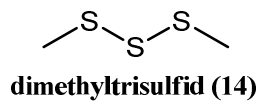
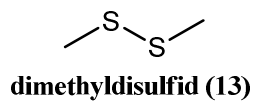
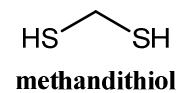
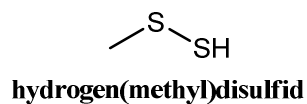
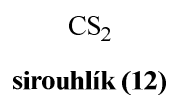
Obrázek 3: Mechanismus tvorby sirných sloučenin z lentinikové kyseliny (1) (CHEN & HO, 1986).

Lentiniková kyselina (**1**) je nejprve přeměněna na desglutamylentinikovou kyselinu (**3**) za účasti enzymu γ -glutamyltranspeptidasy. Tuto část reakce lze označit jako rychlost určující krok ve formování těkavých sirných sloučenin. Katalytickou reakcí specifické C-S lyasy je vzniklý cysteinsulfoxid dále rozložen na pyrohroznovou kyselinu (**4**), amoniak (**5**) a thiosulfinát (**7**). Tento nestabilní thiosulfinát (**7**) spontánně degraduje na celou řadu cyklických sirných sloučenin, včetně lenthioninu (**2**), za současného uvolňování formaldehydu (**9**) a acetaldehydu (**8**) (CHEN & HO, 1986; SHIGA *et al.*, 2004).

GMELIN *et al.* (1980) izolovali z *LE* ještě jeden diastereomer lentinikové kyseliny (**1**), epilentinikovou kyselinu (**23**). Lentiniková kyselina (**1**) obsahuje v postranním řetězci tři chirální centra, díky kterým může tvořit až osm stereoizomerních forem. Konfigurační rozdíly mezi lentinikovou (**1**) a epilentinikovou kyselinou (**23**) však zatím nebyly stanoveny. Epilentiniková kyselina (**23**) byla izolována i z dalších druhů hub – *Marasmius perforans* (česky špička provrtaná, viz kapitola 2.2), *Gymnopus foetidus* (penízovka odporná), *Gymnopus hariolorum* (penízovka věštecká), *Gymnopus brassicolens* (penízovka smrdutá) a *Gymnopus impudicus* (penízovka nestoudná) (viz kapitola 2.3).

2.1.2 Těkavé sirné sloučeniny

Těkavými sirnými sloučeninami *LE* se zabývali CHEN & HO (1986), kteří pomocí GC/MS identifikovali celkem 18 těkavých sirných sloučenin (Obrázek 4). Majoritní identifikovanou sloučeninou byl lenthionin (**2**), v minoritním množství byly nalezeny také sirouhlík (**12**), dimethyltrisulfid (**14**), 1,2,4-trithiolan (**17**), 1,2,4,5-tetrathian (**18**), 1,2,3,5-tetrathian (**19**) a lenthionin (**2**).



Obrázek 4: Těkavé sirné sloučeniny *LE* (CHEN & HO, 1986).

2.2 Rod *Marasmius* Fr. (špička)

Rod *Marasmius* Fr. (špička) se taxonomicky řadí do oddělení Basidiomycota – houby stopkovýtrusé, třídy Agaricomycetes – stopkovýtrusé, řádu Agaricales – pečárkotváře a čeledi Tricholomataceae – čirůvkovité. Typickým mikroskopickým znakem jsou palisádové buňky, ze kterých je složena pokožka klobouku. Rostou saprotrofně, vzácně mohou parazitovat na tlejícím dřevě, jehličí nebo dalších rostlinných zbytcích (ANTONÍN, 2006).



Obrázek 5: *Marasmius* a) *alliaceus*³, b) *copelandi*⁴.

Marasmius alliaceus (Jacq.) Fr., česky špička cibulová (synonymní název *Mycetinis alliaceus* (Jacq.) Earle, Obrázek 5a), patří mezi jedlé houby s typickým česnekovým aroma, což dokládá i její latinský název pocházející z *allium* – česnek a *aceous* – podobně. Roste ve skupinách nebo jednotlivě, zejména na tlejícím bukovém dřevě a listí v období června až listopadu. (RAPIOR *et al.*, 1997; HAGARA *et al.*, 2006).

Marasmius copelandi (Peck) A. W. Wilson & Desjardin (Obrázek 5b) je jedlá houba s výrazným česnekovým nebo cibulovým aroma. Chuť této houby lze popsat jako česnekovou až mírně štiplavou. Díky svým výrazným sensorickým vlastnostem nachází uplatnění v kulinářství jako koření či jako náhrada česneku. Tepelné zpracování by mělo být prováděno za mírných podmínek, jinak dochází ke ztrátě jejích výrazných sensorických vlastností (ARORA, 1986; DAVIS *et al.*, 2012).

³ http://www.mykologie.net/index.php/houby/item/63-mycetinis_alliaceus; staženo 23. 9. 2013

⁴ http://mushroomobserver.org/image/show_image/65835?_js=on&_new=true&obs=28666&q=1YCXq; staženo 23. 9. 2013

Marasmius perforans (Hoffm.) Fr., česky špička provrtaná (synonymum *Gymnopus perforans* (Hoffm.) Antonín & Noordel., Obrázek 6a), je hojně se vyskytující nejedlá houba rostoucí zejména na opadaném smrkovém jehličí v období července až listopadu. Tato houba je charakteristická nepříjemným pachem své dužniny, který může připomínat hnilý zelí (ANTONÍN, 2006). GMELIN *et al.* (1980) izolovali ze špičky provrtané diastereomer lentinikové kyseliny (**1**), epilentinikovou kyselinu (**23**) (Obrázek 7).



Obrázek 6: *Marasmius* a) *perforans*⁵, b) *prasioanus*⁶, c) *scorodoni*⁷.

Mezi další zástupce rodu *Marasmius* s typickým česnekovým aroma dužniny lze také zařadit:

- ✓ *Marasmius prasioanus* (Fr.) Fr., česky špičku česnekovonnou (synonymní název *Marasmius querceus* Britzelm), Obrázek 6b,
- ✓ *Marasmius scorodoni* (Fr.) Fr., česky špičku česnekovou (synonymní název *Mycetinis scorodoni* (Fr.) A. W. Wilson), Obrázek 6c a další (REA, 1968; ANTONÍN, 2006; HAGARA *et al.*, 2006).

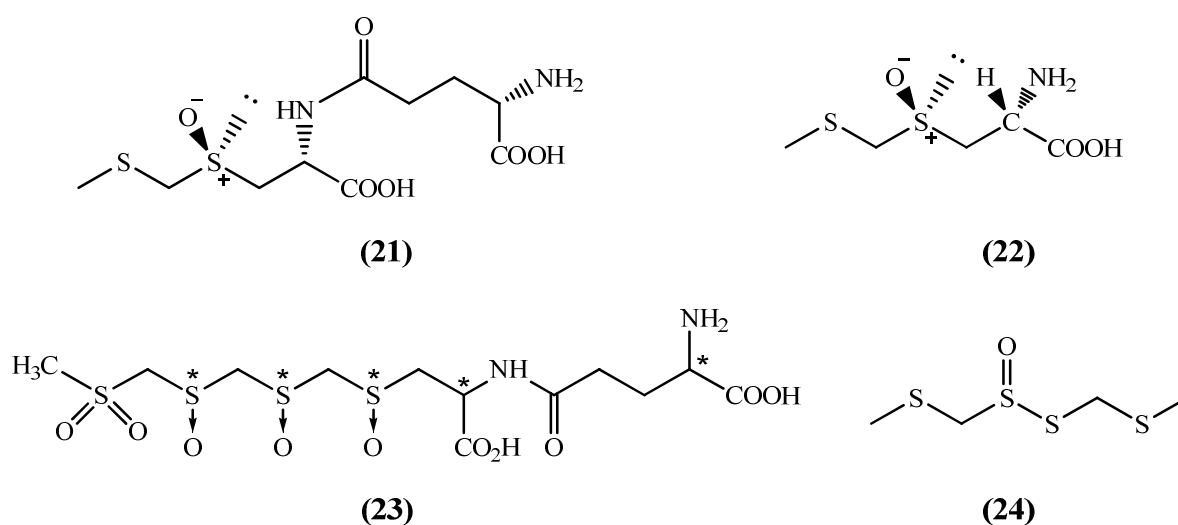
⁵ http://www.nahuby.sk/obrazok_detail.php?obrazok_id=177336; staženo 28. 9. 2013

⁶ <http://nagrzyby.pl/atlas/4929>; staženo 28. 9. 2013; upraveno

⁷ http://www.nahuby.sk/obrazok_detail.php?obrazok_id=40419; staženo 28. 9. 2013

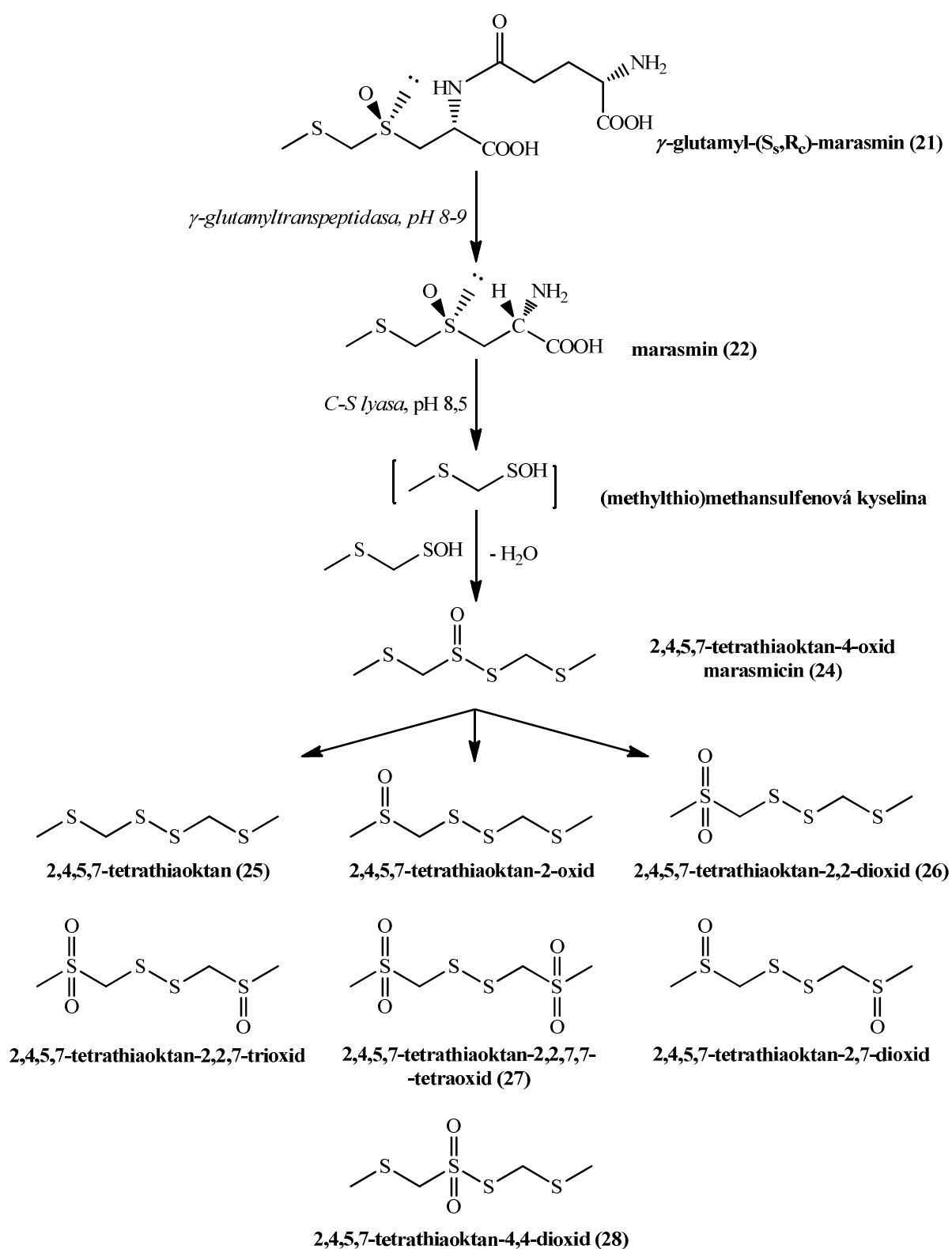
2.2.1 Senzoricky aktivní sloučeniny

Senzoricky aktivní sloučeniny v houbách rodu *Marasmius* vznikají enzymaticky ve dvou krocích z prekursoru ($S_S R_C$)- γ -glutamyl-3-(methylthiomethylsulfinyl)alaninu, triviálně γ -glutamyl-marasminu (**21**), Obrázek 7 (GMELIN *et al.*, 1976; ANKE *et al.*, 1981). Z *Marasmius perforans* (špičky provrtané) byla navíc izolována také epilentiniková kyselina (**23**) (Obrázek 7), která se v plodnicích vyskytuje spolu s lentinikovou kyselinou (**1**) (GMELIN *et al.*, 1980).



Obrázek 7: Struktura γ -glutamyl-marasminu (**21**); marasminu (**22**); epilentinikové kyseliny (**23**); marasmicinu (**24**).

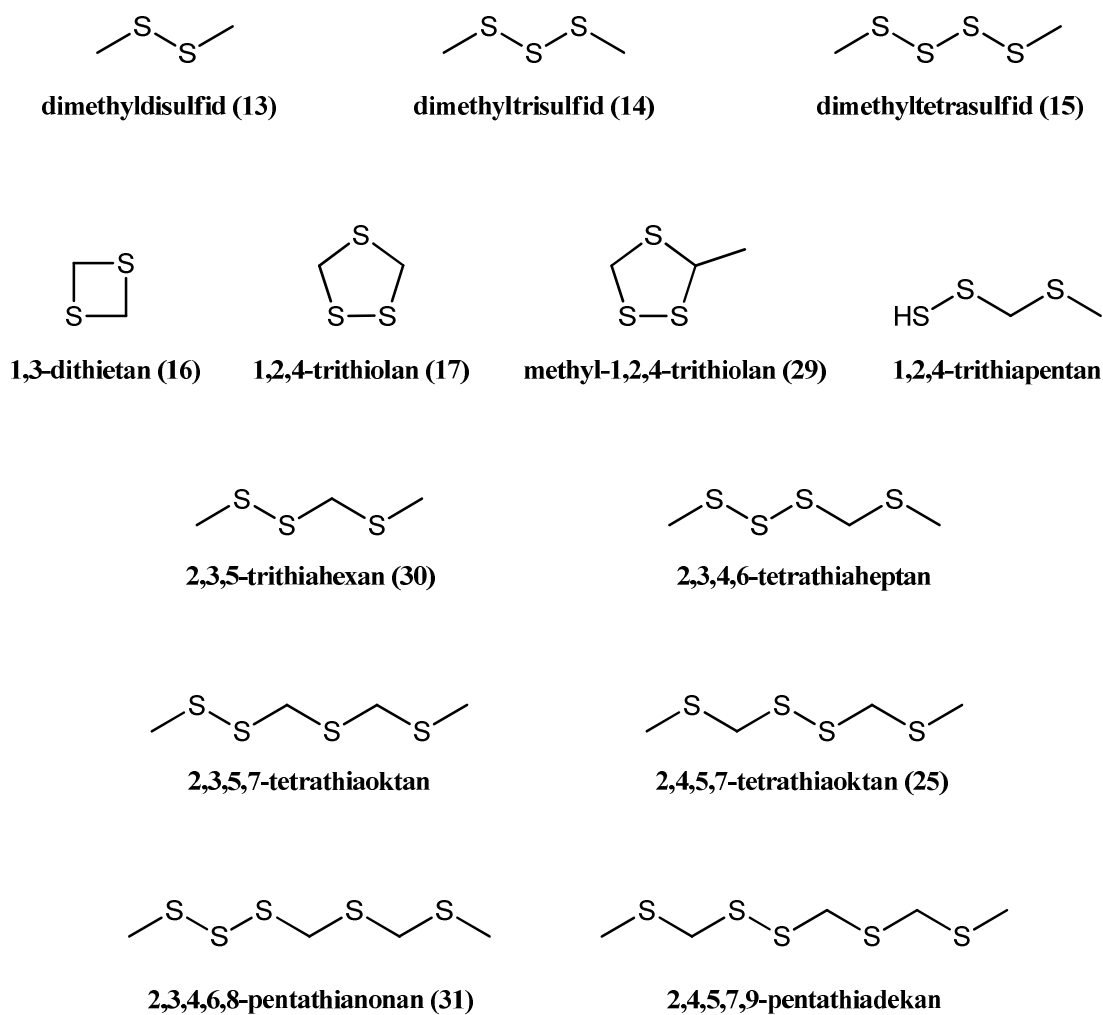
V prvním kroku je γ -glutamyl-marasmin (**21**) štěpen γ -glutamyltranspeptidasou. Vzniklá sloučenina marasmin (**22**) je v druhém kroku rozložena pomocí C-S lyasy na nestabilní sirnou sloučeninu marasmicin (**24**), který přitahuje značnou pozornost díky své protiplísňové a tuberkulostatické aktivitě. Tato sloučenina se dále rozkládá za vzniku sekundárních sensoricky aktivních sloučenin – 2,4,5,7-tetrathiaoktanu (**25**), 2,4,5,7-tetrathiaoktan-2,2-dioxidu (**26**), 2,4,5,7-tetrathiaoktan-2,2,7,7-tetraoxidu (**27**) a 2,4,5,7-tetrathiaoktan-4,4-dioxidu (**28**). Některé z nich vykazují výraznou antimikrobiální a protiplísňovou aktivitu (GMELIN *et al.*, 1976; KUBEC *et al.*, 2002). Reakční schéma enzymatického rozkladu γ -glutamyl-marasminu (**21**) uvádí Obrázek 8.



Obrázek 8: Mechanismus rozkladu γ -glutamyl-marasminu (**21**) (GMELIN *et al.*, 1976; KUBEC *et al.*, 2002).

2.2.2 Těkavé sirné sloučeniny

RAPIOR *et al.* (1997) ve své studii identifikovali těkavé senzory aktivní sloučeniny houby *Marasmius alliaceus*. Vzorek čerstvých plodnic byl po dobu pěti hodin extrahován dichlormethanem v Soxhletově extraktoru za atmosférického tlaku. Výsledný extrakt se silným česnekovým aroma byl následně analyzován metodou GC/MS. Identifikované sloučeniny jsou uvedeny na Obrázku 9.



Obrázek 9: Těkavé sirné sloučeniny izolované z *Marasmius alliaceus* (RAPIOR *et al.*, 1997).

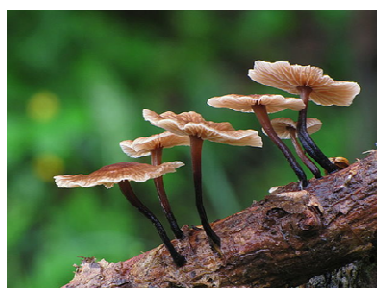
2.3 Rod *Gymnopus* (Pers.) Roussel (penízovka)

Rod *Gymnopus* (Pers.) Roussel se taxonomicky řadí do třídy Agaricomycetes – houby stopkovýtřusé, řádu Agaricales – pečárkotvaré a čeledi Tricholomataceae – čirůvkovité (ANTONÍN, 2006).

U následujících druhů rodu *Gymnopus* byl ve studii GMELIN *et al.* (1980) izolován diastereomer lentinikové kyseliny (**1**), epilentiniková kyselina (**23**) (Obrázek 7).



a)



b)

Obrázek 10: *Gymnopus* a) *brassicolens*⁸, b) *foetidus*⁹.

Gymnopus brassicolens (Romagn.) Antonín & Noordel., česky penízovka smrdutá (synonymní název *Micromphale cauvetii* Maire et Kühner, Obrázek 10a), je nejedlá houba hojně rostoucí v období května až listopadu v listnatých i smíšených lesích. Pach dužniny lze přirovnat ke hniječímú zelí. Klobouk má červenohnědé zbarvení. Roste obvykle ve skupinách v listnatých nebo smíšených lesích (HAGARA, 2006).

Gymnopus foetidus (Sowerby) J.L. Mata & R.H. Petersen, česky penízovka odporná (synonymní název *Micromphale foetidum* (Sowerby) Singer, Obrázek 10b), je nejedlá houba nepřilíš hojně rostoucí v období května až listopadu. Svou morfologií se velmi podobá penízovce smrduté (HAGARA, 2006).

8

http://www.nahuby.sk/obrazok_detail.php?obrazok_id=333107&poradie=1&form_hash=fe27433d91e44c1db9db2465f30bb64c; staženo 4. 11. 2013

⁹ http://www.nahuby.sk/obrazok_detail.php?obrazok_id=204226; staženo 4. 11. 2013



a)



b)

Obrázek 11: *Gymnopus* a) *hariolorum*¹⁰, b) *impudicus*¹¹.

Dalšími druhy, ze kterých byla izolována epilentiniková kyselina (**23**), jsou *Gymnopus hariolorum* (Bull.) Antonín, Halling & Noordel. (synonymní název *Collybia hariolorum* (Fr.) Quel., penízovka věštecká, Obrázek 11a) a *Gymnopus impudicus* (Fr.) Antonín, Halling & Noordel. (penízovka nestoudná, Obrázek 11b). Sensorické vlastnosti těchto druhů hub lze přirovnat k zápachu hniječícího zelí (GMELIN *et al.*, 1980; HAGARA, 2006).

2.3.1 Další zástupci rodu *Gymnopus* s výraznými sensorickými vlastnostmi

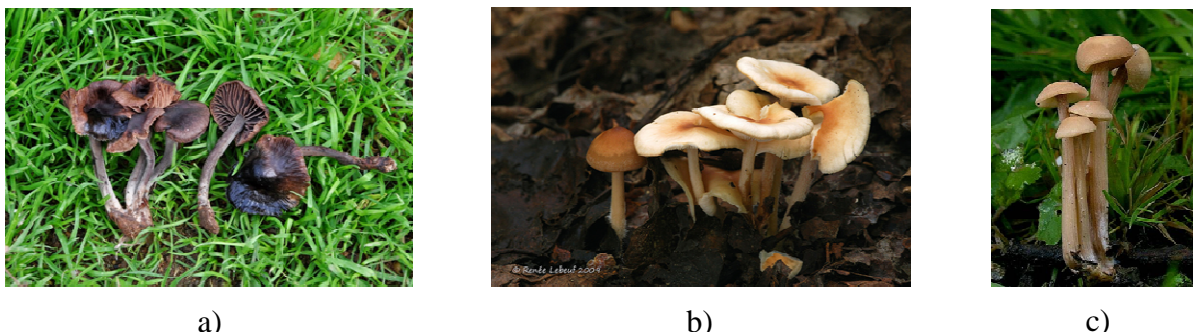
Pro další uvedené zástupce rodu *Gymnopus* nejsou zatím k dispozici vědecké studie, které by potvrdily přítomnost epilentinikové kyseliny (**23**). Jejich velmi výrazné sensorické vlastnosti však přítomnost epilentinikové kyseliny (**23**) či jiných sirných sloučenin naznačují. POLEMIS & NOORDELOOS v roce 2007 popsali nový druh houby rodu *Gymnopus* (Pers.) Roussel, *Gymnopus dysosmus* Polemis & Noordel (Obrázek 12a), pocházející z řeckého ostrova Andros. Vyznačuje se výrazným česnekovým aroma a svými vlastnostmi je velmi podobná houbě rodu *Gymnopus impudicus*, česky penízovce nestoudné.

Gymnopus polyphyllus (Peck) Halling (synonymní název *Collybia polyphyla* (Peck) Singer ex Halling), zatím bez českého názvu a neznámé požitelnosti (Obrázek 12b). V zahraničí je tato houba známa pod názvem „Bad Cabbage Collybia“, což vystihuje i její sensorické vlastnosti. ARORA (1986) ve své publikaci tyto vlastnosti popisuje jako

¹⁰ http://www.nahuby.sk/obrazok_detail.php?obrazok_id=386258; staženo 14. 10. 2013

¹¹ http://botzool.sci.muni.cz/excursion/alpy2006/images/Gymnopus_impudicus.jpg; staženo 14. 10. 2013

česnekové až lehce nepříjemné. Hojně roste ve skupinách na humusu nebo v okolí rozkládajících se pařezů v listnatých nebo smíšených lesích (ROODY, 2003).



Obrázek 12: *Gymnopus* a) *dysosmus*¹², b) *polyphyllus*¹³, c) *confluens*¹⁴.

Výrazné česnekové aroma dužniny je charakteristické i pro některé další zástupce rodu *Gymnopus*:

- ✓ *Gymnopus confluens* (Pers.) Antonín, Haling & Noordel. (Obrázek 12c), česky penízovku splývavou (BESSETTE, 1997),
- ✓ *Gymnopus contrarius* (Peck) Halling (synonymní název *Collybia pinastris* (Kauffman) Mitchel & A. H. Sm.) (BESSETTE, 1997; POLEMIS & NOORDELOOS, 2007),
- ✓ *Gymnopus dysodes* (Halling) Halling (synonymní název *Collybia dysodes* Halling) (BESSETTE, 1997)
- ✓ a *Gymnopus herinkii* Antonín & Noordel., česky penízovku Herinkovu či penízovku pórkovou, která byla kvůli svému omezenému výskytu zařazena do Červeného seznamu hub České republiky (ANTONÍN, 2006; HOLEC *et al.*, 2006).

¹²

<https://plus.google.com/photos/103637347496712025548/albums/5879429727428788353/5879435169623645218?banner=pwa&pid=5879435169623645218&oid=103637347496712025548>; staženo 11. 10. 2013

¹³

<http://www.mycouquebec.org/bas.php?post=Gymnopus&l=r&nom=Gymnopus%20polyphyllus%20/%20Collybie%20C3%A0%20maintes%20lames&tag=Gymnopus%20polyphyllus&gro=27>; staženo 11. 10. 2013

¹⁴

http://www.nahuby.sk/obrazok_detail.php?obrazok_id=116041; staženo 11. 10. 2013

2.4 Rod *Tuber P. Micheli ex F. H. Wigg. (lanýž)*

Lanýže jsou velmi vzácné jedlé houby rostoucí pod zemí. Taxonomicky se tyto houby řadí do oddělení Ascomycota – houby vřeckovýtrusé, třídy Pezizomycetes, řádu Pezizales – kustřebkotvaré a čeledi Tuberaceae – lanýžovité (ANTONÍN, 2006).



a)

b)

Obrázek 13: *Tuber a) magnatum*¹⁵ b) *melanosporum*¹⁶.

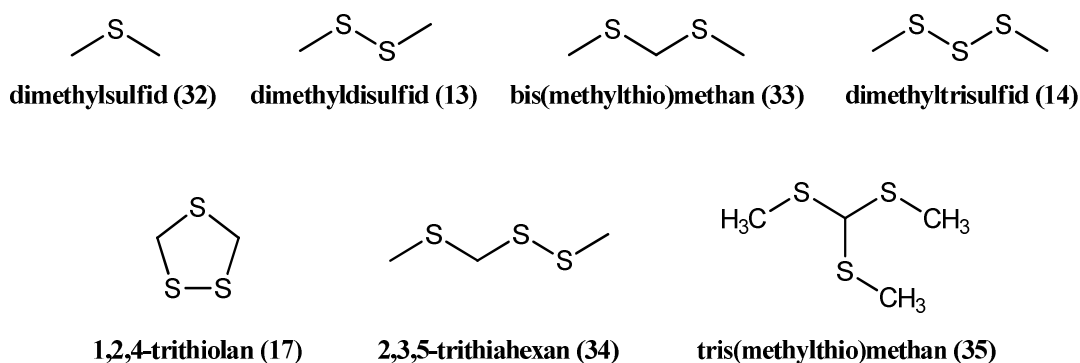
Bílý lanýž (*Tuber magnatum* Pico, česky lanýž piemontský (Obrázek 13a), je vysoce ceněný zejména díky svému intenzivnímu aroma. Černý lanýž (*Tuber melanosporum* Vitt., česky lanýž černovýtrusý, Obrázek 13b), vykazuje mírnější aroma. U obou druhů byly identifikovány těkavé sírné sloučeniny, které odpovídají za jejich typické aroma (TALOU *et al.*, 1987; PELUSIO *et al.*, 1995, BELLESIA *et al.*, 1996).

Bílý lanýž je z komerčního hlediska jedním z nejvýznamnějších druhů rodu *Tuber*. Těkavé sírné sloučeniny bílého lanýže byly předmětem studie FIECCHI *et al.* (1967), ve které byl poprvé identifikován a izolován bis(methylthio)methan (**33**) jako jedna z nejvýznamnějších těkavých sloučenin této houby. Mezi dalšími těkavými sírnými sloučeninami identifikovanými ve studii PELUSIO *et al.* (1995) byly dimethylsulfid (**32**), dimethyldisulfid (**13**), dimethyltrisulfid (**14**), 1,2,4-trithiolan (**17**), tris(methylthio)methan (**35**) a 2,3,5-trithiahexan (**34**).

¹⁵ <http://hostingkartinok.com/news/wp-content/uploads/2013/07/white-truffle.jpg>; staženo 3. 11. 2013

¹⁶ <http://www.montanaroue.com/2013/08/come-and-truffle-along.html>; staženo 3. 11. 2013

BELLESIA *et al.* (1996) analyzovali obsah těkavých sloučenin bílého lanýže v závislosti na skladovacích podmínkách. Při teplotě 0 °C bylo pozorováno mírné snížení v koncentraci majoritní sloučeniny bis(methylthio)methanu (**33**). Výrazných rozdílů v koncentraci těkavých sloučenin bylo dosahováno při skladování za pokojové teploty po dobu několika dnů. Po 4–5 dnech byl bis(methylthio)methan (**33**) pouze minoritní sloučeninou. Velký nárůst koncentrace byl zaznamenán u dimethyldisulfidu (**13**).



Obrázek 14: Těkavé sírné sloučeniny identifikované v *Tuber magnatum* a *Tuber melanosporum* (FIECCHI *et al.* v roce 1967; TALOU *et al.*, 1987; PELUSIO *et al.*, 1995; BELLESIA *et al.*, 1996; MAURIELLO *et al.*, 2004).

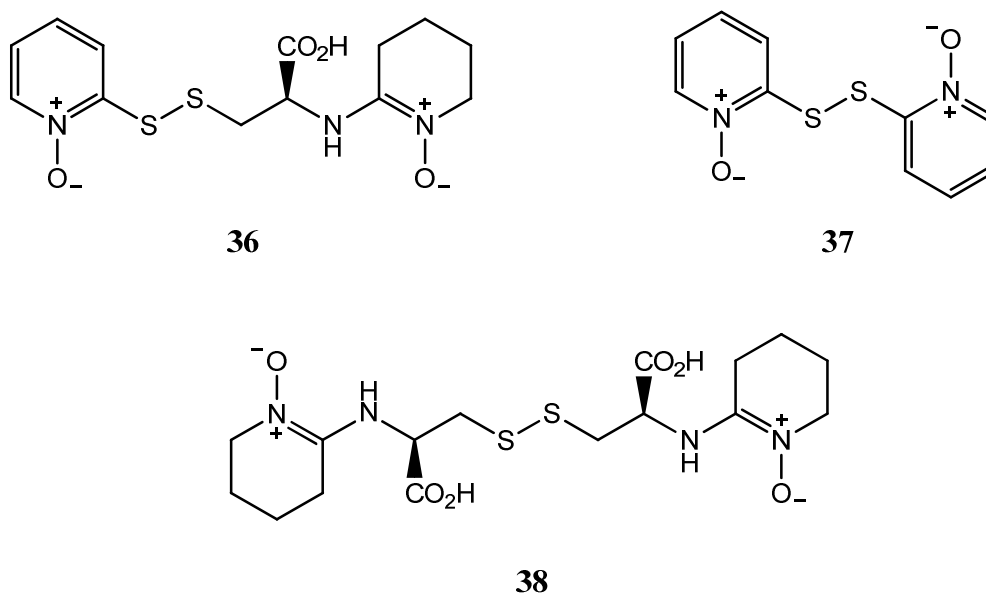
TALOU *et al.* (1987) a MAURIELLO *et al.* (2004) analyzovali těkavé sírné sloučeniny černého lanýže, mezi kterými identifikovali v minoritním množství pouze dimethylsulfid (**32**). Studie PELUSIO *et al.* (1995), zabývající se podobnou problematikou, identifikovala v černých lanýžích kromě již zmíněných sloučenin také bis(methylthio)methan (**33**).

Ačkoliv hlavní těkavé sloučeniny lanýžů (Obrázek 14) byly identifikovány, doposud není jasné, zdali jsou tyto látky přítomny i v neporušených plodnicích, nebo vznikají až sekundárními reakcemi z netěkavých prekurzorů při narušení pletiva.

2.5 Rod *Cortinarius* (Pers.) Gray (pavučinec)

Rod *Cortinarius* (Pers.) Gray, česky pavučinec nebo též lilák, pahřib, kožohlav nebo vodohlav, se taxonomicky řadí do třídy Agaricomycetes – houby stopkovýtrusé, řádu Agaricales – pečárkotvaré a čeledi Cortinariaceae – pavučincovitě. Rod *Cortinarius* (Pers.) Gray je nejobsáhlejším rodem lupenatých hub na světě. Typickou vlastností celé řady druhů hub tohoto rodu je výrazné ředkvové aroma (ANTONÍN, 2006).

Sírnými sloučeninami rodu *Cortinarius* se zabývala studie NICHOLASE *et al.* (2001). Z plodnic několika zástupců tohoto rodu byly izolovány celkem tři disulfidické sloučeniny (Obrázek 15). Lze však předpokládat, že sloučeniny **36** a **37** vznikají až během izolace, nelze je tedy považovat za přirozeně se vyskytující metabolity hub rodu *Cortinarius*.



Obrázek 15: Disulfidické sloučeniny identifikované v rodu *Cortinarius* (NICHOLAS *et al.*, 2001)

Pavučinec rumělkový s latinským názvem *Cortinarius cinnabarinus* Fr. (synonymní název *Dermocybe cinnabarina* (Fr.) Wünsche, Obrázek 16a), je nejedlá houba rostoucí vzácně v listnatých lesích v období září až října. Klobouk je za vlhka krvavě červený, za sucha rumělkově červený nebo oranžový. Třeň má rumělkově červené velum.

Charakteristickým znakem pavučinec rumělkového je dužnina s ředkvovou vůní i chutí. (ANTONÍN, 2006; HAGARA *et al.*, 2006).



a)



b)

Obrázek 16: *Cortinarius* a) *cinnabarinus*¹⁷, b) *phoeniceus*¹⁸.

Cortinarius phoeniceus (Vent.) Maire, česky pavučinec hnědočervený (Obrázek 16b), je dalším příkladem druhu rodu *Cortinarius* s ředkvovým aroma dužniny. Roste velmi hojně v borových a smrkových lesích v období srpna až října. Z hlediska jeho požitelnosti se údaje v odborné literatuře značně liší (REA, 1968; ANTONÍN, 2006; HAGARA *et al.*, 2006).

Ředkvové aroma dužniny je typické i pro některé další zástupce tohoto rodu:

- ✓ *Cortinarius acutus* (Pers.) Fr. (česky pavučinec hrotitý),
- ✓ *Cortinarius argentatus* (Pers.) Fr. (pavučinec stříbřitý),
- ✓ *Cortinarius melinus* Britzelm. (česky pavučinec medový),
- ✓ *Cortinarius orellanus* Fr. (česky pavučinec plyšový),
- ✓ *Cortinarius raphanoides* (Pers.) Fr. (česky pavučinec ředkvičkovitý),
- ✓ *Cortinarius rubellus* (pavučinec výjimečný),
- ✓ *Cortinarius sanguineus* (Wulfen) Gray (pavučinec krvavý),
- ✓ *Cortinarius sommerfeltii* Høiland (pavučinec Sommerfeltův) a další (REA, 1968; ZERVAKIS *et al.*, 2002; SHIBATA, 2004; ANTONÍN, 2006; HAGARA *et al.*, 2006).

¹⁷ http://www.nahuby.sk/obrazok_detail.php?obrazok_id=236279; staženo 11. 10. 2013

¹⁸ http://www.nahuby.sk/obrazok_detail.php?obrazok_id=244263&poradie=1&form_hash=a75029b1c0cf50d054421e43e7b25c63; staženo 11. 10. 2013

2.6 Rod *Phallus* L. (hadovka)

Rod *Phallus* L., česky hadovka, taxonomicky náleží do třídy Agaricomycetes – houby stopkovýtrusé, řádu Phallales – hadovkotvaré a čeledi Phallaceae – hadovkovité. Typickou vlastností tohoto rodu je pokrytí klobouku páchnoucí vrstvou, teřichem, který obsahuje výtrusy roznášené hmyzem. V ČR rostou pouze dva zástupci tohoto rodu – *Phallus impudicus* L. (hadovka smrdutá) a *Phallus hadriani* Vent. (hadovka valčická) (ANTONÍN, 2006).

Jedlá houba *Phallus impudicus* L. (česky hadovka smrdutá, Obrázek 17b-c) roste velmi hojně převážně v listnatých lesích v období května až listopadu. V některých případech lze pod kloboukem nalézt vyčnívající síťovité velum, tento poddruh je pak označován jako hadovka smrdutá závojová, *P. impudicus* var. *pseudoindusiatus* (ANTONÍN, 2006).



Obrázek 17: a) *Sauromatum guttatum*¹⁹; b-c) *Phallus impudicus*^{20,21}.

Těkavými sloučeninami houby *Phallus impudicus* se ve své studii zabývala BORG-KARLSONOVÁ (1994). Předpoklad k výzkumu jí poskytly podobnosti v aromatických vlastnostech této houby s rostlinou rodu *Sauromatum guttatum* Schott (Obrázek 17a). *Phallus impudicus* totiž emituje podobné hnilobné aroma a za účelem rozptýlení svých výtrusů přitahuje hmyz, který patří do stejného rodu jako hmyz šířící pyl rostliny

¹⁹ http://hortus.leidenuniv.nl/index.php?Hortus/fotos_single/3503/47/; staženo 19. 10. 2013

²⁰ <http://www.panoramio.com/photo/45019392>; staženo 19. 10. 2013

²¹ http://www.hlasek.com/phallus_impudicus.html; staženo 19. 10. 2013

Sauromatum guttatum. V obou případech byly mezi majoritními těkavými sloučeninami identifikovány dimetyldisulfid (**13**) a dimethyltrisulfid (**14**) (Obrázek 18).



Obrázek 18: Těkavé sirné sloučeniny rodu *Phallus impudicus*: dimetyldisulfid (**13**); dimethyltrisulfid (**14**) (BORG-KARLSONOVÁ, 1994).

2.7 Další druhy hub s výraznými sensorickými vlastnostmi

V následujících kapitolách jsou uvedeny další zástupci hub, které disponují výraznými sensorickými vlastnostmi. V mnohých případech tuto skutečnost naznačuje i rodový nebo druhový název (*Amanita alliacea*, *Entoloma alliodorum*, pavučinec ředkvičkovitý, penízovka pórková, slzivka ředkvičková apod.). Sensorické vlastnosti, zejména však aroma těchto druhů hub, lze připodobnit k dobře prostudovaným rostlinám, například k česneku a cibuli, případně k brukvovité zelenině. Přítomnost těkavých sirných sloučenin byla u těchto druhů rostlin potvrzena mnoha studii. Díky podobnostem v sensorických vlastnostech těchto druhů hub a rostlin lze očekávat i jisté analogie v obsahu těkavých sirných sloučenin. Zatím však nejsou k dispozici studie, které by tuto domněnku potvrdily.

2.7.1 Rod *Amanita* Pers. (muchomůrka)

Rod *Amanita* Pers., česky muchomůrka, se taxonomicky řadí do třídy Agaricomycetes – houby stopkovýtrusé, řádu Agaricales – pečárkotvaré a čeledi Amanitaceae – muchomůrkovité. Tento druh lze charakterizovat jako masité kloboukaté houby, jejichž plodnice jsou v mládí opatřeny celkovým obalem, ze kterého mohou zůstat

zbytky v podobě útržků na klobouku. Některé druhy mají částečný obal, ze kterého zůstává na třeni prsten (ANTONÍN, 2006).

Amanita aestivalis Singer ex Singer (Obrázek 19a) je houba rodu *Amanita* Pers. vykazující česnekové aroma. Nevýrazné nebo téměř chybějící česnekové či cibulové aroma v počátečních fázích růstu se ve stáří stává intenzivnějším (SINGER, 1959).



Obrázek 19: *Amanita* a) *aestivalis*²², b) *suballiacea*²³.

Silné česnekové aroma přetrvávající po určitou dobu i u sušených plodnic je typické také pro *Amanita suballiacea* (Murrill) Murrill (synonymní název *Venenarius suballiaceus* (Murrill) Murrill, Obrázek 19b) a *Amanita alliacea* (Murrill) Murrill (synonymní název *Venenarius alliaceus* (Murrill) Murrill) (Murrill, 1941). *Amanita suballiacea* i *Amanita alliacea* byly poprvé nalezeny v roce 1938 v listnatých lesích na Floridě. Pro své velmi charakteristické senzorní vlastnosti lze tyto druhy odlišit například od velmi podobného druhu *Amanita verna* (Bull.) Lam., s českým názvem muchomůrka jarní (MURRILL, 1941).

2.7.2 Rod *Entoloma* (Fr.) P. Kumm. (závojenka)

Rod *Entoloma* (Fr.) P. Kumm, česky též červenolupen, kulháček, trávnička nebo zvonovka, se taxonomicky řadí do třídy Agaricomycetes – houby stopkovýtrusé, řádu Agaricales – pečárkotvaré a čeledi Entolomataceae – závojenkovité (ANTONÍN, 2006).

²² <http://www.amanitaceae.org/image/uploaded/a/aestival.jpg>; staženo 25. 10. 2013

²³ <http://www.amanitaceae.org/image/uploaded/s/suballiacea-JJ-ARAM29sm.jpg>; staženo 25. 10. 2013

Po rodu *Cortinarius* (pavučinec) je druhým největším rodem řádu Agaricales. Tento rod zahrnuje v celosvětovém měřítku více než tisíc druhů. Jeho taxonomie je však poněkud rozporuplná. Někteří odborníci považují rod *Claudopus* Gillet za podrod rodu *Entoloma* (Fr.) P. Kumm., jiní za rod nezávislý. Zástupci tohoto rodu hojně rostou na neživé organické hmotě, jako je shnilé dřevo, kůra a různé rostlinné zbytky (HALAMA, 2011; LARGENT *et al.*, 2011).

Entoloma alliodorum Esteve-Rav., E. Horak & A. Ortega je teprve nedávno objeveným druhem houby podrodu *Claudopus* s česnekovým aroma. Poprvé byla objevena v Andalusii roku 2003 (ESTEVE-RAVENTÓS & ORTEGA, 2003).



Obrázek 20: *Entoloma mephiticum*^{24, 25}.

Pouze několik dalších druhů rodu *Entoloma* disponuje výraznými senzoryckými vlastnostmi. *Entoloma mephiticum* (Murrill) Hesler. (Obrázek 20), *E. vinaceocontusus* (T. J. Baroni) Esteve-Rav. & A. Ortega a *E. graveolens* Peck patří do podrodu *Claudopus* byly popsány pro jejich ostré či česnekové aroma (ESTEVE-RAVENTÓS & ORTEGA, 2003).

2.7.3 Rod *Hebeloma* (Fr.) P. Kumm. (slzivka)

Rod *Hebeloma* (Fr.) P. Kumm., česky slzivka, se taxonomicky řadí do třídy Agaricomycetes – houby stopkovýtřusé, řádu Agaricales – pečárkotvaré a čeledi Strophariaceae – límcovkovité (SERVER BIOLIB.CZ).

²⁴ <http://www.flickr.com/photos/31727756@N05/6784009035/sizes/m/in/photostream/>; staženo 29. 9. 2013

²⁵ <http://www.flickr.com/photos/21189203@N05/3072213332/sizes/m/in/set-72157603342162215/>; staženo 29. 9. 2013

Slzivka oprahlá (Obrázek 21a), latinsky *Hebeloma crustuliniforme* (Bull.) Quél., roste poměrně hojně pod celou řadou listnatých stromů v období srpna až října. Charakteristickým rysem této jedovaté houby je ředkvové aroma, případně nepříjemně hořká chuť (REA, 1968; BESSETTE, 1997; MCKNIGHT & MCKNIGHT, 1998; ANTONÍN, 2006)



a)



b)

Obrázek 21: *Hebeloma* a) *crustuliniforme*²⁶, b) *sinapizans*²⁷.

Hebeloma sinapizans (Paulet) Gillet., česky slzivka ředkvičková (Obrázek 21b), je jedovatou houbou rostoucí hojně v listnatých (zejména pod duby a buky) a smíšených lesích, vzácně i pod jehličnany, v období srpna až října. Dužnina disponuje velmi intenzivním ředkvoovým aroma (REA, 1968; BESSETTE, 1997; ANTONÍN, 2006).

Mezi další zástupce rodu *Hebeloma* s typickým ředkvoovým aroma patří také:

- ✓ *Hebeloma elatum* (Batsch) Sacc.,
- ✓ *Hebeloma mesophaeum* (Pers.) Quél. (česky slzivka opásaná),
- ✓ *Hebeloma velatum* Peck. a další (REA, 1968; BESSETTE, 1997; MCKNIGHT & MCKNIGHT, 1998; HARDING & OUTEN, 2003).

²⁶ http://www.nahuby.sk/obrazok_detail.php?obrazok_id=176783; staženo 2. 11. 2013

²⁷ http://www.nahuby.sk/obrazok_detail.php?obrazok_id=84065; staženo 2. 11. 2013

2.7.4 Rod *Hygrocybe* (Fr.) P. Kumm. (voskovka)

Rod *Hygrocybe* (Fr.) P. Kumm., česky voskovka, se taxonomicky řadí do třídy Agaricomycetes – houby stopkovýtrusé, řádu Agaricales – pečárkotvaré a čeledi Hygrophoraceae – šťavnatkovité. Kloboukaté houby tohoto rodu jsou typické svými masivními plodnicemi penízovkovitého, kalichovkovitého nebo helmovkovitého tvaru a slizkými klobouky (ANTONÍN, 2006).



Obrázek 22: *Hygrocybe helobia*²⁸⁻³⁰.

Převážně v jižních Čechách lze nalézt houbu s výrazným červeným zbarvením a česnekovým aroma, voskovku bažinnou, latinsky *Hygrocybe helobia* (Arnolds) Bon (Obrázek 22). Tento typ saprotrofní houby roste často na močálovitých loukách a rašeliništích. Její výskyt je však velmi vzácný, a byla proto zařazena do Červeného seznamu hub České republiky. První nález voskovky bažinné se datuje rokem 1993. Dřívější nálezy této houby byly patrně mylně určovány jako *Hygrocybe miniata* (Fr.) P. Kumm., česky voskovka krvavá, která má velmi podobný vzhled, ale nepatří mezi ohrožené druhy (LAESSØE & LINCOFF, 2002; HOLEC *et al.*, 2006).

²⁸ http://www.nahuby.sk/obrazok_detail.php?obrazok_id=125448; staženo 26. 10. 2013

²⁹ http://www.nahuby.sk/obrazok_detail.php?obrazok_id=166393; staženo 26. 10. 2013

³⁰ http://www.nahuby.sk/obrazok_detail.php?obrazok_id=366214; staženo 26. 10. 2013

2.7.5 Rod *Inocybe* (Fr.) Fr. (vláknice)

Rod *Inocybe* (Fr.) Fr., česky vláknice, se taxonomicky řadí do třídy Agaricomycetes – houby stopkovýtrusé, řádu Agaricales – pečárkotvaré a čeledi Inocybaceae (SERVER BIOLIB.CZ).



Obrázek 23: *Inocybe tahquamenonensis*³¹.

Houba s mírně ředkvovým aroma, *Inocybe tahquamenonensis* Stuntz (Obrázek 23), roste v období srpna až října. Klobouk je fialověhnědý až načervenalohnědý. Požitavlnost této houby je zatím neznámá. Třeň je pokrytý šupinkami shodného zbarvení jako klobouk (BESSETTE, 1997).

2.7.6 Rod *Lepiota* (Pers.) Gray (bedla)

ZELENÝ (2006) ve své studii sestavil seznam druhů hub rodu *Lepiota* (Pers.) Gray, vyskytujících se na území České republiky. *Lepiota medullata* (Fr.) Quél., česky bedla dřeňová, je zástupcem tohoto rodu se silným ředkvovým aroma dužniny. Roste zejména v období srpna až října v jehličnatých lesích (REA, 1968).

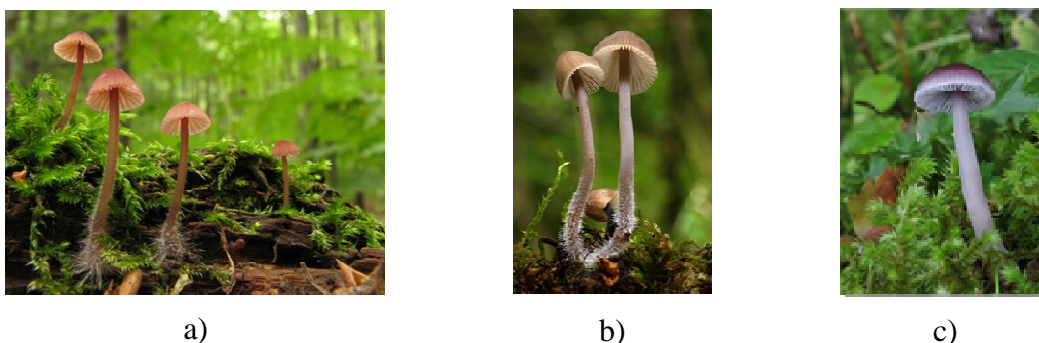
³¹http://www.nahuby.sk/obrazok_detail.php?obrazok_id=158378; staženo 23. 4. 2014

2.7.7 Rod *Mycena* (Pers.) Roussel (helmovka)

Rod *Mycena* (Pers.) Roussel se taxonomicky řadí do třídy Agaricomycetes – houby stopkovýtrusé, řádu Agaricales – pečárkotvaré a čeledi Tricholomataceae – čirůvkovité (ANTONÍN, 2006).

Nejedlá houba *Mycena sanguinolenta* (Alb. & Schwein) P. Kumm., česky helmovka krvavá (Obrázek 24a), hojně roste v období července až října na zbytcích kůry a větviček listnatých i jehličnatých lesích. Třeň je šedorůžový, bíle štětinatý a na lomu roní růžové mléko. Typická je svou chutí a vůní dužniny, která je slabě ředkvová (ANTONÍN, 2006).

Mycena galopus (Pers.) P. Kumm., česky helmovka mléčná (Obrázek 24b), je nejedlá houba s mírně ředkvovou vůní dužniny, kterou lze nalézt v listnatých i jehličnatých lesích na rozkládajících se zbytcích dřeva, větviček a odpadu v mechu. Kloubouk má zbarvení bělavé, béžové až světle šedohnědé, uprostřed černé. Třeň je válcovitý, bíle štětinatý (HAGARA, 2006).



Obrázek 24: *Mycena* a) *sanguinolenta*³², b) *galopus*³³, c) *pura*³⁴.

Mycena pura (Pers.) P. Kumm., česky helmovka ředkvičková (Obrázek 24c), je jedovatou houbou, rostoucí v období června až října v listnatých i jehličnatých lesích. I tento druh houby rodu *Mycena* je charakteristický pro ředkvovou vůni své dužniny. Kloubouk je zvoncovitý, ve stáří zvlňený, růžově fialový až namodralý, třeň stejného zbarvení jako kloubouk (REA, 1968; ANTONÍN, 2006; DAVIS *et al.*, 2012).

³² http://www.nahuby.sk/obrazok_detail.php?obrazok_id=38137; staženo 20. 10. 2013

³³ http://www.nahuby.sk/obrazok_detail.php?obrazok_id=200823; staženo 20. 10. 2013

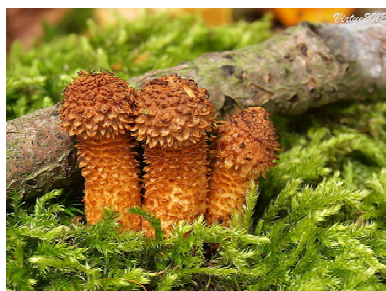
³⁴ http://www.nahuby.sk/obrazok_detail.php?obrazok_id=369885; staženo 20. 10. 2013

Charakteristické řekvové aroma dužniny je typické i pro některé další zástupce rodu *Mycena*:

- ✓ *Mycena pelianthina* (Fr.) Quél., česky helmovka zoubkatá,
- ✓ *Mycena polygramma* (Bull.) Gray, česky helmovka rýhonohá,
- ✓ *Mycena zephirus* (Fr.) P. Kumm., česky helmovka zefírová a další (REA, 1968; ANTONÍN, 2006).

2.7.8 Rod *Pholiota* (Fr.) P. Kumm. (šupinovka)

Rod *Pholiota* (Fr.) P. Kumm., česky šupinovka nebo též plaménka, se taxonomicky řadí do třídy Agaricomycetes – houby stopkovýtrusé, řádu Agaricales – pečárkotvaré a čeledi Strophariaceae – límcovkovité. Zástupci tohoto rodu rostou většinou saprotrofně, ale některé druhy mohou parazitovat na listnatých i jehličnatých stromech (ANTONÍN, 2006).



Obrázek 25: *Pholiota squarrosa*^{35,36}.

Pholiota squarrosa (Weigel) P. Kumm., česky šupinovka kostrbatá (Obrázek 25), roste hojně v období srpna až prosince na pařezech a padlých stromech listnatých i jehličnatých stromů. Klobouk je polokulovitý až široce kuželovitý s výraznými hnědými šupinkami, třeň válcovitý, nahoře nažloutlý, na spodu až hnědý. Požitelnost této houby je značně rozporuplná. Většina odborné literatury uvádí, že je jedlou houbou, ale její chuť není příliš lákavá. Konzumace šupinovky kostrbaté je někdy spojována se vznikem

³⁵ http://www.nahuby.sk/obrazok_detail.php?obrazok_id=352533; staženo 21. 10. 2013

³⁶ http://www.nahuby.sk/obrazok_detail.php?obrazok_id=45143; staženo 21. 10. 2013

gastrointestinálních potíží. Charakteristická je pro svou česnekovou, cibulovou nebo ředkvovou vůni (MCKNIGHT & MCKNIGHT, 1998; HARDING & OUTEN, 2003; ROODY, 2003; ANTONÍN, 2006).

2.7.9 Rod *Phyllotopsis* J.-E. Gilbert & Donk ex Singer (hlíva)

Rod *Phyllotopsis* J.-E. Gilbert & Donk ex Singer, česky hlíva, se taxonomicky řadí do třídy Agaricomycetes- houby stopkovýtrusé, řádu Agaricales – pečárkotvaré a čeledi Tricholomataceae – čirůvkovité (SERVER BIOLIB.CZ).



Obrázek 26: *Phyllotopsis nidulans*³⁷⁻³⁹.

Phyllotopsis nidulans (Pers.) Singer, česky hlíva hnízdovitá (Obrázek 26), roste nepříliš hojně na tlejícím dřevě listnatých i jehličnatých stromů v období května až října. V České republice roste převážně ve vyšších a chladnějších polohách (Český les, oblast Šumavy až Českomoravské vrchoviny, Jeseníků a moravských Karpat). BESSETTE (1997) ve své publikaci přirovnává aroma této houby k tlejícímu zelí. Odborná literatura se v popisu poživatelnosti značně liší. Kvůli svému vzácnému výskytu byla zařazena do Červeného seznamu hub České republiky (BESSETTE, 1997; ANTONÍN, 2006; HOLEC *et al.*, 2006).

³⁷ http://www.nahuby.sk/obrazok_detail.php?obrazok_id=57640; staženo 2. 11. 2013

³⁸ http://www.nahuby.sk/obrazok_detail.php?obrazok_id=141721; staženo 2. 11. 2013

³⁹ <http://www.atlashub.net/index.php?page=atlas-hub#!hliva-hnizdovita>; staženo 2. 11. 2013

2.7.10 Rod *Pluteus* Fr. (štítočka)

Rod *Pluteus* Fr. se taxonomicky řadí do třídy Agaricomycetes – houby stopkovýtrusé, řádu Agaricales – pečárkotvaré a čeledi Pluteaceae – štítovkovité (ANTONÍN, 2006).

Pluteus cervinus (Schaeff.) P. Kumm., česky štítovka jelení (Obrázek 27a), je dřevokazná houba s mírným řekvovým pachem dužniny. Řadí se mezi jedlé houby, ale z důvodu nahořklé chuti se většinou nekonzumuje. Roste poměrně hojně od května do listopadu (HARDING, 2012).



a)



b)

Obrázek 27: *Pluteus* a) *cervinus*⁴⁰, b) *umbrosus*⁴¹.

Slabé česnekové aroma dužniny je charakteristické pro jedlou houbu *Pluteus umbrosus* (Pers.: Fr.) P. Kumm., česky štítovku stinnou (Obrázek 27b). Roste zejména na rozkládajícím se dřevě listnatých stromů v období srpna až října. V České republice se vyskytuje například v Českém lese, na Šumavě nebo v jižních Čechách (zejména Českobudějovicko, Novohradské hory a Jindřichohradecko). Z důvodu velmi vzácného výskytu byla tato houba zařazena do Červeného seznamu hub České republiky (REA, 1968; HOLEC *et al.*, 2006; HARDING & OUTEN, 2003).

⁴⁰ http://www.nahuby.sk/obrazok_detail.php?obrazok_id=180171; staženo 9. 11. 2013

⁴¹ http://www.nahuby.sk/obrazok_detail.php?obrazok_id=135005; staženo 9. 11. 2013

2.7.11 Rod *Psilocybe* (Fr.) P. Kumm. (lysohlávka)

Rod *Psilocybe* (Fr.) P. Kumm. se taxonomicky řadí do oddělení Basidiomycota – houby stopkovýtrusé, třídy Agaricomycetes – stopkovýtrusé, řádu Agaricales – pečárkotvaré a čeledi Strophariaceae – límcovkovité (ANTONÍN, 2006).

Lysohlávka tajemná (Obrázek 28a) je českým ekvivalentem pro jedovatou houbu *Psilocybe arcana* Hlaváček & Borovička. Poměrně běžně roste v období od září do listopadu na území České republiky (60 potvrzených lokalit), především v listnatých, ale také v jehličnatých lesích. Chuť a aroma této houby lze popsat jako ředkvové (ANTONÍN, 2006; BOROVIČKA, 2008).

Lysohlávka česká (Obrázek 28b), latinský název *Psilocybe bohemica* Šebek ex Šebek, je jedlá halucinogenní houba, která byla kvůli necitlivým lesnickým zásahům a intenzivnímu sběru zařazena do Červeného seznamu hub České republiky. Roste nejčastěji pozdě na podzim v několika lokalitách (Krkonoše a Podkrkonoší, Posázaví a Olomoucko). Podobně jako *Psilocybe arcana* disponuje ředkvovým aroma, které je však mírně nasládlé (HOLEC *et al.*, 2006; BOROVIČKA, 2008).



a)



b)

Obrázek 28: *Psilocybe* a) *arcana*⁴², b) *bohemica*⁴³.

Dalšími zástupci rodu *Psilocybe* (Fr.) P. Kumm., které jsou charakteristické svým ředkvovým aroma, jsou například:

- ✓ *Psilocybe atrobrunnea* (Lasch) Gillet, česky lysohlávka rašelinná,

⁴² <http://borovicka.blog.idnes.cz/c/303633/V-lesich-ciha-smrt.html>; staženo 9. 11. 2013

⁴³ http://www.nahuby.sk/obrazok_detail.php?obrazok_id=134263; staženo 9. 11. 2013

- ✓ *Psilocybe zapotecoantillarum* Guzmán, T. J. Baroni & Lodge,
- ✓ *Psilocybe zapotecocaribaea* Guzmán, Ram.-Guill. & T.J. Baroni a další (REA, 1968; GUZMÁN *et al.*, 2003).

2.7.12 Rod *Thelephora* Ehrh. ex Willd. (plesňák)

Rod *Thelephora* Ehrh. ex. Willd. se taxonomicky řadí do třídy Agaricomycetes – houby stopkovýtrusé, řádu Thelephorales – plesňákovité a čeledi Thelephoraceae – plesňákovité (ANTONÍN, 2006).



Obrázek 29: *Thelephora palmata*^{44,45}.

Thelephora palmata (Scop.) Fr., česky plesňák zápašný (Obrázek 29), roste v období července až listopadu běžně na zemi pod jehličnany. Hojně rozvětvené, kuřátkovité plodnice jsou typické svým purpurově hnědým až černohnědým zbarvením. Charakteristickým znakem tohoto druhu nejedlé houby je odporně páchnoucí dužnina po hniјícím zelí (ANTONÍN, 2006; DAVIS *et al.*, 2012).

⁴⁴ http://www.nahuby.sk/obrazok_detail.php?obrazok_id=287605; staženo 4. 10. 2013

⁴⁵ http://www.nahuby.sk/obrazok_detail.php?obrazok_id=137148; staženo 4. 10. 2013

2.7.13 Rod *Volvariella* Speg. (kukmák)

Rod *Volvariella* taxonomicky náleží do třídy Agaricomycetes – houby stopkovýtrusé, řádu Agaricales – pečárkotvaré a čeledi Pluteaceae – štítovkovité (SERVER BIOLIB.CZ).



a)

b)

Obrázek 30: a) *Volvariella bombinata*⁴⁶; b) *Volvariella gloiocephala*⁴⁷.

Volvariella bombinata, česky kukmák bělovlnný (Obrázek 30a), je dřevokazná houba nepříliš hojně rostoucí v období od června do listopadu. Její výskyt byl zaznamenán v Evropě, Africe, Asii, Severní a Jižní Americe i Austrálii. V Evropě je však považována za ohrožený druh. V Polsku a dalších zemí je zařazena v Červeném seznamu ohrožených druhů. Oproti tomu v Asii a Africe se kukmák bělovlnný běžně konzumuje. Je považován za houbu s léčivými účinky a hojně se tak využívá v tradiční medicíně. Aroma této houby lze popsat jako typicky houbové či ředkvové (SZEZEPKOWSKI *et al.*, 2013).

Volvariella gloiocephala (DC.) Boekhout & Enderle, česky kukmák okázalý (Obrázek 30b), je jedlá rostoucí v období července až listopadu po celé České republice. Aroma a chuť této houby lze popsat jako mírně ředkvové (ANTONÍN, 2006; BESSETTE, 2007).

⁴⁶ http://www.nahuby.sk/obrazok_detail.php?obrazok_id=113418; staženo 9. 11. 2013

⁴⁷ http://www.nahuby.sk/obrazok_detail.php?obrazok_id=425488; staženo 9. 11. 2013

2.7.14 Podzemní plodnice s česnekovým nebo cibulovým aroma

Publikace TRAPPE *et al.* (2009) se zabývala ekologií lanýžů v oblasti Pacific Northwest. U následujících rodů byly popsány senzorické vlastnosti, které lze charakterizovat jako česnekové.



a)



b)

Obrázek 31: a) *Balsamia platyspora*⁴⁸; b) *Choiromyces meandriiformis*⁴⁹.

Rod *Balsamia* Vittad., česky balzamovka (Obrázek 31a) je velmi vzácným rodem. Plodnice tohoto rodu jsou nepravidelně kulovité, červenohnědé, na řezu s bílou dužninou. Jeho zástupci rostou pod zemí v listnatých i jehličnatých lesích. Aroma některých zástupců rodu *Balsamia* lze popsat jako nevýrazně štiplavé nebo česnekové.

Bělolanýž (Obrázek 31b) je českým synonymem pro rod *Choiromyces* Vittad., který se vyznačuje bílými až světle okrovými plodnicemi. Název vznikl z řeckého slova *choer-* (prase) a *-myces* (houba). Aroma bělolanýžů je česnekové nebo štiplavé. Výskyt byl zaznamenán v Evropě a Severní Americe.

Podle publikace TRAPPE *et al.* (2009) lze do skupiny plodnic s česnekovým aroma zařadit také rody:

- ✓ *Elaphomyces* Nees (jelenka),
- ✓ *Endogone* Link (shodný český název),
- ✓ *Genabea* Tul. & C. Tul.,

⁴⁸ http://www.nahuby.sk/obrazok_detail.php?obrazok_id=116122 k 17. 10. 2013

⁴⁹ http://www.nahuby.sk/obrazok_detail.php?obrazok_id=213851 k 17. 10. 2013

- ✓ *Genea* Vittad. (zemnička),
- ✓ *Geopora* Harkn (hrobenka),
- ✓ *Hydnotrya* Berk. & Broome (oříškovec, Obrázek 32a)
- ✓ *Leucangium* Quél.,
- ✓ *Melanogaster* Corda (černoušek, Obrázek 32b),
- ✓ a rod *Tuber* P. Micheli ex F. H. Wigg. (lanýž, viz kapitola 2.4).



a)



b)

Obrázek 32: a) *Hydnotrya suevica*⁵⁰; b) *Melanogaster variegatus*⁵¹.

Cibulové aroma dužniny je typické pro následující zástupce:

- ✓ *Gautieria graveolens* Vittad., česky smržovec zápašný,
- ✓ *Hymenogaster lycoperdineus* Vittad., český název dle ISOP - hlíza pýchavkovitá, a další (ZELLER & DODGE, 1918; COKER & COUCH, 1928; DODGE & ZELLER, 1934; REA, 1968).

⁵⁰ http://www.nahuby.sk/obrazok_detail.php?obrazok_id=286417; staženo 17. 10. 2013

⁵¹ http://www.nahuby.sk/obrazok_detail.php?obrazok_id=136857&poradie=3&form_hash=d8c458311649c070750f1fa9779dc886; staženo 17. 10. 2013

3 Materiál a metody

3.1 Materiál

3.1.1 Chemikálie

Iontově výměnná chromatografie: methanol (100%) - T. J. BAKER (Dublin, Irsko); chlorovodíková kyselina (35%), amoniak (25%), aceton (min. 99,5%) a *n*-butanol - PENTA (Chrudim, ČR); ninhydrin a isopropylalkohol - LACHEMA (Brno, ČR); octová kyselina (99,8%) - LACH-NER (Neratovice, ČR); ethanol (denaturovaný) - LIHO (Blanice, ČR). Použité ionexy: katex Amberlite IR-120 (zrnění 16-50 mesh, aktivace 10% chlorovodíkovou kyselinou) - FLUKA (Buchs, Švýcarsko); anex DEAE Sephadex A-25 Cl⁻ (40-125 μm, aktivace 5% octovou kyselinou) - SIGMA-ALDRICH (Steinheim, Německo).

Izolace senzoričky aktivních sloučenin: dichlormethan (99,5%), bezvodý síran hořečnatý (99%) a hydroxid sodný (98%) - LACH-NER (Neratovice, ČR); diethylether (99,7%) - PENTA (Chrudim, ČR).

HPLC/PDA analýzy: acetonitril (pro HPLC) - T. J. BAKER (Dublin, Irsko); dihydrogenfosforečnan draselný - LACHEMA (Neratovice, ČR).

3.1.2 Analyzované vzorky hub

Plodnice plesňáku zápašného (*Thelephora palmata*) byly nalezeny v říjnu 2012 panem Jiřím Laštůvkou na několika lokalitách v okolí Hlinska. Před vlastní analýzou byly uchovávány při teplotě -28 °C.

Plodnice špičky provrtané (*Marasmius perforans*) a špičky cibulové (*Marasmius alliaceus*) byly sbírány panem Romanem Kubcem na různých lokalitách Třeboňska a Jindřichohradecka v průběhu let 2010–2012. Před uskladněním (-28 °C) byly plodnice opatrně usušeny při pokojové teplotě.

Čerstvé plodnice shiitake (*Lentinula edodes*) byly získány od firmy České houby a.s., Soběslav (www.ceskehouby.cz).

3.1.3 Přístroje a zařízení

Chromatografický systém pro HPLC/MS Agilent 1100 Series LC/MSD Trap

- analytická kolona Zorbax Eclipse XDB-C8, 30 × 150 mm (3,5 μm)

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 C8, 250 × 4,6 mm (5 μm)
Varian Microsorb-MV 100-5 Amino, 250 × 4,6 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

NMR spektrometr

- Varian INOVA (500 MHz)
- rozpouštědlo D₂O

3.2 Metody

3.2.1 Izolace γ -glutamyl-marasminu

3.2.1.1 Extrakce aminokyselin

Izolace γ -glutamyl-marasminu (**21**) byla prováděna dle postupu publikovaného GMELINEM *et al.*, 1976 s nepatrnými modifikacemi. Sušené plodnice *Marasmius perforans* o hmotnosti 30,15 g byly s přidavkem 400 ml vroucí vody homogenizovány mixérem. Po 15-ti minutovém varu pod zpětným chladičem ve varné baňce (1000 ml) byl vzorek za sníženého tlaku zfiltrován a filtrát o celkovém objemu 300 ml smíchán se 300 ml methanolu.

Vzniklou sraženinu bylo nutno zfiltrovat. Po odpaření methanolu na rotační vakuové odparce (dále jen RVO) za teploty 37 °C byl roztok zahuštěn na celkový objem 200 ml a uchován v mrazicím boxu při teplotě -28 °C.

3.2.1.2 Iontově výměnná chromatografie

K izolaci γ -glutamyl-marasminu (**21**) byla využita sloupcová ionexová chromatografie.

První přečištění bylo provedeno s využitím 200 ml katexu Amberlite IR-120 (H-form, 16–45 mesh). Katex byl aktivován 5% chlorovodíkovou kyselinou o objemu 2 l. Po 30 minutách byl katex zfiltrován a opakovaně promýván destilovanou vodou. Aktivovaným katexem byla následně naplněna kolona o rozměrech 5,5 × 12 cm.

Extrakt aminokyselin o původním objemu 200 ml byl naředěn 800 ml destilované vody a po upravení pH pomocí koncentrované chlorovodíkové kyseliny na hodnotu 3,54 nanesen na kolonu. Po promytí destilovanou vodou o objemu 500 ml byly aminokyseliny eluovány 2% roztokem amoniaku. Frakce, poskytující pozitivní reakci s ninhydrinem (0,2% v acetonu), byly jímány po 200 ml a analyzovány metodou TLC. U těchto frakcí byl na RVO při 37 °C odpařen amoniak a následně provedena HPLC/PDA analýza.

Druhé přečištění bylo provedeno anexem DEAE Sephadex A-25 (Cl⁻) o objemu 80 ml. Anex (20 g) byl aktivován pomocí 5% roztoku octové kyseliny, ve kterém byl uložen 24 hodin. Po naplnění kolony o rozměrech 2,5 × 20 cm byl anex promýván 0,1M roztokem octanu amonného (pH 6,28) do doby, kdy pH roztoku vycházející z kolony bylo přibližně 6,2.

Na kolonu byly nanесeny frakce z předchozího přečištění o celkovém objemu 70 ml, které poskytovaly pozitivní reakci s ninhydrinem a u kterých byla HPLC/PDA analýzou potvrzena přítomnost izolované sloučeniny. Celkový objem frakcí byl doplněn 30 ml 0,1M roztoku octové kyseliny. Hodnota pH vzorku byla upravena 29% roztokem amoniaku na 6,9. Po promytí 200 ml destilované vody byly jednotlivé aminokyseliny eluovány octovou kyselinou v rozsahu koncentrací 1 – 10% o jednotlivých objemech 200 ml a jímány po 70 ml.

Frakce poskytující pozitivní reakci s ninhydrinem (0,2% v acetonu) byly analyzovány pomocí TLC. Metodou HPLC/PDA byly analyzovány frakce s odpovídajícím retenčním faktorem izolované sloučeniny a po porovnání spekter byly tyto frakce smíchány (koncentrace octové kyseliny 5%, pH 2,05). Po odpaření octové kyseliny byl k roztoku přidáván ethanol do tvorby bílého zákalu. Během uchování směsi v chladu byla pozorována tvorba mírně nahnědlých krystalků γ -glutamyl-marasminu (**21**).

Jednotlivé fáze izolace γ -glutamyl-marasminu (**21**) byly monitorovány pomocí HPLC/PDA s využitím gradientové eluce. K tomuto účelu byla použita analytická NH₂ kolona s nástřikovým objemem vzorku 20 μ l a průtokem 0,9 ml/min. Složení mobilní fáze v průběhu analýzy, kterou tvořila směs pufru dihydrogenfosforečnanu draselného a acetonitrilu, uvádí Tabulka I.

Tabulka I: Gradient mobilní fáze HPLC/PDA analýzy.

Mobilní fáze* [%]	Čas [min]			
	0:00	7:00	17:00	25:00
A	95	90	10	95
B	5	10	90	5

*A – KH₂PO₄ (25mM, pH=3,18); B – acetonitril

Frakce mezi jednotlivými fázemi izolace γ -glutamyl-marasminu (**21**) byly analyzovány pomocí TLC (silikagel, *n*-butanol/CH₃COOH/H₂O/propan-2-ol, 8/2/5/3, v/v/v/v) s využitím znalosti hodnoty retardačního faktoru izolované sloučeniny (*R*_f 0,125), který byl stanoven ve studii GMELIN *et al.* (1976).

Získaný produkt γ -glutamyl-marasmin (**21**) byl následně analyzován pomocí ESI-MS. Podmínky analýzy uvádí Tabulka II. Gradient mobilní fáze, kterou tvořila směs okyselené vody a acetonitrilu, zaznamenává Tabulka III.

Tabulka II: Podmínky ESI-MS analýzy γ -glutamyl-marasminu (21).

	Separace na koloně	Přímý nástřik
průtok	0,6 ml/min	0,6 ml/min
nástřik vzorku	20 μ l	20 μ l
ionizace	ESI (pozitivní a negativní)	ESI (pozitivní a negativní)
zmlžovač	50 psi	30 psi
teplota sušícího plynu	350 °C	325 °C
sušící plyn	10 l/min	7 l/min
napětí na kapiláře	3,5 kV	3,5 kV

Tabulka III: Gradient mobilní fáze ESI-MS analýzy γ -glutamyl-marasminu (21).

Mobilní fáze* [%]	Čas [min]				
	0:00	2:00	15:00	18:00	20:00
A	95	95	20	20	95
B	5	5	80	80	5

*A – voda + 0,1 % HCOOH; B – acetonitril + 0,1 % HCOOH

3.2.2 Extrakce těkavých látek z *Marasmius alliaceus*

Vzorek sušených plodnic *Marasmius alliaceus* o hmotnosti 8,5 g byl macerován ve 200 ml destilované vody po dobu 60 minut a následně homogenizován mixérem. Hodnota pH (6,02) homogenátu byla přidavkem 0,1M roztoku hydroxidu sodného upravena na hodnotu 8,22. Homogenát byl za těchto podmínek ponechán 3 hodiny při laboratorní teplotě za občasného promíchání. Po této době hodnota pH klesla na 7,65.

Pro stanovení vlivu vysoké teploty během varu na obsah rozkladných produktů byla část vzorku před varem odebrána. Přefiltrováním této části vzorku bylo získáno 15 ml filtrátu, který byl následně extrahován dvakrát dichlormethanem v poměru 1:1 (v/v), přesušen bezvodým síranem hořečnatým a odpařen na RVO při teplotě 37 °C. Výsledný

dichlormethanový extrakt (dále jen DCM extrakt) se vyznačoval výrazným česnekovým aroma.

Zbytek vzorku byl převeden do varné baňky (500 ml) a pod zpětným chladičem přiveden k varu. Po 20 minutách varu byla směs ponechána v aparatuře do úplného vychladnutí. Filtrací za sníženého tlaku bylo získáno 300 ml roztoku o pH 7,44. Následná extrakce byla provedena ve dvojím opakování dichlormethanem v poměru 1:1 (v/v). Po přesušení bezvodým síranem hořečnatým a odpaření dichlormethanu na RVO při teplotě 37 °C byl získán žlutý dichlormethanový extrakt (dále jen DCM extrakt) s výrazným česnekovým aroma, který byl před další analýzou uchován při teplotě -28 °C.

Extrakty těkavých látek (vzorek před a po varu) byly analyzovány metodou HPLC/PDA s analytickou kolonou C8, nástřikovým objemem 20 μ l a průtokem 0,9 ml/min. Gradient mobilní fáze, kterou tvořila směs acetonitrilu a vody, udává Tabulka IV.

Tabulka IV: Gradient mobilní fáze HPLC/PDA analýzy těkavých látek z *Marasmius alliaceus*.

Mobilní fáze* [%]	Čas [min]						
	0:00	15:00	20:00	30:00	35:00	37:00	40:00
A	80	60	45	30	20	20	80
B	20	40	55	70	80	80	20

*A – voda; B – acetonitril

Těkavé sirmé sloučeniny extraktu *Marasmius alliaceus* byly analyzovány metodou GC/MS. K tomuto účelu byl použit plynový chromatograf Varian 3800. Podmínky analýzy uvádí Tabulka V.

Tabulka V: Podmínky GC/MS analýzy těkavých látek z *Marasmius alliaceus*, *Thelephora palmata* a *Lentinula edodes*.

nosný plyn	He
průtok	1,3 ml/min
nástřík vzorku	1 μ l
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

3.2.3 Extrakce těkavých látek z *Thelephora palmata*

Pro stanovení těkavých sloučenin v *Thelephora palmata* bylo pomocí mixéru zhomogenizováno 18,1 g čerstvých plodnic se 160 ml destilované vody. Po 30 minutách macerování byl vzorek po dobu 20 minut vařen pod zpětným chladičem. Po následné filtraci za sníženého tlaku bylo získáno celkem 300 ml směsi o pH 6,10. Tato směs byla extrahována dvakrát diethyletherem v poměru 1:1 (v/v). Celkem bylo použito 700 ml diethyletheru. Získaný extrakt byl přesušen bezvodým síranem hořečnatým a následně zakonzentrován na RVO při 25 °C. Před dalšími analýzami byl výsledný extrakt uchován při -28 °C. Celkově bylo získáno 115 mg extraktu (dále jen DEE extrakt).

Těkavé sirné sloučeniny v *Thelephora palmata* byly analyzovány metodou GC/MS. Podmínky analýzy uvádí Tabulka V.

3.2.4 Extrakce senzoričky aktivních sloučenin z *Lentinula edodes*⁵²

K homogenizaci pomocí mixéru bylo použito 506 g čerstvých plodnic s 1200 ml destilované vody. Následovala macerace po dobu 30 minut, po které byla hodnota pH (6,25) upravena 0,1M roztokem hydroxidu sodného na 9,0 (optimální pH pro aktivitu γ -glutamyltranspeptidasy). Po 24 hodinách macerování kleslo pH na 7,36. Směs byla zfiltrována přes tkaninu a získaný filtrát (1800 ml) extrahován dvakrát dichlormethanem v poměru 1:0,75 (v/v). Po přesušení bezvodým síranem hořečnatým a následné filtraci za sníženého tlaku byl dichlormethanový extrakt (dále jen DCM extrakt) na RVO při teplotě 25 °C zakoncentrován a před další analýzou uchován při teplotě -28 °C.

Extrakt byl analyzován metodou HPLC/PDA s analytickou kolonou C8, nástřikovým objemem vzorku 20 μ l a průtokem 0,9 ml/min. Složení mobilní fáze v průběhu analýzy udává Tabulka VI.

Tabulka VI: Gradient mobilní fáze HPLC/PDA analýzy DCM extraktu *Lentinula edodes*.

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

*A – voda, B – acetonitril.

Extrakt senzoričky aktivních sloučenin *Lentinula edodes* byl z důvodu identifikace těkavých sloučenin analyzován metodou GC/MS. Tabulka V udává podmínky GC/MS analýza, které byly shodné jako v případě identifikace těkavých látek v *Marasmius alliaceus* a *Thelephora palmata*.

⁵² Experimentální část byla provedena v rámci vlastní bakalářské práce (Senzoričky aktivní sloučeniny houževnatce jedlého, PřF JU, 2013). Pro možnost porovnání získaných výsledků byla tato část zařazena do diplomové práce.

4 Výsledky

4.1 Izolace γ -glutamyl-marasminu z *Marasmius perforans*

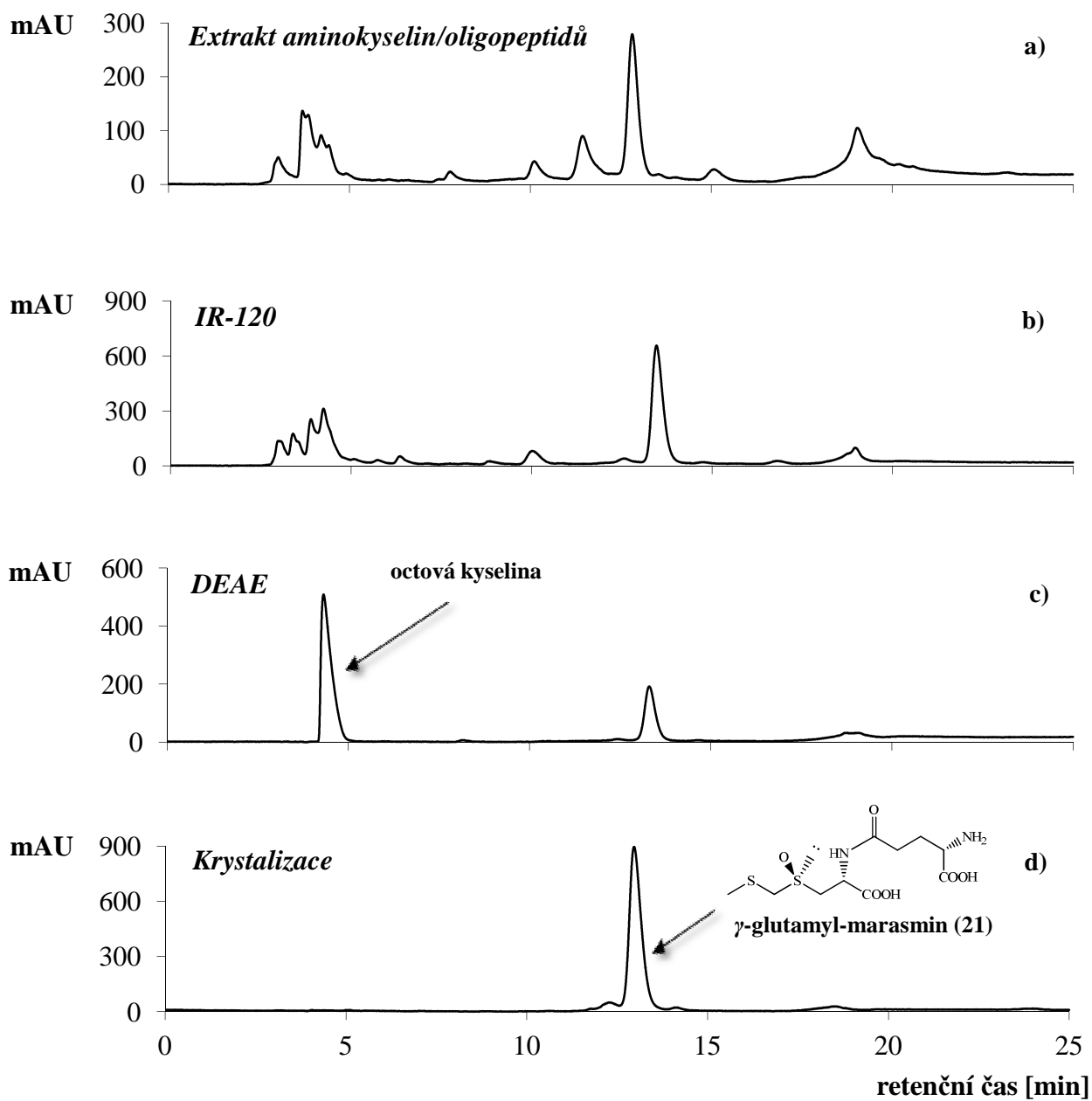
4.1.1 HPLC/PDA analýza

Cílem této části výzkumu byla izolace prekurzoru sensoricky aktivních sirných sloučenin hub rodu *Marasmius*, a sice dipeptidu γ -glutamyl-marasminu (**21**). Obrázek 33 shrnuje postupný proces izolace a přečištění γ -glutamyl-marasminu (**21**) ze sušených plodnic *M. perforans* pomocí iontově výměnné chromatografie po závěrečnou krystalizaci. Účinnost jednotlivých kroků izolace byla sledována metodou HPLC/PDA s využitím gradientové eluce (gradient mobilní fáze viz Tabulka I).

Na Obrázku 33a je uveden HPLC chromatogram výchozího extraktu aminokyselin/oligopeptidů přítomných v sušených plodnicích *Marasmius perforans*. Majoritní sloučenina s retenčním časem 12,8 min byla následně separována na latexové a anexové koloně. HPLC chromatogram po první separaci na katexové koloně Amberlite IR-120 (H-form, 16-45 mesh) je uveden na Obrázku 33b. Druhá separace byla provedena pomocí anexové kolony DEAE Sephadex A-25. Výsledek tohoto kroku dokládá chromatogram na Obrázku 33c. Sloučenina s retenčním časem 4,3 min byla identifikována jako octová kyselina, která v tomto kroku sloužila jako eluční činidlo.

Krystalizací frakcí, které dle HPLC analýzy obsahovaly γ -glutamyl-marasmin (**21**) (opouštěly anexovou kolonu při hodnotě pH 2,05), byly získány mírně nahnědlé krystalky γ -glutamyl-marasminu (**21**). HPLC/PDA analýzou této sloučeniny byl získán chromatogram uvedený na Obrázku 33d.

Identita získaného produktu byla následně potvrzena pomocí ESI-MS a NMR spektroskopie.

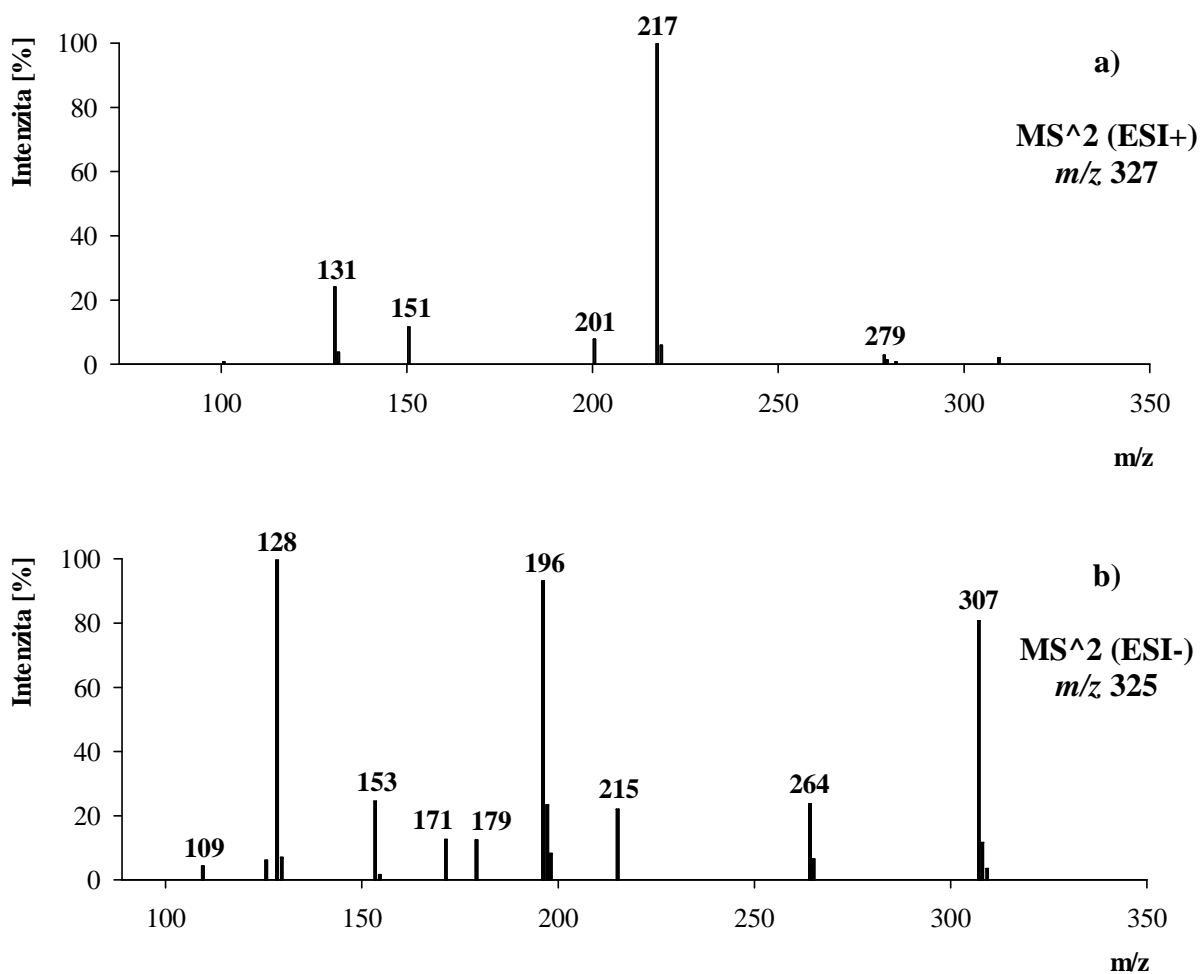


Obrázek 33: HPLC/PDA chromatogramy ($\lambda=210$ nm) procesu izolace γ -glutamyl-marasminu (**21**) z *Marasmius perforans*: a) extrakt aminokyselin/oligopeptidů; b) IR-120; c) DEAE; d) izolovaný γ -glutamyl-marasmin (**21**).

4.1.2 ESI-MS analýza

Identita izolovaného γ -glutamyl-marasminu (**21**) byla potvrzena pomocí ESI-MS. ESI-MS/MS data byla získána Ing. Petrou Kučerovou, Ph.D. z Mikrobiologického ústavu AV ČR, v. v. i., Sektor fototrofních mikroorganismů v Třeboni.

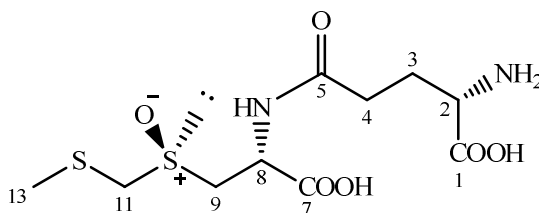
ESI-MS/MS data (v pozitivním i negativním módu ionizace) potvrdila očekávanou relativní molekulovou hmotnost $M_r = 326$ Da (Obrázek 34).



Obrázek 34: ESI-MS/MS data γ -glutamyl-marasminu (**21**) a) pozitivní; b) negativní mód ionizace.

4.1.3 NMR spektroskopie

γ -Glutamyl-marasmin (**21**) byl také analyzován pomocí NMR spektroskopie.¹³C NMR spektra byla změřena Prof. RNDr. Janem Šramlem, DrSc. (Ústav chemických procesů, AV ČR). I NMR data (měřeno v D₂O) byla v souladu s předpokládanou strukturou a ve velmi dobré shodě s údaji publikovanými GMELINEM *et al.* (1976) (Tabulka VII).



Obrázek 35: Označení uhlíků ve struktuře γ -glutamyl-marasminu (**21**).

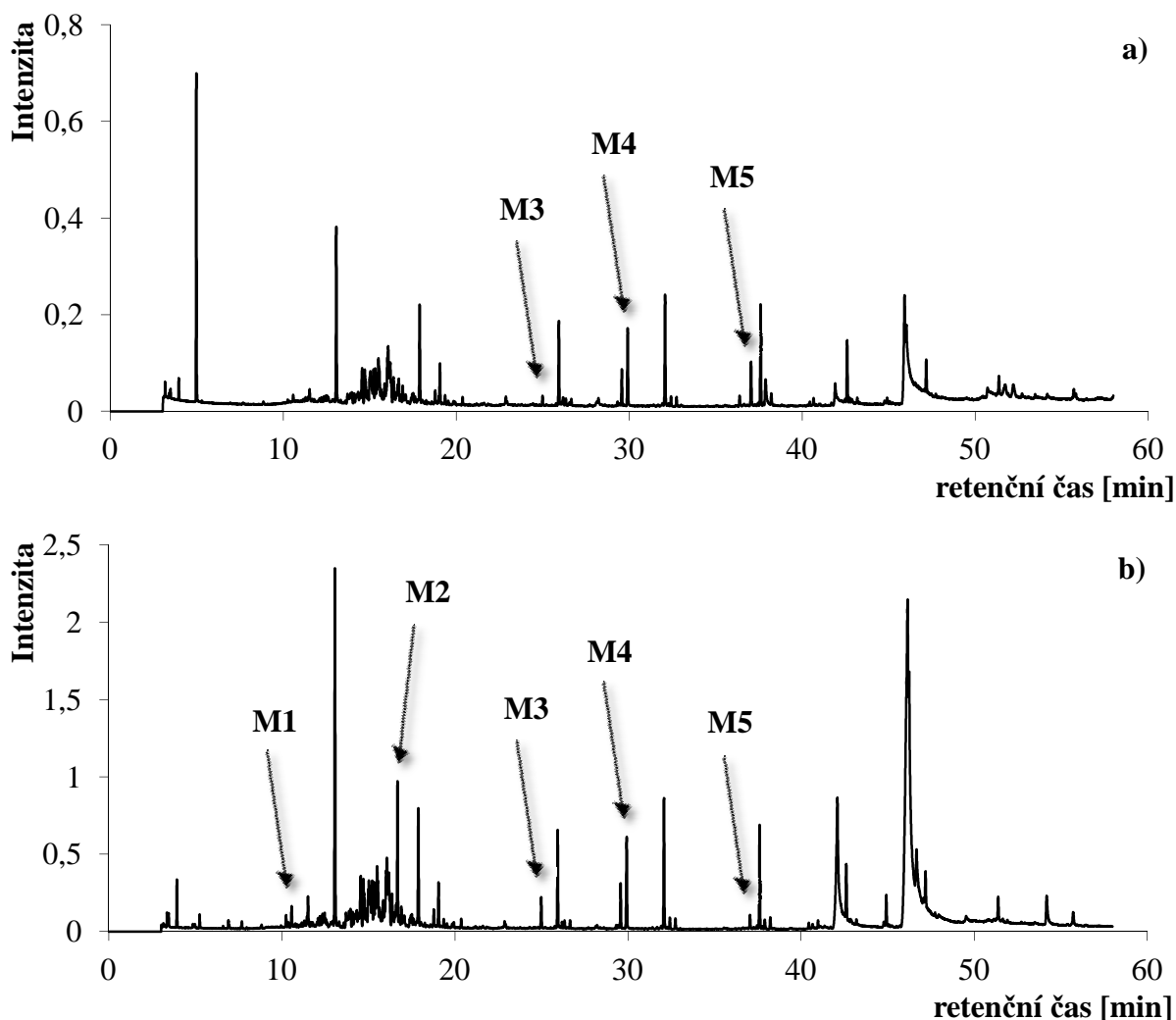
Tabulka VII: ¹³C NMR data γ -glutamyl-marasminu (**21**) (měřeno v D₂O).

	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-7	C-8	C-9	C-11	C-13
Tato práce	173,2	53,4	26,2	31,5	174,2	173,4	49,0	52,5	54,9	15,9
GMELIN <i>et al.</i>	172,9	53,5	25,9	31,3	174,4	173,5	48,6	52,4	54,6	16,1

4.2 Extrakce a identifikace těkavých látek z *Marasmius alliaceus*

4.2.1 GC/MS analýza

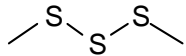
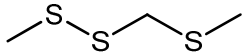
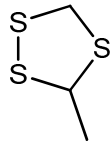
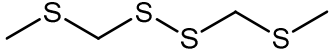
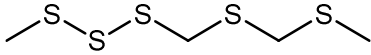
Pro možnost porovnání vlivu vysoké teploty na obsah těkavých sirných sloučenin byly připraveny dva vzorky DCM extraktu *Marasmius alliaceus*. Obrázek 36a představuje GC/MS chromatogram DCM extraktu *Marasmius alliaceus*, který nebyl před extrakcí podroben varu pod zpětným chladičem. GC/MS chromatogram extraktu, který byl před extrakcí vařen po dobu 20 minut pod zpětným chladičem, uvádí Obrázek 36b.



Obrázek 36: GC/MS chromatogram DCM extraktu *Marasmius alliaceus* a) před varem;
b) po varu.

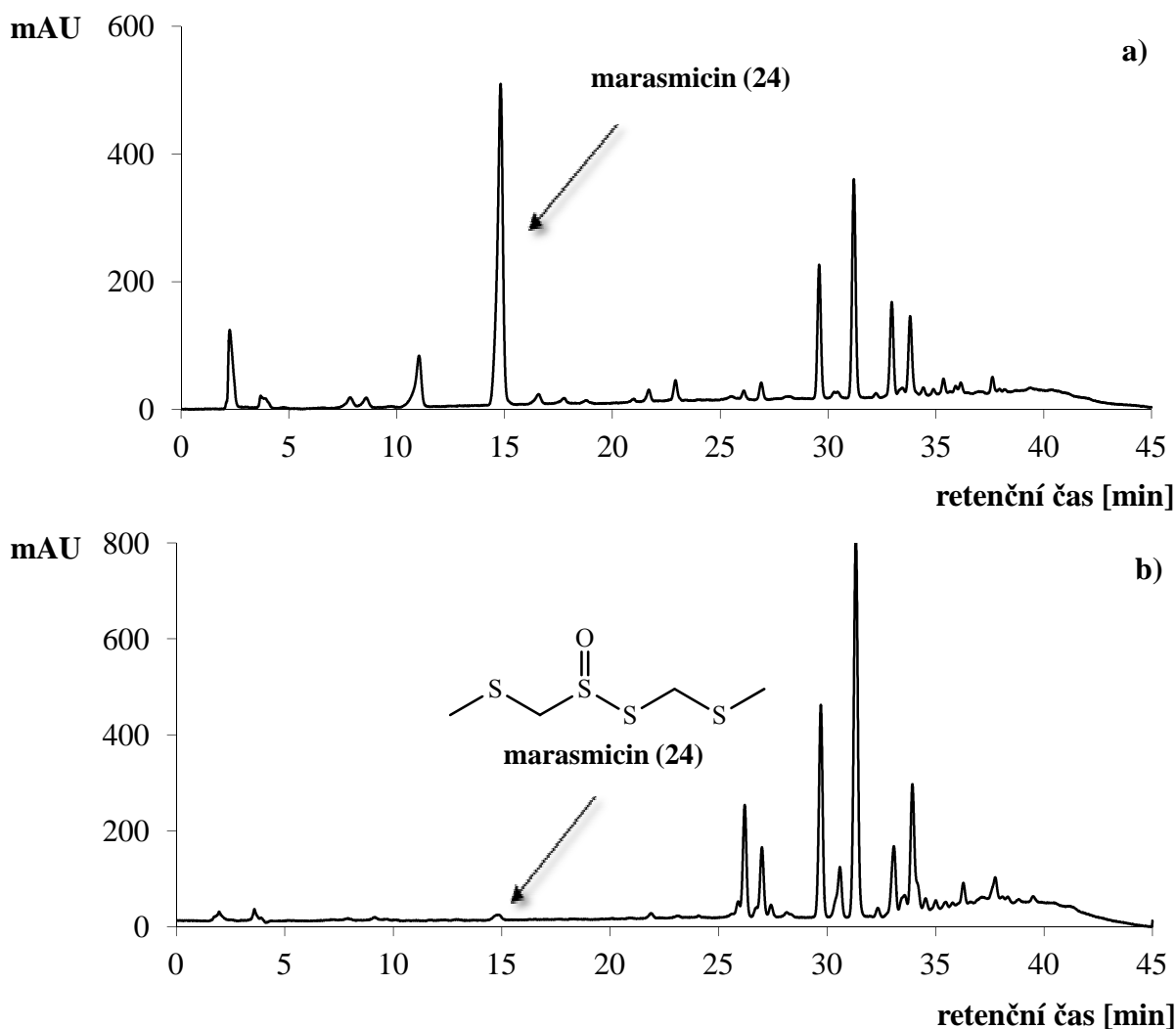
Pravděpodobné struktury těkavých sirných sloučenin byly identifikovány na základě interpretace získaných hmotnostních dat a též porovnáním MS dat publikovaných ve studii RAPIOR *et al* (1997). Identifikované sloučeniny DCM extraktu a jejich pravděpodobné struktury uvádí Tabulka VIII.

Tabulka VIII: Identifikace těkavých sloučenin DCM extraktu *Marasmius alliaceus* metodou GC/MS.

Sloučenina	M_r [Da]	Hmotnostní spektrum m/z (%)	Pravděpodobná struktura
M1	126	128 (6; M^{+2}), 126 (48; M^+), 105 (100), 79 (45), 120 (36)	 dimethyltrisulfid (14)
M2	140	142 (0,2; M^{+2}), 140 (1; M^+), 61 (100), 93 (30), 45 (15), 46 (5)	 2,3,5-trithiahexan (30)
M3	138	140 (0,03; M^{+2}), 138 (0,08; M^+), 61 (100), 93 (46), 45 (33), 107 (28)	 methyl-1,2,4-trithiolan (29)
M4	186	188 (0,1; M^{+2}), 186 (2,7; M^+), 61 (100), 45 (17), 93 (14), 46 (7)	 2,4,5,7-tetrathiaoktan (25)
M5	218	61 (100), 139 (39), 45 (28), 93 (27)	 2,3,4,6,8-pentathianonan (31)

4.2.2 HPLC/PDA analýza

Na HPLC/PDA chromatogramu DCM extraktu (Obrázek 37a), který nebyl před extrakcí podroben varu, jasně dominuje sloučenina s retenčním časem 14,8 min. Porovnáním UV spekter s izolovaným standardem byla tato majoritní sloučenina identifikována jako thiosulfínát marasmicin (**24**) (2,4,5,7-tetrathiaoktan-4-oxid).



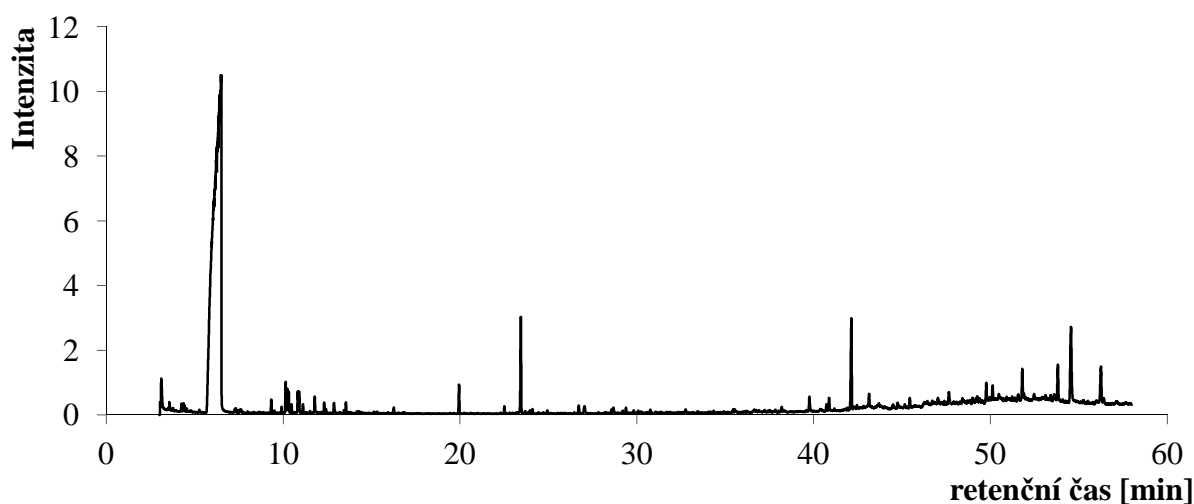
Obrázek 37: HPLC/PDA chromatogram ($\lambda=210$ nm) DCM extraktu *Marasmius alliaceus*
a) před varem; b) po varu.

Na Obrázku 37b je uveden HPLC/PDA chromatogram DCM extraktu z plodnic, které byly po homogenizaci nejdříve 20 minut vařeny pod zpětným chladičem a po úplném vychladnutí extrahovány dichlormethanem. Jak je z chromatogramu patrné, marasmicin (**24**) je zde přítomen pouze v minoritním množství. Dá se tedy předpokládat, že tato sloučenina během varu degradovala na jiné sírné sloučeniny. Identifikace těchto sloučenin byla předmětem GC/MS analýzy, které byly podrobeny oba DCM extrakty. Ostatní sloučeniny přítomné v extraktu podléhaly ionizaci elektrosprejem a následné fragmentaci pouze v minimální míře. Z tohoto důvodu se nepodařilo od těchto sloučenin získat dostatečně kvalitní MS data, ze kterých by bylo možné usuzovat na jejich elementární složení či strukturu.

4.3 Extrakce a identifikace těkavých látek z *Thelephora palmata*

4.3.1 GC/MS analýza

Získaný DEE extrakt *Thelephora palmata* byl podroben GC/MS analýze. Výsledný GC chromatogram je uveden na Obrázku 38. Jak je z tohoto chromatogramu zřejmé, analyzovaný extrakt obsahoval relativně malé množství těkavých sloučenin. Při vyhodnocení GC/MS dat se žádné těkavé sírné sloučeniny mezi těmito látkami detekovat nepodařilo.

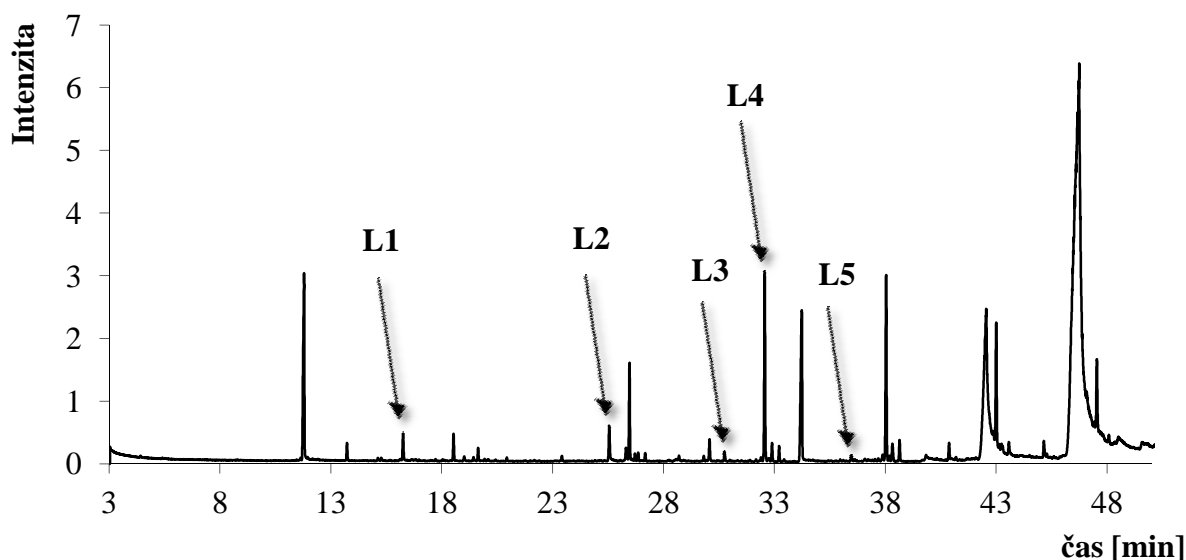


Obrázek 38: GC/MS chromatogram DEE extraktu *Thelephora palmata*.

4.4 Extrakce a identifikace sensoricky aktivních sloučenin z *Lentinula edodes*⁵³

4.4.1 GC/MS analýza

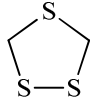
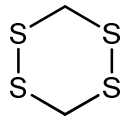
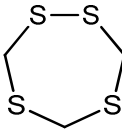
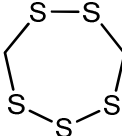
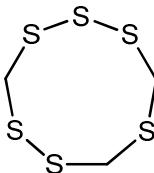
Pro identifikaci nejvýznamnějších těkavých sirných sloučenin vznikajících v homogenizovaných plodnicích *LE* byl DCM extrakt analyzován metodou GC/MS. U označených sloučenin na GC/MS chromatogramu (Obrázek 39) byla pomocí MS dat stanovena molekulová hmotnost a s využitím knihovny spekter i pravděpodobná struktura těchto sloučenin. Pro přehlednost jsou identifikované sloučeniny a jejich struktury zaznamenány v Tabulce IX.



Obrázek 39: GC/MS chromatogram DCM extraktu *Lentinula edodes*.

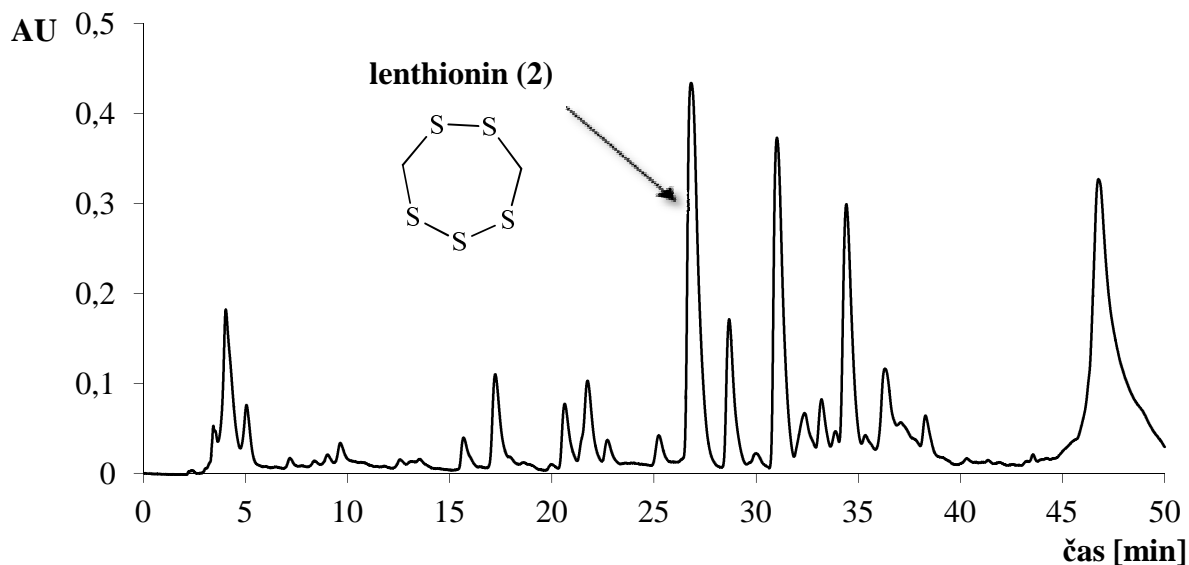
⁵³ Výsledky této kapitoly byly částečně převzaty z vlastní bakalářské práce (Sensoricky aktivní sloučeniny houževnatce jedlého, PŘF JU, 2013).

Tabulka IX: Identifikace těkavých sloučenin DCM extraktu *Lentinula edodes* metodou GC/MS.

Sloučenina	M_r [Da]	Hmotnostní spektrum m/z (%)	Pravděpodobná struktura
L1	124	126 (12, $M^{+}+2$), 124 (100, M^{+}), 78 (78), 59 (19), 45 (48), 46 (17)	 1,2,4-trithiolan (17)
L2	156	158 (19, $M^{+}+2$), 156 (100, M^{+}), 110 (68), 64 (26), 46 (34), 45 (45)	 1,2,4,5-tetrathian (18)
L3	170	172 (7, $M^{+}+2$), 170 (56, M^{+}), 124 (54), 78 (100), 46 (28), 45 (46)	 1,2,4,6-tetrathiepan (10)
L4	188	190 (9, $M^{+}+2$), 188 (37, M^{+}), 142 (100), 124 (92), 78 (61), 45 (31),	 lenthionin (2)
L5	206	208 (9, $M^{+}+2$), 206 (33, M^{+}), 142 (100), 78 (63), 64 (55), 32 (24)	 1,2,3,5,6,8-hexathionan (20)

4.4.2 HPLC/PDA analýza

Homogenizované plodnice *Lentinula edodes* byly extrahovány pomocí dichlormethanu a následně podrobeny HPLC/PDA analýze (Obrázek 40). Majoritní sloučenina s retenčním časem 26,1 minut byla porovnáním UV spekter s izolovaným standardem identifikována jako lenthionin (2).



Obrázek 40: HPLC/PDA chromatogram ($\lambda=210$ nm) DCM extraktu *Lentinula edodes*.

Ostatní sloučeniny přítomné v analyzovaném extraktu podléhaly ionizaci elektrosprejem a následné fragmentaci pouze v minimální míře. Z tohoto důvodu se nepodařilo od těchto sloučenin získat dostatečně kvalitní MS data, ze kterých by bylo možné usuzovat na jejich elementární složení či strukturu.

5 Diskuze

Teoretická část diplomové práce nabízí popis zástupců celé řady rodů hub, které disponují výraznými sensorickými vlastnostmi. Zejména jejich aroma lze přirovnat k česnekovitým či brukvovitým rostlinám, které se staly díky obsahu sirných sloučenin předmětem celé řady studií. U těchto druhů hub tedy existuje předpoklad existence podobných sirných sloučenin či jejich prekurzorů. Jelikož nebyly provedeny vědecké studie, které by se touto problematikou zabývaly, mohly by se tyto druhy hub stát předmětem dalších výzkumů sirných sloučenin. V případě bílých a černých lanýžů (*Tuber magnatum*, *Tuber melanosporum*) byla přítomnost těkavých sirných sloučenin potvrzena řadou studií (FIECCHI *et al.*, 1967; TALOU *et al.*, 1987; PELUSIO *et al.*, 1995; BELLESIA *et al.*, 1996; MAURIELLO *et al.*, 2004). Dosud však není zcela jasné, zdali tyto sloučeniny vznikají z netěkavých prekurzorů nebo jsou již přítomny v neporušených plodnicích. Podobné podněty pro další studie nabízí i houba *Phallus impudicus*, ve které byly také identifikovány těkavé sirné sloučeniny (BORG-KARLSON 1994). Jejich vznik či původ však zatím není zcela objasněn.

Na základě studie GMELIN *et al.* (1976) byla provedena izolace prekurzoru sensoricky aktivních sirných sloučenin rodu *Marasmius*, (S_3R_c)- γ -glutamyl-3-(methylthiomethylsulfinyl)alaninu, triviálně γ -glutamyl-marasminu (**21**). Oproti této studii nebyl k izolaci prekurzoru použit anex Lewatit MP 5080. Přesto byl krystalizací získán produkt o poměrně vysoké čistotě. Obrázek 33d zobrazuje výsledný chromatogram získaný HPLC/PDA analýzou.

V experimentální části byl také zkoumán vliv vysoké teploty během varu vzorku před samotnou extrakcí na množství těkavých sirných sloučenin v DCM extraktu *Marasmius alliaceus* (špičky cibulové). Tyto sloučeniny vznikají podle reakčního schématu (viz Obrázek 8) rozkladem marasmicinu (**24**), který vzniká enzymatickým rozkladem svého prekurzoru - marasminu (**22**) během narušení houbového pletiva. Rozklad marasmicinu (**24**) však neprobíhá spontánně a dá se tedy očekávat pozitivní vliv vysoké teploty na vznik těkavých sirných sloučenin. Tato domněnka byla částečně potvrzena HPLC/PDA analýzou (Obrázek 37). Chromatogram DCM extraktu *Marasmius alliaceus*, který nebyl před extrakcí

podroben varu (Obrázek 37a), obsahuje majoritní sloučeninu 2,4,5,7-tetrathiaoktan-4-oxid, triviálně marasmicin (**24**). Chromatogram extraktu, který byl před samotnou extrakcí přiveden pod zpětným chladičem k varu, obsahuje tuto sloučeninu pouze v minoritním množství. Předpoklad, že marasmicin (**24**) se vlivem vysoké teploty rozložil na těkavé sirné sloučeniny, byl potvrzen GC/MS analýzou. Ta prokázala obsah většího množství těkavých sirných sloučenin ve vzorku, který byl přiveden k varu a následně extrahován dichlormethanem.

GC/MS analýzou DCM extraktu *Marasmius alliaceus* bylo možné potvrdit přítomnost některých těkavých sirných sloučenin, které byly identifikovány ve studii RAPIOR *et al.* (1997). Porovnáním hmotnostních spekter uvedených v této studii byly identifikovány pravděpodobné sloučeniny dimethyltrisulfid (**14**), 2,3,5-trithiahexan (**30**), methyl-1,2,4-trithiolan (**29**), 2,4,5,7-tetrathiaoktan (**25**) a 2,3,4,6,8-pentathianonan (**31**). Ve studii RAPIOR *et al.* (1997) byly tyto sloučeniny (kromě methyl-1,2,4-trithiolanu (**29**)) identifikovány v majoritním množství. Ve vzorku, který nebyl před extrakcí dichlormethanem podroben varu, byly identifikovány pouze sloučeniny methyl-1,2,4-trithiolan (**29**), 2,4,5,7-tetrathiaoktan (**25**) a 2,3,4,6,8-pentathianonan (**31**) (Obrázek 36a).

V experimentální části této diplomové práce byly použity výsledky GC/MS analýzy DCM extraktu *Lentinula edodes* (houževnatce jedlého), která byla předmětem vlastní bakalářské práce (Senzoricky aktivní sloučeniny houževnatce jedlého, PŘF/JU, 2013). Výsledky byly uvedeny pro možnost porovnání obsahu těkavých sirných sloučenin *Lentinula edodes* s dalšími druhy hub, které byly analyzovány v diplomové práci. Díky velkému množství provedených studií bylo možné struktury těkavých sirných sloučenin *Lentinula edodes* s vysokou pravděpodobností identifikovat pomocí knihovny hmotnostních spekter. V případě DCM extraktu *Marasmius alliaceus* tento postup nebyl možný. Identifikace sloučenin byla provedena na základě porovnání hmotnostních dat se studií RAPIOR *et al.* (1997).

Sloučenina dimethyltrisulfid (**14**) byla kromě DCM extraktu *Marasmius alliaceus* také identifikována v majoritním množství v houbách *Lentinula edodes* (CHEN & HO, 1986), *Phallus impudicus* a rostlině *Sauromatum guttatum* (BORG-KARLSON, 1994), v menším množství také v bílých lanýžích *Tuber magnatum* (PELUSIO *et al.*, 1995). Další těkavé

sirné sloučeniny, které se v těchto druzích hub a rodu *Marasmius* shodně vyskytují (dimethyldisulfid (**13**), dimethyltetrasulfid (**15**), 1,3-dithietan (**16**) a 1,2,4-trithiolan (**17**)), se identifikovat nepodařilo.

Předmětem experimentální části bylo také identifikovat těkavé sirné sloučeniny v houbě *Thelephora palmata* (plesňák zápašný). GC/MS analýzou DEE extraktu se přítomnost těkavých sirných sloučenin v této houbě nepotvrdila. Lze tedy konstatovat, že za typické sensorické vlastnosti této houby (pach po hniječím zelí či vařených kedlubnách) jsou pravděpodobně zodpovědné jiné sloučeniny než sirné.

6 Závěr

Z extraktu plodnic houby *Marasmius perforans* (špičky provrtané) se pomocí sloupcové ionexové chromatografie podařilo izolovat nětěkový prekurzor těkavých sensoricky aktivních sirných sloučenin, (*S_sR_c*)- γ -glutamyl-3-(methylthiomethylsulfinyl)-alanin, triviálně γ -glutamyl-marasmin (**21**). Identita této látky byla potvrzena pomocí ESI-MS a NMR spektroskopie.

Metodou GC/MS byly analyzovány těkavé sirné sloučeniny v extraktech plodnic *Marasmius alliaceus* (špičky cibulové) a *Thelephora palmata* (plesňáku zápašného). V případě DCM extraktu *Marasmius alliaceus* bylo možné porovnáním hmotnostních spekter identifikovat pravděpodobnou přítomnost dimethyltrisulfidu (**14**), 2,3,5-trithiahexanu (**30**), methyl-1,2,4-trithiolanu (**29**), 2,4,5,7-tetrathiaoktanu (**25**) a 2,3,4,6,8-pentathianonanu (**31**). HPLC/PDA a GC/MS analýza potvrdily významný vliv vysoké teploty na množství a strukturu těkavých sirných sloučenin tvořených během zpracování plodnic *Marasmius alliaceus*. Přítomnost těkavých sirných sloučeniny v DEE extraktu *Thelephora palmata* se prokázat nepodařilo.

7 Reference

ANKE, T., WATSON, W. H., GIANNETTI, B. M., & STEGLICH, W. (1981). Antibiotics from Basidiomycetes. XIII. The Alliicola A and B from *Marasmius alliaceus* (Jacq. ex Fr.) Fr. *The Journal of Antibiotics*, 34, 1271.

ANTONÍN, V. (2006). *Encyklopedie hub a lišejníků*. Praha: Libri.

ARORA, D. (1986). *Mushrooms Demystified: A Comprehensive Guide to the Fleshy Fungi*. Berkeley: Ten Speed Press.

BELLESIA, F., PINETTI, A., BIANCHI, A., & TIRILLINI, B. (1996). Volatile Compounds of the White Truffle (*Tuber Magnatum Pico*) from Middle Italy. *Flavour and Fragrance Journal*, 11, 239–243.

BESSETTE, A. E. (1997). *Mushrooms of Northeastern North America*. Syracuse, N.Y.: Syracuse University Press.

BORG-KARLSONOVÁ, A. K., ENGLUND, F. O., & UNELIUS, C. R. (1994). Dimethyl Oligosulphides, Major Volatiles Released from *Sauromatum guttatum* and *Phallus impudicus*. *Phytochemistry*, 35, 321–323.

BOROVÍČKA, J. (2008). The Wood-rotting Bluing *Psilocybe* Species in Central Europe—an Identification Key. *Czech Mycology*, 60, 173–192.

COKER, W. C., & COUCH, J. N. (1928). *The Gasteromycetes of the Eastern United States and Canada, etc.*. The University of North Carolina Press: Chapel Hill.

DAVIS, R. M., SOMMER, R., & MENGE, J. A. (2012). *Field Guide to Mushrooms of Western North America*. Berkeley: University of California Press.

- DODGE, C. W., & ZELLER, S. M. (1934). *Hymenogaster* and Related Genera. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 21, 625–708.
- ESTEVE-RAVENTÓS, F., & ORTEGA, A. (2003). *Entoloma alliodorum*, a New Species of Subgenus *Claudopus* with a Garlic Odour. *Mycotaxon*, 86, 227–232.
- FIECCHI, A., KIENLE, M. G., SCALA, A., & CABELLA, P. (1967). Bis-methylthiomethane, an Odorous Substance from White Truffle, *Tubermagnatum* Pico. *Tetrahedron Letters*, 8, 1681–1682.
- GMELIN, R., LUXA, H. H., ROTH, K., & HÖFLE, G. (1976). Dipeptide Precursor of Garlic Odour in *Marasmius* Species. *Phytochemistry*, 15, 1717–1721.
- GMELIN, R., N'GALAMULUME-TREVES, M., & HÖFLE, G. (1980). Epilentinsäure, ein neuer aroma-und geruchs-precursor in *Tricholoma* arten. *Phytochemistry*, 19, 553–557.
- GUZMÁN, G., TAPIA, F., RAMÍREZ-GUILLÉN, F., BARONI, T. J., LODGE, D. J., CANTRELL, S. A., & NIEVES-RIVERA, A. M. (2003). New Species of *Psilocybe* in the Caribbean, with an Emendation of *P. Guilartensis*. *Mycologia*, 95, 1171–1180.
- HAGARA, L., ANTONÍN, V., & BAIER, J. (2006). *Velký atlas hub*. Praha: Ottovo nakladatelství.
- HALAMA, M. (2011). *Entoloma albotomentosum* (Agaricales, Basidiomycota), a Species New to Poland. *Acta mycologica* 46, 129–136.
- HARDING, P & OUTEN, A (2003). *Mushrooms (Collins Gem)*. London: Collins.
- HOLEC, J., BERAN, M., ANTONÍN, V., BIEBEROVÁ, Z., BOROVIČKA, J., BUREL, J., & ZÍTA, V. (2006). Červený seznam hub (makromycetů) České republiky [Red list of fungi (macromycetes) of the Czech Republic]. *Příroda*, 24, 1–282.

- CHEN, C. C., & HO, C. T. (1986). Identification of Sulfurous Compounds of Shiitake Mushroom (*Lentinus edodes* Sing.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 34, 830–833.
- CHEN, C. C., CHEN, S. D., CHEN, J. J., & WU, C. M. (1984). Effects of pH Value on the Formation of Volatiles of Shiitake (*Lentinus edodes*), an Edible Mushroom. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 32, 999–1001.
- CHEN, C. C., LIU, S. E., WU, C. M., & HO, C. T. (1986). Enzymic Formation of Volatile Compounds in Shiitake Mushroom (*Lentinus edodes* Sing.). In *ACS Symposium Series-American Chemical Society*.
- IWAMI, K., YASUMOTO, K., & MITSUDA, H. (1975). Enzymatic Cleavage of Cysteine Sulfoxide in *Lentinus edodes*. *Agricultural and Biological Chemistry*, 39, 1947–1955.
- KAVANAGH, F., HERVEY, A., & ROBBINS, W. J. (1949). Proceedings of The National Academy of Sciences. *Botany*, 35, 343–349.
- KUBEC, R., VELÍŠEK, J., & MUSAH, R. A. (2002). The Amino Acid Precursors and Odor Formation in Society Garlic (*Tulbaghia violacea* Harv.). *Phytochemistry*, 60, 21–25
- LAESSØE, T., & LINCOFF, G. (2002). *Mushrooms*. New York: DK Pub.
- LARGENT, D. L., ABELL-DAVIS, S. E., CUMMINGS, G. A., RYAN, K. L., & BERGEMANN, S. E. (2011). Saxicolous Species of *Claudopus* (Agaricales, Entolomataceae) from Australia. *Mycotaxon*, 116, 253–264.
- MAGA, J. A. (1981). Mushroom flavor. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 29, 1–4.

- MAURIELLO, G., MARINO, R., D'AURIA, M., CERONE, G., & RANA, G. L. (2004). Determination of Volatile Organic Compounds from Truffles Via SPME-GC-MS. *Journal of Chromatographic Science*, *42*, 299–305.
- McKNIGHT, K. H., McKNIGHT, V. B., NATIONAL AUDUBON SOCIETY., & NATIONAL WILDLIFE FEDERATION. (1998). *A field guide to mushrooms: North America*. Boston: Houghton Mifflin.
- MORITA, K., & KOBAYASHI, S. (1967). Isolation, Structure, and Synthesis of Lenthionine and Its Analogs. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, *15*, 988.
- MURRILL, W. A. (1941). More Florida Novelties. *Mycologia*, *33*, 434–448.
- NICHOLAS, G. M., BLUNT, J. W., & MUNRO, M. H. (2001). Cortamidine Oxide, a Novel Disulfide Metabolite from the New Zealand Basidiomycete (Mushroom) *Cortinarius* Species. *Journal of Natural Products*, *64*, 341–344.
- PELUSIO, F., NILSSON, T., MONTANARELLA, L., TILIO, R., LARSEN, B., FACCHETTI, S., & MADSEN, J. (1995). Headspace Solid-phase Microextraction Analysis of Volatile Organic Sulfur Compounds in Black and White Truffle Aroma. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *43*, 2138–2143.
- POLEMIS, E., & NOORDELOOS, M. E. (2007). Two New *Gymnopus* Species from the Island of Andros (Kiklades, C. Aegaen, Greece). *Mycotaxon*, *102*, 171–178.
- PYYSALO, H. (1976). Identification of Volatile Compounds in Seven Edible Fresh Mushrooms. *Acta Chemica Scandinavica. B*, *30*, 235–244.
- RAHMAN, T., & CHOUDHURY, M. B. K. (2013). Shiitake Mushroom: A Tool of Medicine. *Bangladesh Journal of Medical Biochemistry*, *5*, 24–32.

- RAPIOR, S., BREHERET, S., TALOU, T., & BESSIÈRE, J. M. (1997). Volatile Flavor Constituents of Fresh *Marasmius alliaceus* (Garlic Marasmius). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 820–825.
- REA, C. (1968). *British Basidiomycetaceae*. Lehre, J. Cramer; New York, Stechert-Hafner Service Agency.
- ROODY, W. C. (2003). *Mushrooms of West Virginia and the Central Appalachians*. Lexington, Ky.: University Press of Kentucky.
- SHIBATA, H. (2004). *Cortinarius Rubellus*, a Poisonous Species New to Japan. *Mycoscience*, 45, 395–397.
- SHIGA, H., YOSHII, H., OHE, H., YASUDA, M., FURUTA, T., KUWAHARA, H., OHKAWARA, M., & LINKO, P. (2004). Encapsulation of Shiitake (*Lentinus edodes*) Flavors by Spray Drying. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 68, 66–71.
- SCHUTTE, L., & TERANISHI, R. (1974). Precursors of Sulfur-containing Flavor Compounds. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, 4, 457–505.
- SINGER, R. (1959). New and Interesting Species of Basidiomycetes. VI. *Mycologia*, 51, 375–400.
- SNEEDEN, E. Y., HARRIS, H. H., PICKERING, I. J., PRINCE, R. C., JOHNSON, S., LI, X., BLOCK, E., & GEORGE, G. N. (2004). The Sulfur Chemistry of Shiitake Mushroom. *Journal of the American Chemical Society*, 126, 458–459.
- SZEZEPKOWSKI, A., KUJAWA, A., & HALAMA, M. (2013). *Volvariella bombycina* (Schaeff.) Singer in Poland: Notes on Its Ecology, Distribution and Conservation Status. *Polish Journal of Environmental Studies*, 22, 41–51.

- TALOU, T., DELMAS, M., & GASET, A. (1987). Principal Constituents of Black Truffle (*Tuber melanosporum*) Aroma. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 35, 774–777.
- TRAPPE, J. M., MOLINA, R., LUOMA, D. L., CÁZARES, E., PILZ, D., SMITH, J. E., *et al.* (2009). *Diversity, Ecology, and Conservation of Truffle Fungi in Forests of the Pacific Northwest*. Portland, OR: US Department of Agriculture, Forest Service, Pacific Northwest Research Station.
- YASUMOTO, K., & IWAMI, K. (1987). S-Substituted L-cysteine Sulfoxide Lyase from Shiitake Mushroom. *Methods in Enzymology*, 143, 434–439.
- YASUMOTO, K., IWAMI, K., & MITSUDA, H. (1971a). Enzyme-catalyzed Evolution of Lenthionine from Lenthionine. *Agricultural and Biological Chemistry*, 35, 2070–2080.
- YASUMOTO, K., IWAMI, K., & MITSUDA, H. (1971b). A New Sulfur-containing Peptide from *Lentinus edodes* Acting as a Precursor for Lenthionine. *Agricultural and Biological Chemistry*, 35, 2059–2069.
- YASUMOTO, K., IWAMI, K., & MITSUDA, H. (1976). Enzymatic Formation of Shiitake Aroma Non-Volatile Precursor (s)-lenthionine from Lenthionine. *Mushroom Science*, 9, 371–383.
- ZELENÝ, L. (2006). Taxonomic Literature on the Genus *Lepiota* s.l. in the Czech Republic. *Czech Mycology*, 58, 225–265.
- ZELLER, S. M., & DODGE, C. W. (1918). *Gautieria* in North America. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 5, 133–142.
- ZERVAKIS, G. I., DIMOU, D. M., POLEMIS, E., & KARADELEV, M. (2002). Mycodiversity Studies in Selected Ecosystems of Greece: II. Macrofungi Associated with Conifers in the Taygetos Mountain (Peloponnese). *Mycotaxon*, 83, 97–126.

Elektronický zdroj:

Zicha O. (ed.): Biological Library – BioLib. <http://www.biolib.cz>

8 Použité zkratky

DCM	dichlormethan
DEE	diethylether
ESI	ionizace elektrosprejem
GC	plynová chromatografie
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
<i>LE</i>	<i>Lentinula edodes</i>
MS	hmotnostní spektroskopie
NMR	nukleární magnetická rezonance
PDA	detektor diodového pole
psi	jednotka tlaku (pound per square inch), 1 MPa \approx 145 psi
R_f	retardační faktor
RVO	rotační vakuová odparka
TLC	chromatografie na tenké vrstvě