

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH  
PEDAGOGICKÁ FAKULTA

## DIPLOMOVÁ PRÁCE

*Sírné sloučeniny houževnatce jedlého (Lentinus edodes, Sing.)*

Vypracovala: Radka Fořtová  
Vedoucí diplomové práce: doc. Ing. Roman Kubec, Ph.D.  
(katedra aplikované chemie, ZF JU)

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 22.4. 2012

.....

Děkuji svému vedoucímu diplomové práce doc. Ing. Romanu Kubcovi, Ph.D., za cenné rady, připomínky, trpělivost a porozumění, s nímž mě při této práci vedl.

Dále děkuji všem pracovníkům katedry aplikované chemie ZF JU, kteří se podíleli na přípravě vhodných podmínek pro moji práci.

Zároveň děkuji všem ostatním, kteří se jakkoliv podíleli na dokončení této práce.

Tato práce vznikla za finanční podpory Grantové agentury Jihočeské univerzity (projekt GAJU 067/2010/Z).

**ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE**  
(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Radka FOŘTOVÁ**  
Osobní číslo: **P07768**  
Studijní program: **M7504 Učitelství pro střední školy**  
Studijní obory: **Učitelství biologie**  
**Učitelství chemie**  
Název tématu: **Sírné sloučeniny houževnatce jedlého (*Lentinus edodes* Sing.)**  
Zadávající katedra: **Katedra aplikované chemie**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

Zásady pro vypracování:

- vypracujte literární rešerši se zaměřením na sírné sloučeniny vyskytující se v houževnatci jedlém;
- pokuste se izolovat lentinikovou kyselinu;
- experimentálně sledujte změny obsahu lentinikové kyseliny během kulinárního zpracování houževnatce jedlého;
- získané výsledky vyhodnoťte, vhodně zdokumentujte a diskutujte.

Rozsah grafických prací: podle potřeby výsledků  
Rozsah pracovní zprávy: 50-60 stran  
Forma zpracování diplomové práce: tištěná

Seznam odborné literatury:

Yasumoto K., Iwami K., Mitsuda H.: A new sulfur-containing peptide from *Lentinus edodes* acting as a precursor for lenthionine. *Agr. Biol. Chem.* 35 (13), 2059-2069, 1971.

Höfle G. *et al.*: Struktur der Lentinsäure: 2-( $\gamma$ -Glutamylamino)-4,6,8,10,10-pentaoxo-4,6,8,10-tetrathiaundecansäure. *Tetrahedron Lett.* 36, 3129-3132, 1976.

Chen C. C., Ho C. T.: Identification of sulfurous compounds of shiitake mushroom (*Lentinus edodes* Sing.). *J. Agric. Food. Chem.* 34 (5), 830-833, 1986.

další vědecké publikace.

Vedoucí diplomové práce: doc. Ing. Roman Kubec, Ph.D.  
Katedra aplikované chemie

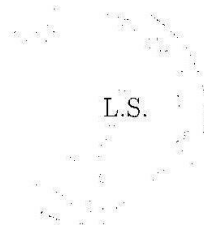
Datum zadání diplomové práce: 16. listopadu 2010

Termín odevzdání diplomové práce: 30. dubna 2012



Mgr. Michal Vančura, Ph.D.

děkan



prof. Ing. Martin Křížek, CSc.

vedoucí katedry

V Českých Budějovicích dne 16. listopadu 2010

## SOUHRN

Tato práce se zabývá třetí nejpěstovanější houbou na světě, houževnatcem jedlým (*Lentinula edodes*, Berk., Pegler), konkrétně některými jejími sírnými sloučeninami. Jedná se o houbu často označovanou za elixír života nebo také houbu dlouhověkosti, jelikož má řadu prokázaných pozitivních účinků na lidské zdraví. Snižuje vysoký krevní tlak, hladinu cholesterolu, posiluje imunitu organismu a působí preventivně proti některým typům rakovinného bujení. Tuto populární houbu lze nalézt i pod názvy shiitake, šiitake, šii-také, šií-také, šitake, shii-ta-ke či šítake.

V této práci byl popsán postup pro izolaci netěkavého prekurzoru aroma houby shiitake, lentinikové kyseliny. Zároveň byla vyvinuta analytická metoda umožňující kvantitativní stanovení této sloučeniny pomocí HPLC/DAD.

Lentiniková kyselina, sírná sloučenina hub shiitake, je netěkavý prekurzor těkavých cyklických sírných látek, hlavně lentioninu. Těkavé látky vznikají při sušení hub shiitake působením enzymů  $\gamma$ -glutamyltransferasy a C-S lyasy právě na tuto kyselinu. Optimální pH pro aktivitu zmíněných enzymů se nachází kolem hodnoty 9. Těkavé látky byly izolovány z čerstvých hub shiitake třemi různými postupy, a sice a) pomocí Likers-Nickersonovy aparatury, b) přímou extrakcí a c) přímou extrakcí s úpravou pH vzorku na hodnotu 9,0. Tyto těkavé sloučeniny byly následně analyzovány a identifikovány metodou plynové chromatografie s hmotnostní detekcí (GC-MS). Získané výsledky potvrdily, že za hodnot pH přirozeně panujících v shiitake (pH 6,5) se tvoří pouze malé množství těkavých sírných látek. Naopak úpravou pH homogenátu na hodnotu 9,0 byly aktivovány oba klíčové enzymy  $\gamma$ -glutamyltransferasa a C-S lyasa, které jsou zodpovědné za přeměnu lentinikové kyseliny na těkavé cyklické sírné látky, a tudíž tento extrakt obsahoval velké množství těkavých sírných látek.

klíčová slova: *Lentinula edodes*, shiitake, lentiniková kyselina, lentionin

## SUMMARY

This work deals with the third most frequently grown mushroom worldwide, namely with *Lentinula edodes* (Berk., Pegler), especially with its sulfur compounds. This mushroom is often named as an elixir of life, longevity, or sponge with many proven positive biological effects on human health. It reduces high blood pressure, cholesterol level, strengthens the immunity of the organism and has a preventive effect against some types of cancer. This popular mushroom is also known under names of shiitake, shii-take or shii-ta-ke.

The present thesis describes the procedure for the isolation of the non-volatile flavor precursor of shiitake mushrooms, lentinic acid. Furthermore, an analytical method was developed for the quantitative determination of this compound by HPLC/DAD.

Lentinic acid, a sulfur compound of shiitake mushrooms, is a non-volatile precursor of cyclic volatile sulfur compounds, mainly lenthionine. These volatile substances are formed during the drying of shiitake mushrooms by the concerted action of enzymes called  $\gamma$ -glutamyltransferase and C-S lyase that catalyze breakdown of lentinic acid. The pH optimum for these enzymes is around 9. Volatile compounds were isolated from fresh shiitake mushrooms by three different procedures: a) Likers-Nickerson apparatus, b) direct extraction and c) direct extraction of the sample after adjusting the pH to 9.0. These volatile compounds were analyzed and identified by gas chromatography with mass spectroscopy (GC-MS). The results confirmed that at the pH value naturally prevailing in shiitake (pH 6.5), only a small amount of volatile sulfur compounds is formed. Adjusting the homogenate pH to 9 activated both enzymes ( $\gamma$ -glutamyltransferase and C-S lyase) responsible for the conversion of lentinic acid into cyclic volatile sulfur substances, resulting in the formation of a significantly larger amount of volatile sulfur compounds.

Keywords: *Lentinula edodes*, shiitake, lentinic acid, lenthionine

## OBSAH

1	Úvod.....	1
2	Teoretická část .....	2
2.1	Zařazení <i>Lentinula edodes</i> do botanického systému.....	2
2.2	Popis a původ plodnic <i>Lentinula edodes</i> .....	2
2.3	Pěstování <i>Lentinula edodes</i> .....	4
2.3.1	Metody pěstování <i>Lentinula edodes</i> .....	4
2.3.2	Pěstování <i>Lentinula edodes</i> tradiční metodou na dřevěných kulatinách ....	4
2.3.3	Pěstování <i>Lentinula edodes</i> na umělých substrátech.....	8
2.3.4	Nutriční požadavky a faktory prostředí pro pěstování <i>Lentinula edodes</i> ...	9
2.3.5	Pěstování <i>Lentinula edodes</i> s ohledem na potlačení chudoby a využití zdrojů přírodního znečištění.....	11
2.4	Produkce plodnic <i>Lentinula edodes</i> .....	11
2.4.1	Produkce <i>Lentinula edodes</i> v Asii .....	11
2.4.2	Světová produkce <i>Lentinula edodes</i> .....	12
2.4.3	Další produkované houby .....	15
2.5	Účinky <i>Lentinula edodes</i> na zdraví.....	16
2.5.1	Poživatelnost a nutriční hodnoty.....	16
2.5.2	Účinky <i>Lentinula edodes</i> na zdraví.....	17
2.5.3	Obchodní přípravky a dávkování.....	18
2.6	Úpravy <i>Lentinula edodes</i> .....	19
2.7	Sírné sloučeniny <i>Lentinula edodes</i> .....	21
2.7.1	Lentiniková kyselina a její struktura.....	21
2.7.2	Enzymově katalyzovaný rozklad lentinikové kyseliny.....	22
2.7.3	$\gamma$ -Glutamyltransferasa .....	25
2.7.4	C–S lyasa .....	26
2.7.5	Těkavé sírné sloučeniny v <i>Lentinula edodes</i> .....	26
2.7.6	Těkavé sloučeniny <i>Lentinula edodes</i> : .....	28
2.7.7	Vliv pH hodnoty na tvorbu těkavých látek v <i>Lentinula edodes</i> .....	29
2.7.8	Formaldehyd v <i>Lentinula edodes</i> .....	29
3	Cíle práce .....	31
4	Experimentální část.....	32

---

4.1	Získávání vzorků hub .....	32
4.2	Použité chemikálie, pomůcky a přístroje .....	32
4.2.1	Použité chemikálie .....	32
4.2.2	Použité pomůcky a přístroje.....	32
4.3	Analytické metody a postupy .....	33
4.3.1	Izolace lentinikové kyseliny .....	33
4.3.2	Stanovení lentinikové kyseliny v různých vzorcích .....	35
4.3.3	Stanovení obsahu těkavých látek .....	39
5	Výsledky a diskuse .....	42
5.1	Lentiniková kyselina .....	42
5.1.1	Izolace lentinikové kyseliny .....	42
5.1.2	Zjištění mezí detekce lentinikové kyseliny .....	45
5.1.3	Obsah lentinikové kyseliny v různých vzorcích <i>Lentinula edodes</i> .....	46
5.2	Těkavé látky <i>Lentinula edodes</i> .....	46
6	Závěr .....	55
	Seznam obrázků .....	57
	Seznam tabulek .....	58
	Seznam grafů .....	58
	Literatura.....	59



## 1 Úvod

Houževnatec jedlý (*Lentinula edodes*, Berk., Pegler) patří mezi tři nejoblíbenější a zároveň nejvíce produkované houby Dálného východu spolu s pečárkou dvouvýtrusnou (*Agaricus bisporus*, J.E. Lange, Pilát) a hlívou ústříčnou (*Pleurotus ostreatus*, Jacq. ex Fr., Kumm). (*server biolib.cz*)

Její lidový název shiitake (šii-také) pochází z japonských slov: „*shii*“ jako výraz pro listnatou dřevinu a „*také*“, což znamená houba. V Číně je tato houba známa pod názvem „*Xiang-gu*“, v překladu vonící houba. V USA je také známa jako „Black forest mushroom“, v překladu: „černá lesní houba“. Ve Francii je shiitake známo pod názvem lectin. Tato houba pochází z Japonska a Číny, kde je používána již přes 2000 let. Dnes se *Lentinula edodes* pěstuje ve velkém měřítku, celosvětová roční produkce dosahuje řádově stovek tisíc tun. (*CHEN, 2005*)

Tato houba je často označována za elixír života nebo také houbu dlouhověkosti, jelikož má řadu prokázaných pozitivních účinků na lidské zdraví. Snižuje vysoký krevní tlak, hladinu cholesterolu, posiluje imunitu organismu a působí preventivně proti některým typům rakovinného bujení. (*SOLOMON, 2005*)

V shiitake je poměrně vysoký obsah bílkovin. Obsahuje též řadu polysacharidů, vitaminy skupiny B, vitamin D a stopové prvky. (*SMOTLACHA, 1992*)

Těkavé sírné sloučeniny vyskytující se v shiitake jsou zodpovědné za jejich typickou vůni a chuť. Jejich prekurzorem je netěkavá sírná sloučenina–lentiničová kyselina, která je rozkládána společným působením dvou enzymů  $\gamma$ -glutamyltransferasy a C–S lyasy, na těkavé sírné sloučeniny, jako je např. lenthionin.

## 2 Teoretická část

### 2.1 Zařazení *Lentinula edodes* do botanického systému

Houževnatec jedlý, (*Lentinus edodes*, Berk., Singer nebo *Lentinula edodes*, Berk., Pegler), dále jen *LE*, se řadí do říše houby (Fungi), třídy stopkovýtrusné (Agaricomycetes), řádu pečárkotvaré (Agaricales), čeledi špičkovité (Marasmiaceae). (*server biolib.cz*)

Vědecká synonyma *Lentinula edodes* jsou *Agaricus edodes*, Berk., *Armillaria edodes*, Berk., Sacc., *Collybia shiitake*, J. Schröt., *Cortinellus shiitake*, J. Schröt., Henn., *Lentinus mellianus*, Lohwag, *Lentinus tonkinensis*, Pat., *Lepiota shiitake*, J. Schröt., Tanaka, *Mastoleucomyces edodes*, Berk., Kuntze, *Tricholoma shiitake*, J. Schröt., Lloyd. (*server biolib.cz*)

Mezi další používané názvy patří shiitake, šiitake, šii-také, šíi-také, šitake, shii-ta-ke a šítake. Jedná se o názvy, které se ujaly v hovorovém jazyce.

### 2.2 Popis a původ plodnic *Lentinula edodes*

*LE* má zprvu uzavřený klobouk, barvy světle hnědo-šedivé. Pokud má pěstovaná houba dostatek světla, může se plodnice zbarvit do červenohnědé barvy. Klobouk je na povrchu suchý a krytý bělavými šupinami. U starších plodnic je povrch klobouku potrhán a uprostřed prohlouben. Dosahuje v průměru 7–8 cm. Okraje plodnice jsou dlouho podvinuté. Lupeny na spodní straně klobouku jsou husté, světle žlutě zbarvené a zpočátku přirostlé na třeň. Třeň je silný asi 8–12 mm a dlouhý asi 4–7 cm. Dužnina má česnekovou chuť a vůni (*SMOTLACHA, 1992*). Označení této charakteristické chuti a vůně se říká umami.

Jedná se o houbu v Číně a Japonsku známou již přes 2000 let. V Koreji a jiných východoasijských státech se tato houba začala pěstovat později.



**Obrázek 1: Plodnice shiitake (*Lentinula edodes*, Berk., Pegler)**

Shiitake roste hlavně v mírném klimatu, a to buď samostatně, nebo v trsech na umírajících nebo již mrtvých listnatých stromech. Tato houba patří do skupiny organismů získávajících živiny saprofytickým způsobem života.

Saprofytické dřevokazné houby získávají živiny podhoubím ze svého okolí, které obsahuje části odumřelých dřevin. Podílejí se na mineralizaci a humifikaci odumřelé dřevní hmoty, jelikož obsahují enzymy rozkládající lignin. (*server ohoubach.blogspot.com*)



**Obrázek 2: *Lentinula edodes* rostoucí na dřevě**

## **2.3 Pěstování *Lentinula edodes***

### **2.3.1 Metody pěstování *Lentinula edodes***

Existují dvě nejvíce používané metody pěstování shiitake. Tradiční metoda používaná již asi před 1000 lety je pěstování na kulatině listnatých stromů, zejména dubu a buku. Poslední dobou se však více využívá metoda pěstování plodnic na vhodných umělých substrátech v pytlicích, které jsou uchovávány v halách za příznivých podmínek pro nárůst shiitake. Tento způsob pěstování byl vyvinut na počátku dvacátého století. Rozdíl mezi tradičním pěstováním a pěstováním na umělých substrátech je v délce výrobního cyklu a s tím spojené návratnosti kapitálu a dále pak v kvalitě produkovaných shiitake. (ROYSE, 2001)

Tradiční pěstování na kulatině v lese má výhodu oproti pěstování na umělých substrátech v požadované menší péči a práci, protože akceptuje přírodní podmínky a nevyžaduje kontrolované podmínky. Mimo jiné kůra, díky svému nízkému obsahu vody, na kulatině poskytuje ochranu mycelia proti jiným mikroorganismům. Shiitake pěstované tradiční metodou jsou obvykle velmi kvalitní, s tlustým kloboukem a silnou vůní. Tento způsob pěstování též způsobuje menší znečištění životního prostředí. Obecně platí, že takto získané shiitake obsahuje mnohem více polysacharidů, a to hlavně polysacharidu s protinádorovým účinkem nazývaným lentinan. Tradiční pěstování trvá nejméně 8–12 měsíců. (ROYSE, 2001)

Pěstování na pilinách má výhodný krátký výrobní cyklus a vyšší výnosnost. To vede ke zvýšené péči o shiitake, konkrétně pěstování za kontrolovaných podmínek, které pak umožňuje produkci po celý rok. Tato metoda však vykazuje vyšší náklady na energii ve srovnání s tradiční metodou. (ROYSE, 2001)

### **2.3.2 Pěstování *Lentinula edodes* tradiční metodou na dřevěných kulatinách**

Proces tradičního pěstování plodnic shiitake zahrnuje tři fáze. První fází je příprava kulatiny a růst vegetativního mycelia. Druhou fází je tvoření plodnic a třetí fáze zahrnuje vývoj plodnic. (ROYSE, 2001)

První fáze zahrnuje výběr hostitelských stromů, kácení a řezání, očkování a spuštění plození shiitake. Pro kultivaci lze použít různých druhů dřeva, jak měkkého, tak tvrdého. Každý druh produkuje různé množství shiitake s různými vlastnostmi. Kulatiny z měkkého dřeva obvykle začínají rodit dříve než kulatiny z tvrdého dřeva, ale vyčerpají své schopnosti rodit rychleji. V Číně, Koreji a Japonsku mnoho pěstitelů využívá především dub (*Quercus*). (ROYSE, 2001)

Hlavním kritériem pro výběr stromů je jejich kůra. Kůra slouží k ochraně před nárůstem dalších hub a plísní a též zabraňuje vypařování vody ze dřeva. Kulatina se převážně skládá z celulózy, hemicelulózy a ligninu, jež jsou rozkládány podhoubím shiitake, které je využívá jako zdroj energie. Dubová kulatina je schopna plodit 4–5 let. Shiitake se očkuje pod ochrannou kůru dřeva, čímž získá výhradní přístup k živinám dřeva. Jiné používané dřeviny jsou habr, buk, javor, bříza, olše, topol, vrba atd. (ROYSE, 2001)

Pro kultivaci se vyberou nejvhodnější stromy v průměru 5–15 cm. Kulatina s průměrem menším než 5 cm totiž není vhodná, jelikož rychle vysychá. Na silných kulatinách zase mycelium prorůstá dřevo déle a tím se prodlouží doba kultivace. Kácení se doporučuje v období vegetačního klidu. Ze stromů se nařeže kulatina dlouhá 100–150 cm. Obsah vody v kulatině se udržuje na 30–35 %. (ROYSE, 2001)

Asi po 2 týdnech po pokácení se shiitake očkuje do otvorů v kmeni, asi 2 cm do hloubky, v podobě pilinných zátek s myceliem. Otvory jsou rozmístěny v 15–20 cm intervalech v podélném směru kulatiny, v řadách po 3–4 cm vzdálených od sebe. To proto, že podhoubí shiitake expanduje v podélném směru téměř pětikrát rychleji než v obvodovém směru. Po naočkování se otvory po pilinných zátkách zalijí voskem, aby se zabránilo mikrobiální kontaminaci a nadměrnému vysušení mycelia. (ROYSE, 2001)

Naočkované kulatiny jsou uchovávány na místě s vhodnou vlhkostí, dobrým odvodněním a nepřímým slunečním zářením. Během růstu hub jsou kulatiny několikrát skládány do odlišného uspořádání. Toto polohování kulatiny slouží k různé ventilaci a změnám vlhkosti mikroprostředí uvnitř kulatiny během odlišných fází růstu shiitake. První dva měsíce se udržuje teplota mezi 10–20 °C a vlhkost na 80–90 %, dokud podhoubí nevzroste o 20 mm. Dále nastává období delší než 6 měsíců, kdy dochází k růstu plodnic. Optimální teplota pro růst *LE* je 22–26 °C. Během tohoto růstu je třeba kontrolovat teplotu a vlhkost kulatiny. Pokud je teplota moc vysoká, přenáší se kulatina do stínu, pokud nízká, přetahuje se speciální folií. Vlhkost kulatiny je též velmi důležitý

faktor, optimální hodnota je mezi 30–35 %. Pokud je vlhkost vyšší nebo naopak nižší, dochází k rapidnímu snižování úrody. (ROYSE, 2001)



Příprava kulatiny pro kultivaci  
shiitake



Očkovací zátky s myceliem  
shiitake



Očkování shiitake



Naočkovaná kulatina houbou  
shiitake

*Obrázek 3: Očkování Lentinula edodes*



typu hranice



typu střecha

*Obrázek 4: Kultivace Lentinula edodes*

*LE* se sklízí, až jsou jeho plodnice dostatečně narostlé, a to na jaře či na podzim. Plodnice se buď ořezávají, nebo vytáčejí z kulatiny. Z hlediska výživy je nejvíce žádoucí sklídit plodnice ve střední nebo pozdější fázi vývoje. Množství cukrů a polysacharidů během vývoje mírně vzrůstá a lentinan (protinádorová látka) je přítomen ve vyšším množství během střední fáze vývoje. Plodnice sklizené během prostřední fáze vývoje mají také delší trvanlivost než plodnice sklizené později. Naočkovaná kulatina je takto schopna plodit 4–6 let. (ROYSE, 2001)



**Obrázek 5: Sklizení shiitake**

Kvalita sklizených shiitake rychle klesá s narůstající teplotou, plodnice rychle hnědnou, více zapáchají a snižuje se u nich množství cukrů, polysacharidů a dalších látek. Trvanlivost shiitake při 20 °C je asi 3 dny. Při 6 °C však vydrží až 14 dnů. Dále se dá použít uchovávání shiitake v ochranné atmosféře, čímž se výrazně zpomalí pokles obsahu prospěšných látek, jako je lentinan. Jednou z nejpoužívanějších metod uchovávání shiitake je sušení. Způsob sušení má vliv na jakost sušených hub. Základním principem sušení je dehydratace při teplotách od 30 °C, poté se teplota zvyšuje o 1–2 °C za hodinu, až do teploty 50 °C, v průměru 12–13 hodin. Nakonec jsou shiitake zahřívány na teplotu 60 °C po dobu jedné hodiny. Čerstvé shiitake se mimo jiné suší, aby se zvýraznila chuť a aroma této houby. (ROYSE, 2001)

Konečný obsah vody v sušených plodnicích shiitake musí být nižší než 13 %, obvykle se suší na obsah vody 8 %. Sušená shiitake je silně hygroskopická. (HIRAIDE *et al.*, 2010)



*Obrázek 6: Sušené plodnice shiitake*

### **2.3.3 Pěstování *Lentinula edodes* na umělých substrátech**

Umělé substráty se vytvářejí převážně z pilin, dále se používá proso, pšeničné otruby, sláma a jiné organické substráty. Tyto substráty mohou vytvářet tři až čtyřikrát tolik hub než přírodní dřevěná kulatina, a to za desetinu času. Také pěstírny s řízeným životním prostředím pro *LE* umožňují optimalizaci teploty a vlhkosti vzduchu, světla a vlhkosti substrátu, což zvyšuje výnosy. Tyto pokroky v technologii pěstování se podílejí na snížení ceny a zvýšení dostupnosti shiitake. (**ROYSE, 2001**)

Hlavní výhodou této výroby jsou tedy konstantní dodávky na trh po celý rok, zvýšení výnosů a snížení doby nutné pro kultivaci. Tyto výhody daleko převyšují hlavní nevýhodu, a to poměrně vysoké počáteční investiční náklady na spuštění výroby a instalaci výrobního zařízení. (**ROYSE, 2001**)

Výrobní cyklus u kultivace na umělých substrátech trvá 3–4 měsíce od očkování k ukončení veškerého plození s účinností této metody v průměru od 75 do 125 % oproti kultivaci na dřevěné kulatině. U dřevěné kulatiny proces pěstování obvykle trvá někdy až 6 let a maximální účinnost se pohybuje kolem 33 %. Celkový čas pro produkci *LE* je tedy u umělých substrátů mnohem kratší a s třikrát vyšší účinností. (**ROYSE, 2001**)





*Obrázek 7: Shiitake pěstovaná na umělém substrátu*

#### **2.3.4 Nutriční požadavky a faktory prostředí pro pěstování *Lentinula edodes***

Výživové požadavky (zdroj uhlíku, dusíku, poměr mezi uhlíkem a dusíkem, minerály, stopové prvky a vitaminy) a faktory prostředí (teplota, vlhkost, kyslík ve vzduchu, hodnoty pH v substrátu) mají významný vliv na pěstování shiitake. (CHEN, 2005)

Jako saprofytické houby vytvářejí shiitake mycelium nejvíce během růstové fáze. Mycelia mohou absorbovat přímo malé molekuly živin, ale potřebují také získat živiny z velkých molekul obsažených ve dřevě. Proto vylučují z mycelia enzymy, které rozloží ligninocelulózové látky, které pak slouží shiitake jako hlavní zdroj uhlíku. Shiitake využívá buněčnou hmotu kůry stromů a xylém jako zdroj dusíku. Dále přijímá malé množství rozpustných látek, spolu s minerály taktéž z xylému a ještě floému dřeviny. (CHEN, 2005)

Uhlík je nejdůležitějším prvkem, co se týče požadavků na výživu pro *LE*. Uhlík je stavební látkou pro proteiny, nukleové kyseliny a sacharidy v živých buňkách. Dusík je nepostradatelný pro tvorbu buněčné šťávy a buněčných struktur v shiitake. Hlavní zdroje dusíku jsou anorganické a organické látky zahrnující močovinu a proteiny.

Dusíkaté zdroje jsou nerovnoměrně rozptýleny ve dřevě. Největší obsah dusíku je v kůře stromu. (CHEN, 2005)

Dřevo pro nejlepší vegetativní růst mycelia shiitake obsahuje uhlík a dusík v poměru 25:1, zatímco dřevo s poměrem uhlíku k dusíku 40:1 je nejlepší pro produkční fázi. Příliš vysoký obsah dusíku způsobí, že mycelium perfektně proroste substrát, ale nebude produkovat kvalitní plodnice. (CHEN, 2005)

Z minerálních látek jsou nejdůležitější fosfor a draslík pro růst mycelia a růst plodnic. Stopové prvky jako železo, měď, zinek, mangan, bor a molybden jsou součástí enzymů. Požadavky na tyto prvky jsou minimální a není nutné je přidávat, jelikož jsou obvykle v dostatečném množství obsaženy ve vodě. (CHEN, 2005)

Shiitake jsou houby mírného klimatu. Vyžadují nízké teploty, pokud jsou teploty příliš vysoké, může dojít u hub k denaturaci bílkovin tvořících enzymy a tím tedy ke ztrátě jejich životaschopnosti. Za nízkých teplot je zase obtížné přijímat živiny, snižuje se enzymatická aktivita a sníží se respirace. Z toho vyplývá snížení rychlosti růstu mycelia. Optimální teplota pro růst shiitake je 22–26 °C. Druhy se mohou adaptovat na široké rozmezí teplot od 5 do 32 °C. Shiitake tolerují chlad, bohužel jsou ale zranitelné při vysokých teplotách. Ve 34 °C přestává růst a žloutne. Vážné poškození mycelia nastává při 40 °C, kdy mycelium odumírá. (CHEN, 2005)

Voda je životně důležitá pro růst a produkci shiitake. Potřebné látky musí být rozpuštěny ve vodě, aby je mohlo mycelium absorbovat. Při pěstování je důležité udržovat optimální vlhkost substrátu. (CHEN, 2005)

Dobře cirkulující a čerstvý vzduch během fáze plození je velmi důležitý. Čerstvý vzduch obsahuje 0,03 % CO<sub>2</sub> a koncentrace CO<sub>2</sub> přes 1,0 % inhibuje vývoj plodnic a způsobuje, že se klobouky plodnic předčasně otevírají. Bylo zjištěno, že každá plodnice shiitake může vyprodukovat až 0,06 g CO<sub>2</sub> za hodinu. Při vysokých koncentracích, nad 5,0 % CO<sub>2</sub>, plodnice odumírají. Dalším faktorem prostředí ovlivňujícím růst shiitake je světlo. Mycelia mohou růst v temnu, bez světla. Světlo je však důležité pro růst plodnic a zrání LE. Shiitake preferují kyselé prostředí. Mohou růst v širokém rozmezí hodnot pH od 3 do 7 s optimálním pH mezi 4,5 až 5,5. (CHEN, 2005)

### **2.3.5 Pěstování *Lentinula edodes* s ohledem na potlačení chudoby a využití zdrojů přírodního znečištění**

Na naší planetě je odhadem vyprodukováno 155 miliard tun organické hmoty. Bohužel pouze malá část této organické masy je přímo použita jako potravina pro člověka nebo zvířata. Většina této masy nemůže být použita jako jídlo, a stává se tak zdrojem přírodního znečištění. Pěstování hub je jeden ze způsobů, jak vytvořit hodnotné produkty z odpadů různých odvětví průmyslu. Týká se to především pivovarnictví, lněného a kávového průmyslu, výroby palmového oleje a zpracování celulózy. Takto by se daly jako substráty pro výrobu shiitake použít i odpady z lesnictví a zemědělství. (CHEN, 2005)

## **2.4 Produkce plodnic *Lentinula edodes***

### **2.4.1 Produkce *Lentinula edodes* v Asii**

*LE* je produkována hlavně v severovýchodní Asii, a to v Číně, Japonsku, Jižní Koreji a Tchaj-wanu. Japonsko bylo v sedmdesátých letech 20. století zdaleka největším producentem těchto hub na světě, před Čínou, Tchaj-wanem a Jižní Koreou. V roce 1974 byla celková produkce shiitake 143 000 tun s podílem: 94,5 % Japonsko, 4,2 % Čína, 1,1 % Tchaj-wan a 0,2 % Jižní Korea. Přestože je *LE* známé již po staletí, jeho masová produkce začala v Japonsku prakticky až po druhé světové válce. Ještě v roce 1983 produkovalo Japonsko více než 82 % celkové světové produkce této houby. Podíl Číny v této době představoval pouze 9,4 %. Jen o 4 roky později, v roce 1987, výroba *LE* v Číně rapidně vzrostla, až na 178 800 tun a překročila produkci *LE* v Japonsku se 162 600 tunami. Japonsko bylo hlavním vývozcem této houby po mnoho let, ale od roku 1988 bylo do Japonska dovezeno více hub, než jich vyvezlo. Čína se nyní stala největším světovým producentem, vývozcem a spotřebitelem shiitake. Tuto pozici si udržuje již od roku 1987, a to hlavně díky používání nových metod produkce shiitake, zejména pěstováním na umělých substrátech. (CHANG, 2002)

Dnes je pěstování *LE* důležitou součástí čínského zemědělství. V Číně žije kolem 18 milionů farmářů zabývajících se pěstováním shiitake a v nedávných letech se zjistilo, že jejich počet se neustále zvyšuje. V roce 2002 byly odhadem vypěstovány

2 miliony tun shiitake a z toho 45 000 tun bylo vyvezeno do ostatních zemí. Produkce této houby byla původně omezena na severovýchodní Asii, ale již delší dobu se její pěstování rozšiřuje také do USA, Kanady, Austrálie, Brazílie a některých evropských zemí. Předpokládá se, že produkce této oblíbené houby, která může být použita jak k jídlu, tak i do výživových doplňků, se bude neustále zvyšovat. (CHANG, 2002)

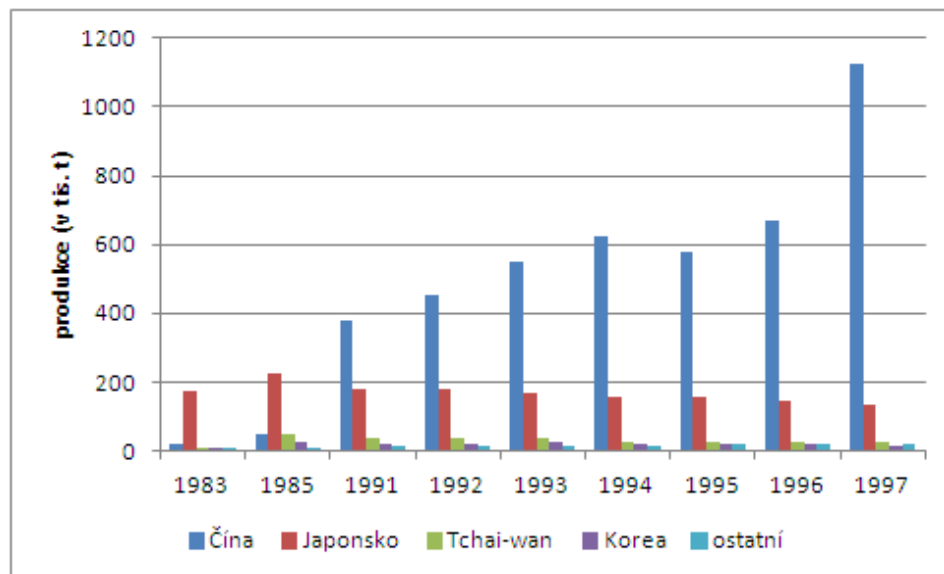
#### **2.4.2 Světová produkce *Lentinula edodes***

Světová produkce *LE* ve vybraných letech je uvedena v tabulce 1. Celková světová produkce shiitake v roce 1983 činila 206 700 tun a do roku 1997 se zvýšila na 1 321 600 tun. Během těchto čtrnácti let se zvýšila produkce o 539 % s průměrným meziročním nárůstem o 39 %. Během roku 1985 až 1995 se zvýšila výroba *LE* v Číně o 1 060 % a naopak snížila výroba o 47 % v Japonsku, 23 % na Tchaj-wanu a o 82 % v Koreji. Avšak produkce shiitake v ostatních zemích, hlavně v Severní Americe se zvýšila o 92 %. Celková světová produkce shiitake v tomto období vzrostla o 123 % s průměrným meziročním růstem o 12 %. Je nutné podotknout, že na trh je shiitake uváděno tradičně v sušené formě. Pro porovnání sušených výrobků a čerstvých hub je nezbytné provedení přepočtů. Dříve bylo třeba k výrobě 1 kg sušených hub shiitake 7 kg čerstvých hub s použitím tradiční metody na pěstování *LE* na dřevěných kulatinách. Při v poslední době preferované a dominantní metodě pěstování shiitake na umělých substrátech se spotřebuje na výrobu 1 kg sušených hub 5–14 kg čerstvých hub, a to v závislosti na použitém substrátu a počasí při sklizni. (CHANG, 2002)

Tabulka 1: Světová produkce čerstvé *Lentinula edodes* v různých letech (v tisících tun). (CHANG, 2002)

Stát/rok	1983		1985		1991		1992		1993		1994		1995		1996		1997	
	množství	%	množství	%	množství	%	množství	%	množství	%	množství	%	množství	%	množství	%	množství	%
Čína	19,5	9,4	50,0	13,9	380,0	60,5	450,0	63,9	550,0	68,9	626,0	73,6	580,0	72,5	670,6	76,3	1 125,0	85,1
Japonsko	171,2	82,2	227,3	63,3	179,7	28,6	177,1	25,2	170,4	21,3	157,4	18,5	155,2	19,4	144,0	16,4	132,6	10,0
Tchaj-wan	7,5	3,6	49,0	13,7	36,8	5,9	39,4	5,6	36,4	4,6	28,0	3,3	26,9	3,4	27,0	3,1	27,0	2,1
Korea	4,9	2,4	23,4	6,5	17,2	2,7	22,5	3,2	25,8	3,2	22,0	2,6	19,0	2,4	18,7	2,1	17,0	1,3
ostatní	3,8	1,8	9,4	2,6	14,5	2,3	15,0	2,1	16,0	2,0	17,0	2,0	18,0	2,3	19,0	2,1	20,0	1,5
součet	206,7	100	359,1	100	628,2	100	704	100	798,6	100	850,4	100	799,1	100	879,3	100	1 321,6	100

**Graf 1: Světová produkce čerstvé *Lentinula edodes* v různých letech (v tisících tun).  
(CHANG, 2002)**



V roce 2003 se celosvětově vyprodukovalo 2 433 800 t shiitake. Samotná Čína vyprodukovala 2 227 600 t shiitake, což představuje asi 91,5 % z celkové celosvětové produkce této houby. Na druhém místě v produkci shiitake celosvětově stojí Japonsko se 122 300 t, představujícími 5,0 % celosvětové produkce, za Japonskem pak se 3,1 % stojí ostatní státy Asie. Přehled produkce shiitake v roce 2003 je uveden v tabulce 2. (ROYSE, 2009)

**Tabulka 2: Odhadovaná produkce (čerstvé váhy), shiitake (*Lentinula edodes*), v některých zemích v r. 2003. (ROYSE, 2009)**

Stát	Produkce	
	tis. [t]	%
Čína	2 227,6	91,5
Japonsko	122,3	5,0
zbytek Asi	75,4	3,1
Severní Ař	4,8	0,2
Latinská A	0,9	-
EU	2,0	0,1
zbytek Evř	0,8	-
<b>součet</b>	<b>2 433,80</b>	<b>99,9</b>

### 2.4.3 Další produkované houby

Jak bylo uvedeno výše, shiitake je třetí nejprodukovanější houbou současnosti. V tabulce 3 jsou uvedeny nejvýznamnější druhy hub pěstovaných od roku 1986 až po rok 2003 v tisících tunách.

**Tabulka 3: Světová produkce pěstovaných jedlých hub v roce 1986 a 2003 (v tisících tun). (ROYSE, 2009)**

Druh	Čerstvé houby				zvýšení %
	1986		2003		
	množství	%	množství	%	
<i>Agaricus bisporus</i> (žampion dvouvýtrusný)	1 227	56,2	4 295	30,1	250,0
<i>Pleurotus spp.</i> (hlíva)	169	7,7	2 927	20,5	1 632,0
<i>Lentinula edodes</i> (houževnatec jedlý)	314	14,4	2 620	18,4	734,4
<i>Auricularia spp.</i> (boltcovitka)	119	5,5	1 945	13,6	1 534,5
<i>Flammulina velutipes</i> (penízovka sametonohá)	100	4,6	656	4,6	556,0
<i>Hypsizygus spp.</i> (hlíva)	-	-	285	2,0	-
<i>Volvariella volvacea</i> (kukmák sklepní)	178	8,2	232	1,6	30,3
<i>Tremella spp.</i> (rosolovka)	40	1,8	215	1,5	650,9
<i>Pholiota spp.</i> (šupinovka)	25	1,1	201	1,4	704,0
<i>Coprinus comatus</i> (hnojník obecný)	-	-	183	1,3	-
<i>Pleurotus eryngii</i> (hlíva máčková)	-	-	104	0,7	-
<i>Grifola frondosa</i> (trsnatec lupenitý)	-	-	66	0,5	-
ostatní	10	0,5	518	3,6	5 080,0
<b>součet</b>	<b>2 182</b>	<b>100</b>	<b>14 274</b>	<b>99,8</b>	<b>554,2</b>

Nejpěstovanějším druhem je pečárka dvouvýtrusná či žampion dvouvýtrusný (*Agaricus bisporus*, J.E. Lange, Pilát). Druhou nejpěstovanější houbou je hlíva ústříčná (*Pleurotus ostreatus*, Jacq. ex Fr., Kumm). Čtvrtou nejpěstovanější houbou je rod boltcovitka (*Auricularia*, Bull. ex Juss.). Asi nejznámějším druhem rodu *Auricularia* je *Auricularia auricula-judae*, tzv. boltcovitka ucho Jidášovo. Pátou nejpěstovanější houbou je penízovka sametonohá (*Flammulina velutipes*, Curt., Sing.). Obrázek 8 ukazuje tyto nejvíce produkované houby na světě. ([server biolib.cz](http://server.biolib.cz))



žampión  
dvouvýtrusný  
*Agaricus bisporus*



hlíva ústříčná  
*Pleurotus ostreatus*



boltcovitka  
*Auricularia*



penízovka sametonohá  
*Flammulina velutipes*

**Obrázek 8: Další pěstované houby**

## 2.5 Účinky *Lentinula edodes* na zdraví

### 2.5.1 Požitelnost a nutriční hodnoty

Shiitake jsou známé jedlé houby s vysokou výživovou hodnotou. Množství přítomných živin v houbě se liší u různých druhů a je ovlivněno substrátem a různými podmínkami při pěstování. Syrové plodnice obsahují 88–92 % vody, bílkovin, tuků, sacharidů, vitaminů a minerálů. Sušené houby jsou bohaté na bílkoviny a sacharidy. Obsahují 58–60 % sacharidů, 20–23 % bílkovin, 9–10 % vlákniny a 3–4 % lipidů. (SOLOMON, 2005)

Solomon (2005) zjistil, že shiitake jsou také dobrým zdrojem vitaminů, především provitaminu D<sub>2</sub>, ze kterého působením tepla a UV záření vzniká vitamin D. Obsahuje též vitaminy skupiny B, včetně B1 (thiamin), B2 (riboflavin), B12 (kobalamin) a B5 (kyselina pantothenová). Ve vodě rozpustné polysacharidy činí 1–5 % sušiny houby shiitake.

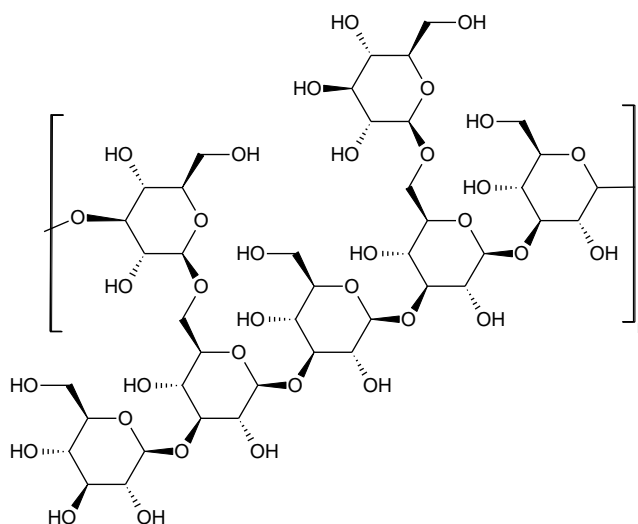
Byla identifikována řada polysacharidů jako (1–4)-, (1–6)- $\alpha$ -D-glukany, heterogalaktany, heteromannany, xyloglukany a protinádorové polysacharidy jako lentinan. (SOLOMON, 2005)

Volné mastné kyseliny tvoří kolem 3 % z celkového množství lipidů. Jejich relativní zastoupení je následující: kyselina linolová se 72,8 %, kyselina palmitová se 14,7 %, kyselina olejová se 3,0 %, kyselina myristolejová s 1,6 %, kyselina stearová s 0,9 % a kyselina myristová s 0,1 %. (SOLOMON, 2005)



### 2.5.2 Účinky *Lentinula edodes* na zdraví

Shiitake je jedna z nejznámějších a nejvíce používaných hub v lékařství. Chihara et al.(1970) získali z plodnic shiitake ve vodě rozpustný protinádorový polysacharid, který pojmenovali lentinan (**I**) po rodu *Lentinus*, ke kterému shiitake patří (viz obrázek 9). Chihara et al.(1970) byli jedním z prvních, kteří podali zprávu o protinádorových vlastnostech lentinanu. Účinek lentinanu spočívá v aktivaci imunitního systému. Proto je lentinan schopen zvýšit odolnost konzumenta před různými druhy rakoviny a infekčními chorobami. Pokusy na myších prokázaly, že intravenózní aplikace lentinanu buď o 80 % snížila velikost nádoru, nebo nádor úplně potlačila u většiny testovaných zvířat. (SOLOMON, 2005)



Obrázek 9: Struktura lentinanu (**I**)

Hlavní příčinou úmrtí v západních zemích je ischemická choroba srdeční. Rizikový faktor přispívající ke kornatění tepen je vysoká hladina cholesterolu. Houby shiitake dokáží snížit krevní hladinu cholesterolu, a to urychlením jeho vylučování. Dále polysacharidy v houbě shiitake mají schopnost zlepšovat funkci jater a zvýšit produkci protilátek proti hepatitidě typu B. (SOLOMON, 2005)

Lentinan a jeho deriváty jsou účinné proti různým druhům bakterií, virů a parazitickým infekcím. Jak již bylo uvedeno, lentinan mobilizuje v organismu

látkovou imunitu. Existuje možnost využívat lentinan pro pacienty nemocné rakovinou a AIDS, kteří umírají na různé infekce způsobené sníženou imunitou. Jsou prováděny studie, ve kterých se dokazují účinky lentinanu na potlačení replikace HIV viru. Ukázalo se, že lentinan má antivirovou aktivitu i proti viru encefalitidy a stimuluje odolnost proti virovým onemocněním dýchacích cest u myši. Dále vykazuje aktivitu proti parazitům *Schistosoma japonicum* a *Schistosoma mansoni*, proti bakteriím *Mycobacterium tuberculosis*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, proti kvasinkám *Candida albicans* a *Saccharomyces cerevisiae* a proti plísním *Botrytis cinerea*, *Physalospora piricola* a *Mycosphaerella arachidicola*. (SOLOMON, 2005)

Za posledních 15–20 let byly houby shiitake předmětem různých klinických studií. Jsou považovány za přínosné pro léčbu celé řady onemocnění včetně různých druhů rakoviny, srdečních onemocnění, vysokému obsahu cholesterolu, zvýšenému krevnímu tlaku, infekčních onemocnění a hepatitidy. Shiitake se používá jako lék na nemoci týkající se poruch imunitního systému, rakoviny, alergií, plísňových infekcí a nachlazení. Dále se zkoumá účinek lentinanu na virus HIV. (SOLOMON, 2005)

Houba shiitake je jedlá, ale u některých jedinců se mohou při její konzumaci projevit negativní účinky či alergické reakce. Příznakem alergie mohou být různé kožní vyrážky. Alergické reakce se objevily též u pracovníků v pěstírnách shiitake. K příznakům alergie na spory hub patří horečka, bolesti hlavy, překrvení, kašel, kýčání a malátnost. (SOLOMON, 2005)

### **2.5.3 Obchodní přípravky a dávkování**

Extrakty z shiitake hub jsou předepisovány v různých formách. Mohou být aplikovány ve formě roztoku nebo jako tablety obalené cukrem, kapsle, koncentráty, práškové extrakty, sirupy, čaje, víno, ale i jako léčivé jídlo. Standardní dávka sušené plodnice v čaji nebo houbových pokrmech je uvedena jako 6–16 g, což odpovídá asi 90 g čerstvých plodnic. Komerční přípravky lze nalézt v mnoha zemích v prodejnách zdravé výživy. Tablety jsou obvykle vyrobeny ze sušeného vodného extraktu mycelia a plodnic, jelikož sušením se zvyšuje obsah lentinanu a dalších zdravých prospěšných látek. Na trhu existují standardizované extrakty, kde je uvedeno přesné množství lentinanu. Čerstvé formy této houby jsou cenným doplňkem stravy, ale terapeutická

dávka, kterou by člověk potřeboval, by byla tak velká, že by mohla způsobit zaživací obtíže. Toto je důvod upřednostňování koncentrátů se standardizovaným množstvím lentinanu pro léčebné účely.

Ve východních zemích je známo mnoho produktů s touto houbou. Prodává se jako směs prášku shiitake s vitamínem C, nebo s léčivými rostlinami, jako je ženšen. Na obrázku 10 je ukázka některých produktů s houbou shiitake. (SOLOMON, 2005)



shiitake tablety

shiitake s vitamínem C



shiitake extrakt

**Obrázek 10: Ukázka potravních doplňků obsahujících shiitake**

## 2.6 Úpravy *Lentinula edodes*

Shiitake má velký význam v tradiční asijské kuchyni. Nalézá ovšem všestranné uplatnění i v evropské kuchyni, a to při makrobiotické a vegetariánské stravě, či různých redukčních dietách. Využívají se jak čerstvé, tak i sušené plodnice. Tato houba je považována za opravdovou lahůdku.

K jídlu se využívají pouze kloboučky. Do České republiky se dováží především v sušené formě. Sušené shiitake je třeba před použitím do jídel několik hodin namáčet ve vodě. Pro charakteristickou chuť se přidává do polévek, k masu a do salátů. Lze ji použít na dochucení masových jídel, smažit, dusit, grilovat a zapékat. Nadrcené sušené shiitake se může použít jako koření k dochucení polévek a masových pokrmů. Shiitake se dá také koupit čerstvé či se nechá zakoupit i substrát s touto houbou a každý si ji může vypěstovat sám v domácích podmínkách.

Neobvyklým způsobem konzumace této houby jsou shiitake čaje, připravované z čajových sáčků či popíjení shiitake vína. Shiitake „víno“ se vyrábí namáčením čerstvých či sušených hub do alkoholu a mícháním s cukrem nebo melasou. (SOLOMON, 2005)



shiitake polévka



grilované shiitake



smažené shiitake



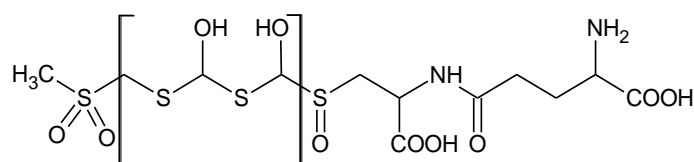
drcené shiitake používané jako koření či na přípravu čaje

**Obrázek 11: Kulinární úpravy shiitake**

## 2.7 Sirné sloučeniny *Lentinula edodes*

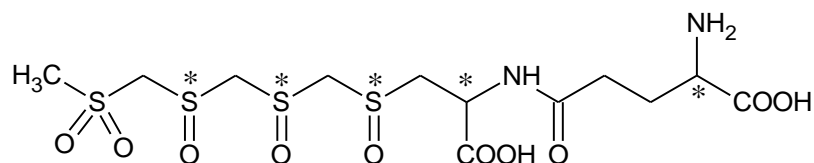
### 2.7.1 Lentiniková kyselina a její struktura

Yasumotem et al. (1971a) byla poprvé izolována a navržena chemická struktura prekursoru těkavých sloučenin v shiitake, nazvaná lentiniková kyselina. Bylo zjištěno, že je jedná o  $\gamma$ -glutamyl dipeptid obsahující celkem 4 atomy síry. Yasumoto et al. si ovšem nebyli jisti přesnou strukturou lentinikové kyseliny (**II**), konkrétně částí uvedenou na obrázku 12 v hranatých závorkách.



**Obrázek 12:** Navrhovaná struktura kyseliny lentinikové Yasumotem et al. (1971a) (**II**)

Teprve Höfle et al. (1976) správně určili úplnou strukturu lentinikové kyseliny (**III**). Lentiniková kyselina byla identifikována jako 2-( $\gamma$ -glutamylamino)-4,6,8,10,10-pentaoxo-4,6,8,10-tetrathioundekanová kyselina. Podle názvosloví IUPAC je její název: 2-amino-5-[[1-hydroxy-3-(methylsulfonylmethylsulfinylmethylsulfinylmethylsulfinyl)-1-oxopropan-2-yl]amino]-5-oxopentanová kyselina.



**Obrázek 13:** Struktura lentinikové kyseliny (**III**)

Lentiniková kyselina má sumární vzorec  $C_{12}H_{22}O_{10}N_2S_4$  a molekulovou hmotnost 482,57 g/mol. Jedná se o bílou krystalickou látku. Teplota tání této kyseliny je mezi 157–158 °C. Její strukturální vzorec ukazuje, že lentiniková kyselina obsahuje čtyři atomy síry v molekule, mimo jiné se třemi chirálními centry na sulfoxidových

skupinách. Celkem tedy tato sloučenina obsahuje 5 asymetrických center (3 sulfoxidové skupiny a 2  $\alpha$ -uhlíky).

Gmelin et al. (1980) uvedli, že lentiniková kyselina byla nalezena mimo *Lentinula edodes* ještě také v houbách špičce provrtané (*Micromphale perforans*, Hoffm., Gray) a penízovce věštické (*Collybia hariolorum*, De Candolle: Fries, Anton., Hall. & Noordel.). Špička provrtaná roste velmi hojně na opadaném jehličí a dosahuje výšky plodnice do 40 mm. Jedná se o nejedlou houbu. Penízovka věštická je též nejedlá houba dorůstající výšky do 50 mm. Roste hojně na humusu a rozkládajících se listech buků a bříz. (ANTONÍN, 2006)



*Micromphale perforans*

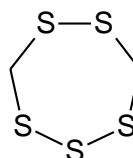


*Collybia hariolorum*

**Obrázek 14: Houby obsahující lentinikovou kyselinu**

### 2.7.2 Enzymově katalyzovaný rozklad lentinikové kyseliny

Hlavní složkou chuti a vůně shiitake je lentionin (1,2,3,5,6-pentathiepan, **IV**). Jedná se o cyklickou sirnou sloučeninu, která byla poprvé zjištěna v usušených houbách. Lentionin vzniká působením enzymů na lentinikovou kyselinu (**III**).



**Obrázek 15: Struktura lentioninu (IV)**

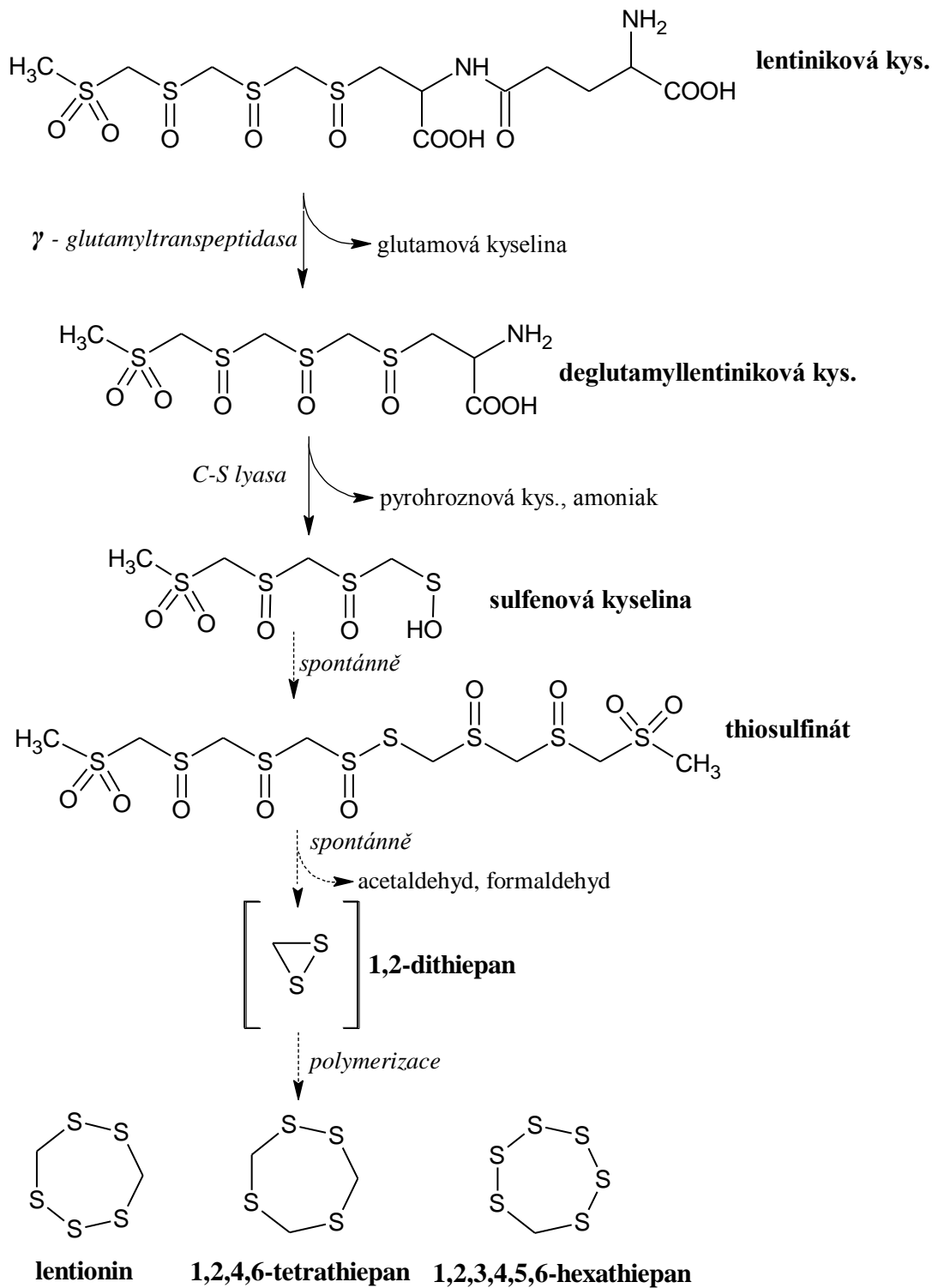
Na přeměně lentinikové kyseliny na lenthionin a další těkavé sirmé sloučeniny se podílejí dva enzymy:  $\gamma$ -glutamyltransferasa a C–S lyasa.  $\gamma$ -Glutamyltransferasa (EC 2.3.2.2) katalyzuje hydrolýzu a přenos glutamylové části molekuly lentinikové kyseliny za vzniku deglutamylentinikové kyseliny a C–S lyasa (EC 4.4.1.4) katalyzuje  $\beta$ -eliminaci deglutamylentinikové kyseliny (obrázek 16). (*IWAMI a YASUMOTO, 1980*)

Yasumoto et al. (1971a) studovali mechanismus enzymové tvorby lenthioninu, který je nositelem charakteristického aroma hub shiitake. Lentiniková kyselina se nejdříve přemění na deglutamylentinikovou kyselinu působením  $\gamma$ -glutamyltranspeptidasy, která katalyzuje nejpomalejší proces ve sledu reakcí vedoucích k tvorbě aroma shiitake. Vzniklá deglutamylentiniková kyselina je rozkládána na kyselinu pyrohroznovou,  $\text{NH}_3$  a thiosulfinát katalytickým působením C–S lyasy specifické pro houževnatec jedlý. Optimální hodnota pro enzymovou aktivitu  $\gamma$ -glutamyltranspeptidasy a C–S lyasy byla stanovena na pH kolem 9, což je hodnota významně vzdálená od pH homogenizované houby (pH 6,5). (*CHEN a HO, 1986b*)

Předpokládá se, že vzniklý thiosulfinát se spontánně rozkládá na celou řadu cyklických polysirných sloučenin včetně lenthioninu za současného uvolnění formaldehydu a acetaldehydu. To, zda formaldehyd vzniká uvolňováním za samovolné degradace thiosulfinátu, či působením nějakého enzymu, studovali Fujimoto et al. (1974), (viz 2.7.8 Formaldehyd v shiitake). Yasumoto et al. (1971b) uvádí, že z 3,3 molů lentinikové kyseliny se vytvoří 1 mol lenthioninu.

Hirasawa et al. (1999) uvedli, že lenthionin inhibuje růst Gram-pozitivních i Gram-negativních bakterií.

Lenthionin není přítomen v čerstvých houbách shiitake a jeho množství v sušených plodnicích se zvyšuje při řízené rehydrataci a vaření. Tento nárůst je výsledkem reakce mezi substrátem a enzymy, kterou způsobí rehydratace sušených hub shiitake. To znamená, že proces sušení hraje klíčovou roli v produkci vonných látek. Obsah lenthioninu a lentinikové kyseliny se může v plodnicích měnit v průběhu sušení a rehydratačních procesů. (*HIRAIDE, 2010a*) Ito (1978) poznamenal, že v sušených houbách shiitake byl výskyt lenthioninu také ovlivněn hodnotou pH a teplotou při rehydrataci sušených hub. (*CHEN, 1986b*)



Obrázek 16: Mechanismus tvorby lentioninu z lentinikové kyseliny (YASUMOTO et al., 1974)



### 2.7.3 $\gamma$ -Glutamyltransferasa

$\gamma$ -Glutamyltransferasa se vyskytuje ve zvlášť vysoké míře v podpovrchové části klobouků plodnic shiitake. Dojde-li k porušení pletiva klobouku, enzym se dostane do styku se substrátem, kterým je lentiniková kyselina, a vzniká deglutamyl-lentiniková kyselina. (IWAMI a YASUMOTO, 1982)

$\gamma$ -Glutamyltransferasa z *LE* sdílí mnoho vlastností podobných s  $\gamma$ -glutamyltransferasou z prasečích ledvin. Přesto se však tyto dva enzymy jeví jako odlišné. Na rozdíl od živočišné  $\gamma$ -glutamyltransferasy je  $\gamma$ -glutamyltransferasa z *LE* vysoce rezistentní vůči působení proteolytických enzymů a je výrazně aktivována v přítomnosti chaotropních aniontů.

Iwami a Yasumoto (1982) zkoumali, zda  $\gamma$ -glutamyltransferasa z *LE* má odlišnou substrátovou specifitu ve srovnání s  $\gamma$ -glutamyltransferasou izolovanou z prasečích ledvin. Kinetická analýza ukázala, že substrátová specifita obou enzymů je poměrně vysoká. Zjistilo se, že lentiniková kyselina je prakticky inertní substrát pro  $\gamma$ -glutamyltransferasu izolovanou z prasečích ledvin, z toho vyplývá, že lentiniková kyselina nemusí být tak rychle metabolizována ve zvířecích organismech, jako ostatní  $\gamma$ -glutamylpeptidy. Je známé, že  $\gamma$ -glutamyltransferasy vyskytující se v různých tkáních určitého živočišného druhu mají podobnou relativní aktivitu vůči různým substrátům. Proto bude lentiniková kyselina také v malé míře podléhat působení živočišných  $\gamma$ -glutamyltransferas. Žádné významné riziko, jako důsledek konzumace shiitake však dosud nebylo identifikováno. Může to také znamenat, že lentiniková kyselina nepodléhá v lidském těle žádným metabolickým přeměnám. (IWAMI a YASUMOTO, 1982)

$\gamma$ -Glutamyltransferasa funguje dvěma způsoby. Prvním je katalýza hydrolýzy  $\gamma$ -glutamylové vazby v lentinikové kyselině vedoucí ke vzniku deglutamyl-lentinikové kyseliny. U thiosulfonátu vznikajícího z následného působení C-S lyasy na deglutamyl-lentinikovou kyselinu bylo prokázáno, že má značný účinek proti mnoha druhům bakterií. Houbová  $\gamma$ -glutamyltransferasa je tedy schopna iniciovat mechanismus obrany houby proti mikrobiální infekci poraněné části klobouku.

Druhým způsobem působení  $\gamma$ -glutamyltransferasy je katalýza transpeptidasové reakce. Je tedy pravděpodobné, že  $\gamma$ -glutamyltransferasa se podílí na syntéze lentinikové kyseliny během vývoje plodnic shiitake. (IWAMI a YASUMOTO, 1982)

#### 2.7.4 C–S lyasa

Sneeden et al. (2004) uvedli, že obsah C–S lyasy v shiitake je přibližně desetkrát nižší než obsah C–S lyasy (alliinasy) v česneku. Dále uvedli, že štěpení deglutamylmentinikové kyseliny pomocí C–S lyasy v shiitake je zpočátku rychlé, přestane po krátké době a ještě dříve, než je rozklad deglutamylmentinikové kyseliny úplný, thiosulfonát a další produkty inhibují činnost C–S lyasy. Je tedy nepravděpodobné, že by těkavé sloučeniny vznikající z lentinikové kyseliny působily jako repelentní prostředek proti býložravcům, jako je tomu u např. u česneku.

#### 2.7.5 Těkavé sírné sloučeniny v *Lentinula edodes*

Chen et al. (1986a) identifikovali celkem 18 necyklických a cyklických těkavých sírných sloučenin z hub shiitake, z toho byly některé identifikované vůbec poprvé. Hlavními sírnými látkami identifikovanými v homogenátu hub byly lentionin, 1,2,3,5-tetrathian a 1,2,4-trithiolan.

Sirouhlík, dimethyltrisulfid; 1,2,4-trithiolan; 1,2,4,5-tetrathian; 1,2,3,5-tetrathian a lentionin byly zjištěny jako dominantní sírné sloučeniny v pufrovaném homogenátu houby shiitake o pH 9,0. Zajímavostí je, že izomery 1,2,4,5-tetrathianu a 1,2,3,5-tetrathianu byly nalezeny i v červené řase *Chondria californica* (kmen Rhodophyta–ruduchy). Spolu s 1,2,4-trithiolanem, 1,2,4,6-tetrathiepanem a lentioninem mají houby shiitake s červenými řasami společných pět sírných sloučenin. Je tedy možné, že tyto dva různé druhy organismů obsahují lentinikovou kyselinu jako prekurzor těchto látek. (CHEN a HO, 1986b)

Všechny uvedené sírné sloučeniny, s výjimkou sirouhlíku, ve svých strukturách obsahují skupiny  $-\text{CH}_2\text{S}-$  nebo  $-\text{SCH}_2\text{S}-$ . Funkční skupina  $-\text{SCH}_2\text{S}-$  je podobná 1,2-dithiepanu, předpokládanému prekurzoru těchto látek. (CHEN a HO, 1986b)

Je však možné, že všechny sírné látky identifikované v enzymové reakční směsi mohly být produkty rozkladu lentioninu nebo 1,2,4-trithiolanu. Lze předpokládat, že chemické reakce, jako je polymerace 1,2-dithiepanu, mohou být převládající v závěrečné fázi vzniku sírných sloučenin. 1,2-Dithiepan je považován za důležitý meziprodukt při polymeraci uvedených sloučenin síry. Vznik 1,2-dithiepanu může nastat pomocí enzymatických procesů nebo chemickým procesem. (CHEN a HO, 1986b)

Těkavé sloučeniny síry vznikající z lentinikové kyseliny lze rozdělit podle počtu atomů uhlíku na čtyři hlavní skupiny obsahující 1, 2, 3 a 6 atomů uhlíku.

***Rozdělení sirných sloučenin nacházejících se v shiitake (CHEN et al., 1986a):***

***jednouhlíkaté sirné sloučeniny:***

$\text{CH}_3\text{SH}$	$\text{CS}_2$	$\text{CH}_3\text{SSH}$	$\text{HSCH}_2\text{SH}$
<b>methanthiol</b>	<b>sirouhlík</b>	<b>hydrogen(methyl)disulfid</b>	<b>methandithiol</b>

***dvouuhlíkaté sirné sloučeniny:***

$\text{CH}_3\text{SSCH}_3$	$\text{CH}_3\text{SSSCH}_3$	$\text{CH}_3\text{SSSSCH}_3$
<b>dimethyldisulfid</b>	<b>dimethyltrisulfid</b>	<b>dimethyltetrasulfid</b>



**1,3-dithietan**



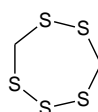
**1,2,4-trithiolan**



**1,2,4,5-tetrathian**





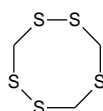
**1,2,3,5-tetrathian**



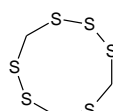
**lentionin**

***tříuhlíkaté sirné sloučeniny:***

$\text{CH}_3\text{SSCH}_2\text{SSCH}_3$		
<b>2,3,5,6-tetrathiaheptan</b>	<b>1,3,5-trithian</b>	<b>1,2,4,6-tetrathiepan</b>



**1,2,4,5,7-pentathiokan**



**1,2,3,5,6,8-hexathionan**

***šestiuhlíkatá sloučenina:***

$\text{CH}_3\text{SSCH}_2\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{SCH}_2\text{SSCH}_3$
<b>2,3,5,8,10,11-hexathiadodekan</b>

### 2.7.6 Ostatní těkavé sloučeniny *Lentinula edodes*:

Rostliny a houby bohaté na síru, jako dobře prostudované rostliny rodu *Allium* (česnekovité: cibule, pažitka, česnek atd.), houby čeledě Tricholomataceae (čirůvkovité–hlíva atd.) a čeledě Marasmiaceae (špičkovité–houževnatec atd.), jsou známé pro své kulinářské hodnoty a jejich využití v tradiční medicíně. Látky zodpovědné za štiplavou chuť a aroma rostlin rodu *Allium* slouží pravděpodobně k jejich obraně při napadení. Tyto látky vznikají po narušení buněk, kdy se tvoří komplexní sirné sloučeniny z netěkavých prekurzorů. I když se sirné sloučeniny rostlin rodu *Allium* od sebe značně liší ve struktuře a reaktivitě, prekurzory všech těchto látek jsou *S*-substituované deriváty cysteinu. Předpokládá se, že u hub čeledě Tricholomataceae a čeledě Marasmiaceae je úzká související biochemie vzniku česneku podobného zápachu. (SNEEDEN *et al.*, 2004)

Čerstvé houby shiitake obsahují velmi malé množství těkavých látek. Těkavé sloučeniny hub shiitake lze rozdělit do dvou skupin. První skupinu tvoří sirné sloučeniny a druhou pak alkoholy, které mají osm uhlíků. Rozdíl v aroma u sušených a čerstvých shiitake je značný. U čerstvých hub převládá okt-1-en-3-ol, který se vyznačuje silnou, nasládlou, zemitou vůní s nádechem levandule, růže a sena. V sušených houbách převládá lentionin a 1,2,4-trithiolan. (WU a WANG, 2000)

Mezi hlavní osmiuhlíkaté sloučeniny vyskytující se v shiitake patří okt-1-en-3-ol a okt-2-en-1-ol, dále pak: oktan-3-on, oktan-3-ol, oktan-1-ol a oktan-1-en-3-on. Tvorba osmiuhlíkatých sloučenin je výsledkem enzymové aktivity během mechanického narušování nebo při sušení. Tyto sloučeniny jsou tvořeny enzymaticky oxidací kyseliny linolové. (WU a WANG, 2000)

Wu a Wang (2000) měřili obsah těkavých sloučenin v nakrájených čerstvých a nadrcených usušených shiitake během tří hodin. Těkavé sloučeniny jako dimethyldisulfid, okt-1-en-3-ol, oktan-3-on a dimethyltrisulfid byly získány z čerstvých krájených shiitake. Tyto sloučeniny vznikly zřejmě enzymaticky, a to reakcí vyvolanou nařezáním vzorků hub, a jejich obsah prudce klesal v průběhu sledovaného období. Obsah těkavých látek v drcených sušených shiitake byl až 4000× větší v porovnání s čerstvými krájenými houbami. Všechny těkavé látky pravděpodobně vznikly z enzymaticky katalyzovaných reakcí iniciovaných především rozdrčením vzorků. Zpočátku nejvíce obsažený okt-1-en-3-ol se postupem času začal snižovat, ale množství

oktan-3-onu, dimethyldisulfidu a dimethyltrisulfidu se během zkoušené doby zvyšovalo.

Ovšem Sneedeen et al. (2004) uvedli, že u hub shiitake nedochází k větším změnám ve složení sloučenin, reakcí na poškození buněk. Nepozorovali žádné změny v sirném spektru po inkubaci tkáně plodnic při pokojové teplotě po dobu delší než 24 h. Dále různé úpravy typu strouhání, drcení nebo vaření v mikrovlnné troubě údajně nevedly k významným změnám sirného spektra, což naznačuje, že k žádným změnám sirných sloučenin vyskytujících se v shiitake houbách nedošlo, a sirné sloučeniny vyskytující se v shiitake jsou tedy pozoruhodně stabilní.

### **2.7.7 Vliv pH hodnoty na tvorbu těkavých látek v *Lentinula edodes***

Dříve bylo popsáno, že tvorba těkavých látek v houbách je ovlivněna enzymovou aktivitou, ale vztah mezi hodnotou pH a těkavými látkami v houbách nebyl zatím zkoumán. Chen et al. (1984) analyzovali ve svém výzkumu těkavé látky tvořené při pH 4,0–9,0. Zjistili, že utváření osmiuhlíkatých sloučenin dosáhne nejvyššího bodu kolem pH 5,0 až 5,5. Sloučenina okt-1-en-3-ol byla nejvýznamnější vzniklá sloučenina. Formování sirných sloučenin začíná při pH 5,5 a dosahuje nejvyšších hodnot v okolí pH 7,0. Uvedl též, že dimethyldisulfid a dimethyltrisulfid jsou dvě nejhojněji se tvořící sloučeniny. (CHEN et al., 1984)

### **2.7.8 Formaldehyd v *Lentinula edodes***

Již asi před 40 lety byl objeven vysoký obsah formaldehydu (HCHO) v houbách shiitake. Obsah v čerstvých shiitake byl stanoven na 8–24 ppm a v sušených shiitake 100–230 ppm. Během růstu houby byl obsah formaldehydu konstantní, ale po sklizni jeho obsah vzrostl 3× až 4× během sušení. Tyto hodnoty byly pozoruhodně vysoké v porovnání s jinými jedlými houbami. (FUJIMOTO et al., 1974)

Byl zjišťován vliv enzymu na tvorbu formaldehydu v shiitake. Byl připraven homogenát hub shiitake, který byl rozdělen na dva podíly. První podíl byl inkubován při 37 °C a obsah formaldehydu v něm dosáhl maxima po 2–3 h po inkubaci a pak se postupně snižoval. U druhého podílu homogenátu, u kterého byly enzymy inaktivovány

teplem, zůstal obsah formaldehydu beze změn. Následnými pokusy bylo zjištěno, že formaldehyd v shiitake opravdu vzniká enzymaticky. Na základě dalšího zkoumání byl odhalen prekurzor formaldehydu v shiitake, jednalo se opět o kyselinu lentinikovou. Je pravděpodobné, že formaldehyd vzniká spontánním rozkladem thiosulfínátu (obrázek 16). Optimální pH pro tvorbu formaldehydu se pohybovalo mezi pH 9 a 10 a aby došlo k inaktivaci enzymu, bylo by nutné zahřívání vzorků po dobu 20 min při 60 °C nebo 5 minut při 80 °C. Je však pravděpodobné, že během tepelného zpracování při přípravě pokrmů z shiitake se bude téměř všechen formaldehyd odpařovat. Tudíž množství formaldehydu, které se dostane konzumací hub do těla, bude velmi malé. (*FUJIMOTO et al., 1974*)

### 3 Cíle práce

Cílem diplomové práce v teoretické části bylo stručně charakterizovat houbu *Lentinula edodes*, předložit přehled typů pěstování a produkce této houby ve světě, uvést účinky její konzumace na lidský organismus a popsat sloučeniny nacházející se popř. vznikající v shiitake.

V experimentální části byly hlavními cíly:

- izolace lentinikové kyseliny ze shiitake a optimalizace postupu její izolace;
- vyvinutí analytické metody umožňující stanovení lentinikové kyseliny v reálných vzorcích;
- izolace těkavých látek vznikajících při zpracování shiitake a jejich analýza pomocí plynové chromatografie.

## 4 Experimentální část

### 4.1 Získávání vzorků hub

V diplomové práci byly zkoumány dva druhy vzorků hub shiitake, oba byly získány čerstvé a uchovávány v mrazáku při teplotě  $-28\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Vzorky byly získány od dvou různých dodavatelů. Jeden byl zakoupen v srpnu 2010 v Praze-Satalicích od společnosti Samyco, spol. s r.o., (<http://www.samyco.cz/>), která tyto houby pěstovala přímo ve svém areálu. Tento vzorek byl používán pro izolaci lentinikové kyseliny i další experimenty. Druhý vzorek hub byl zakoupen v Nedvědicích u Soběslavi od společnosti České houby a.s., (<http://www.ceskehouby.cz/>) v říjnu 2011. Tyto houby byly použity ke zjištění obsahu lentinikové kyseliny. Dle dostupných informací byl tento vzorek hub importován z Polska.

### 4.2 Použité chemikálie, pomůcky a přístroje

#### 4.2.1 Použité chemikálie

Aceton: 99,5 %, amoniak: 25–29 %, chlorovodíková kyselina: 35 %, diethylether: 99,7 %, octan amonný: 98,5 %, zakoupené od společnosti Penta; acetonitril: 99,8 %, J. T. Baker; anex DEAE Sephadex A-25 (Cl<sup>-</sup>), Sigma; dansylchlorid: 98 %, ACROS Organics; dihydrogenfosforečnan draselný: 99 %, Lachema a.s.; methanol: 99,5 %, ninhydrin, octová kyselina: 99,8 %, síran hořečnatý bezvodý: 99,0 %, trihydrogenfosforečná kyselina: 85 %, zakoupené od společnosti Lach-Ner s r.o.; tetraboritan disodný: 99,5 %, katex Amberlite IR-120 (zrnění 16–50 mesh), zakoupené od společnosti Fluka;  $\gamma$ -(4-nitroanilid)-L-glutamová kyselina, p.a., Fisher Scientific.

#### 4.2.2 Použité pomůcky a přístroje

Aparatura Likers-Nickersonova; centrifuga, Sigma 2-15; centrifugační zkumavky, 30 ml, Nalgene; jednorázová injekční stříkačka, 1ml, NORM-JECT;



magnetické míchadlo, IKA<sup>®</sup> RCT basic; mixer mixxo quattro 600W, Bosch; parafilm „M“, Pechiney Plastic Packaging; pH metr - A1, Altec; lyofilizátor, CHRIST-ALPHA 1-2; rotační vakuová odparka, Heidolph Laborata 4000 efficient; stříkačkový PTFE mikrofiltr, 0,45 µm, Fisher Scientific; topné hnízdo – LTHS, Brněnská Drutěva; váhy Precisa 160M; váhy Kern PCB.

Dále chromatografy:

chromatograf HPLC/DAD : Varian Pro Star

- vysokotlaká pumpa Varian ProStar 210
- DAD detektor Varian ProStar 210
- kolona: Varian Microsorb–MV 100-5 C8 (250 × 4,6 mm, 5 µm)
- kolona: Varian Microsorb–MV 100-5 C18 (250 × 4,6 mm, 5 µm)
- dávkovací mikrostříkačka Hamilton, 25µl, Varian

chromatograf plynový: Varian 3800

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

## 4.3 Analytické metody a postupy

### 4.3.1 Izolace lentinikové kyseliny

Lentiniková kyselina byla izolována z čerstvých zamražených hub. Vzorek zmražených hub (3,45 kg) byl namočen v trojnásobném množství 100 % methanolu s 0,5 % HCl (cca 9 l) a nechán minimálně 6 hodin macerovat při laboratorní teplotě. Po šesti hodinách byl tento vzorek homogenizován mixerem asi 3 minuty a výsledná homogenní směs byla uschována v ledničce do druhého dne. Homogenní směs byla druhý den vařena 15 minut pod zpětným chladičem, následovala filtrace přes tkaninu a takto byl získán první filtrát. Filtrační koláč byl znovu homogenizován se 3 l směsí methanolu s HCl a znovu povařen a filtrován, takto byl získán druhý filtrát. Oba filtráty byly spojeny a následně odpařeny na rotační vakuové odparce (při teplotě < 40 °C). Výsledný roztok byl centrifugován 10 min (12000 otáček/min). Po centrifugaci

následovala extrakce diethyletherem, poměr přidávaného diethyletheru k výluhu z hub byl 1:2,5. Extrakce byla prováděna dvakrát.

Z výsledného extraktu byl odpařen diethylether na rotační vakuové odparce (při teplotě < 40 °C) a dále bylo upraveno jeho pH na hodnotu 3,0 pomocí NH<sub>3</sub>. Následovalo nanášení daného extraktu na kolonu katexu Amberlite IR-120 (18,8×3 cm), nanesený vzorek se nechal protéci, dále byla kolona promývána vodou (300 ml) a nakonec byla vymyta NH<sub>3</sub> o koncentraci 1 mol/l. Během promývání byla sledována pozitivní zkouška na přítomnost aminokyseliny pomocí ninhydrinu. Po katexu byl vzorek nanesen na anex DEAE Sephadex A-25 (15 × 3 cm), vzorek se nechal protéci, dále byla kolona promývána vodou (300 ml) a nakonec vymývána 150 ml kyseliny octové v postupných koncentracích: 1 %, 1,5 %, 2 %, 2,5 %, 3 %, 3,5 %, 4 %, 4,5 %, 5 % a 10 %. Od každé koncentrace byly jímány dvě frakce po cca 75 ml (frakce byly označeny číslem odpovídajícím koncentraci kyseliny octové a písmeny A a B), u kterých bylo prováděno měření pH a zkouška na přítomnost aminokyselin pomocí ninhydrinu. Získané hodnoty byly zaznamenány do tabulky 4.

**Tabulka 4: Získané hodnoty po anexu DEAE Sephadex**

	Kyselina octová (%)										
	0,5	1,0	1,5	2,0	2,5	3,0	3,5	4,0	4,5	5,0	10
<b>A pH</b>	3,35	3,00	2,63	2,55	2,46	2,40	2,34	2,30	2,27	2,22	2,16
<b>intenzita</b>	ne	ne	ano +	ano +	ano ++	ano +	ano +	ano +	ano +	ano +	ano +
<b>B pH</b>	3,35	2,73	2,63	2,50	2,43	2,35	2,30	2,26	2,22	2,22	
<b>intenzita</b>	ne	ne	ano +++	ne	ano +++	ano +	ne	ano +	ano +	ano +	

Frakce byly po přefiltrování mikrofiltrem (0,45 μm) analyzovány na kapalinovém chromatografu s detektorem diodového pole (DAD).

Ke stanovení přítomnosti lentinikové kyseliny v jednotlivých frakcích byla použita analytická kolona Varian Microsorb–MV 100-5 C8 (250 × 4,6mm). Jako mobilní fáze byl použit KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> o koncentraci 25mmol/l, u kterého bylo upraveno pH na 3,0 pomocí koncentrované H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>. Analýza byla prováděna za těchto podmínek:

Mobilní fáze:

- A roztok: 25 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> o pH = 3,0
- B roztok: 99,8 % acetonitril
- průtok: 0,8 ml/min

- detekce: 220 nm
- doba analýzy: 20 min

Tabulka 5: Složení mobilní fáze

mobilní fáze	čas (min)				
	0	6	12	17	20
A (%)	98	98	10	10	98
B (%)	2	2	90	90	2

Lentiniková kyselina byla detekována pouze ve frakcích eluovaných 5 a 10% kyselinou octovou, které byly označeny jako roztoky 5A, 5B a 10A (viz tabulka 4). Tyto frakce byly spojeny a přečištěny aktivním uhlím. Následně byl tento extrakt lyofilizován. Po ukončení lyofilizace byly získány bílé krystalky lentinikové kyseliny.

### 4.3.2 Stanovení lentinikové kyseliny v reálných vzorcích

#### 4.3.2.1 Sestavení kalibrační křivky lentinikové kyseliny

Pro kvantifikaci lentinikové kyseliny ve vzorcích byla sestavena kalibrační křivka z dostupných standardů: izolované lentinikové kyseliny a vnitřního standardu  $\gamma$ -(4-nitroanilid)-L-glutamové kyseliny. Pro přípravu kalibrační křivky byly třeba tyto chemikálie: derivatizační činidlo dansylchlorid, pufr  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$  (20 mM, pH=9,2), kyselina lentiniková a vnitřní standard  $\gamma$ -(4-nitroanilid)-L-glutamová kyselina. Dansylchlorid se připravil rozpuštěním 27 mg dansylchloridu v 10 ml acetonitrilu. Borátový pufr (20 mM) se připravil rozpuštěním 762,7 mg  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$  ve 100 ml destilované vody. U tohoto roztoku bylo upraveno pH pomocí kyseliny  $\text{H}_3\text{PO}_4$  na hodnotu 9,2. Standard lentinikové kyseliny byl připraven o koncentraci 3 mmol/l rozpuštěním 14,5 mg izolované lentinikové kyseliny v 10 ml destilované vody. Zásobní roztok vnitřního standardu byl připraven o koncentraci 7 mmol/l rozpuštěním 20 mg  $\gamma$ -(4-nitroanilid)-L-glutamové kyseliny v 10 ml destilované vody okyselené 3 kapkami koncentrované HCl. Při přípravě kalibrační křivky byly roztoky výše zmíněných sloučenin míchány v množství uvedeném v tabulce 6, a to vždy v sérii po třech vzorcích se stejnou koncentrací.

Tabulka 6: Míchání roztoků na kalibrační křivku

	lentiniková kyselina	vnitřní standard	dansylchlorid	tetraboritan disodný	destilovaná voda
	$\mu\text{l}$	$\mu\text{l}$	$\mu\text{l}$	$\mu\text{l}$	$\mu\text{l}$
1	200	100	400	400	300
2	250	100	400	400	250
3	300	100	400	400	200
4	350	100	400	400	150
5	400	100	400	400	100
6	450	100	400	400	50

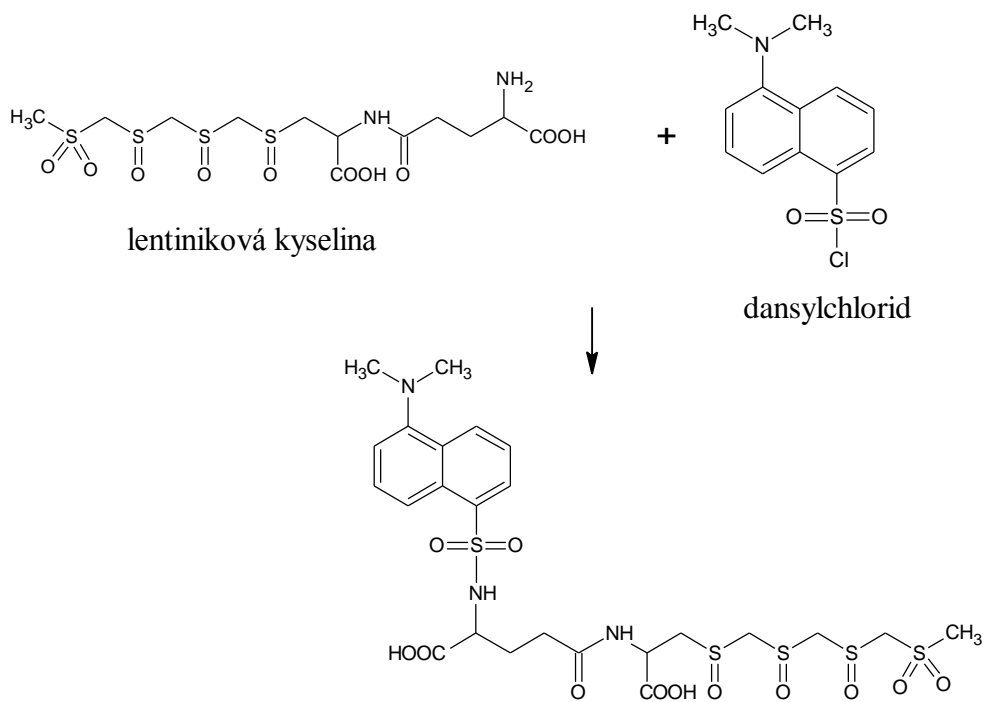
Po smíchání všech chemikálií ve vialce byly tyto kalibrační roztoky nechány 30 minut stát při laboratorní teplotě, přičemž docházelo k derivatizaci. Mechanismus derivatizace je uveden na obrázku 17. Po uplynutí 30 minutového intervalu byly všechny vzorky po přefiltrování mikrofiltrem (0,45  $\mu\text{m}$ ) jednotlivě analyzovány na kapalinovém chromatografu s DAD detekcí. Analýza byla prováděna za těchto podmínek:

Mobilní fáze:

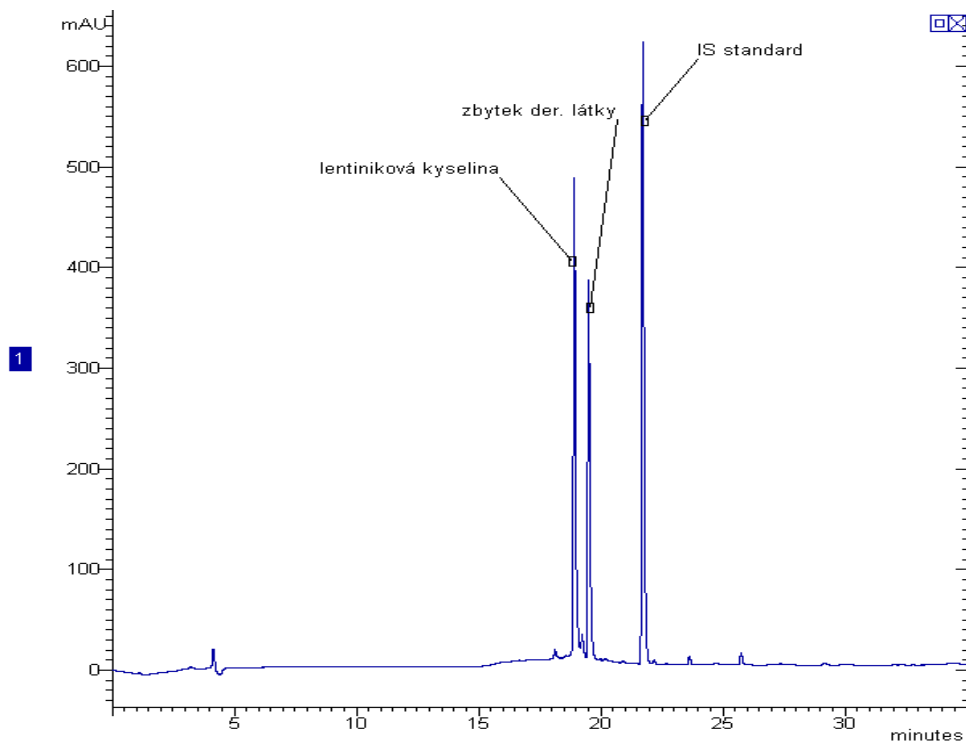
- A roztok: 50 mM  $\text{CH}_3\text{COONa}$  o pH = 5,0
- B roztok: 99,8 % acetonitril
- průtok: 0,9 ml/min
- detekce: 265 nm
- doba analýzy: 35 min

Tabulka 7: Složení mobilní fáze

mobilní fáze	čas (min)				
	0	10	25	30	35
A (%)	95	95	15	15	95
B (%)	5	5	85	85	5



Obrázek 17: Mechanismus průběhu derivatizace lentinikové kyseliny



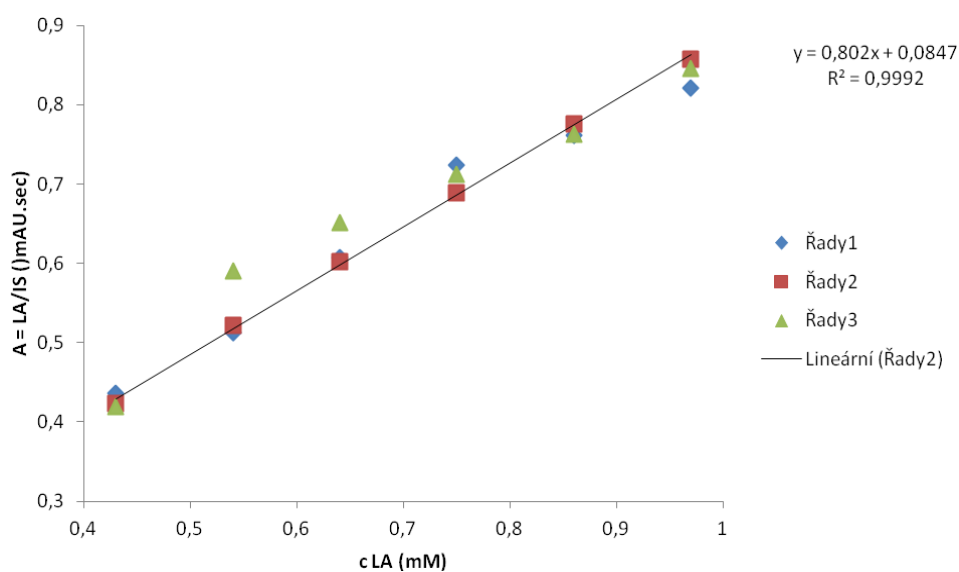
Obrázek 18: HPLC chromatogram derivatizované lentinikové kyseliny

Z dat získaných z kapalinového chromatografu (viz tabulka 8) byla sestavena kalibrační křivka, která je uvedena v grafu 2. Na osu x byly vynášeny jednotlivé koncentrace proměřované lentinikové kyseliny v mmol/l (mM). Na osu y byly vynášeny poměry ploch píků lentinikové kyseliny a vnitřního standardu.

**Tabulka 8: Tabulka hodnot pro sestavení kalibrační křivky**

	koncentrace LA mM	plocha píku LA mAU.sec	plocha píku IS mAU.sec	poměr LA/IS
1	0,43	1543	3540	0,4359
	0,43	1482	3506	0,4227
	0,43	1439	3436	0,4188
2	0,54	1911	3728	0,5126
	0,54	1791	3431	0,5220
	0,54	2025	3431	0,5902
3	0,64	2192	3606	0,6079
	0,64	2111	3509	0,6016
	0,64	2335	3588	0,6508
4	0,75	2771	3825	0,7244
	0,75	2736	3971	0,6890
	0,75	2636	3698	0,7128
5	0,86	2883	3788	0,7611
	0,86	2854	3680	0,7755
	0,86	2721	3569	0,7624
6	0,97	2989	3641	0,8209
	0,97	3031	3533	0,8579
	0,97	2979	3521	0,8461

**Graf 2: Kalibrační křivka**



#### 4.3.2.2 Stanovení obsahu lentinikové kyseliny v reálných vzorcích

Obsah lentinikové kyseliny byl stanoven a porovnáván u dvou vzorků hub shiitake, oba byly v čerstvém zmraženém stavu. Od obou vzorků bylo naváženo 20 g hub, ty byly smíchány s 1 ml roztoku  $\gamma$ -(4-nitroanilid)-L-glutamové kyseliny o koncentraci 7 mg/ml a se 60 ml 100% methanolu s 0,5% HCl. Poté byly tyto vzorky postupně homogenizovány mixerem asi 3 minuty a výsledné homogenní směsi byly filtrovány přes tkaninový filtr. Po filtraci následovalo odpaření methanolu na vakuové odparce. Dále bylo upraveno pH na hodnotu 9,0 pomocí koncentrovaného amoniaku. Výsledné roztoky byly centrifugovány 10 min (12000 otáček/min). Po centrifugaci následovala extrakce diethyletherem, poměr přidávaného diethyletheru k výluhu z hub byl 1:2,5. Extrakce byla prováděna dvakrát a následně byl odpařen přebytečný diethylether. Posléze byly tyto extrakty derivatizovány smícháním 200  $\mu$ l vzorku se 400  $\mu$ l dansylchloridu a 600  $\mu$ l  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$  pufru. Po uplynutí 30 minutového intervalu byly všechny vzorky přefiltrovány mikrofiltrem (0,45  $\mu$ m) a jednotlivě analyzovány na kapalinovém chromatografu s DAD detekcí. Analýza byla prováděna za podmínek uvedených v 4.3.2.1.

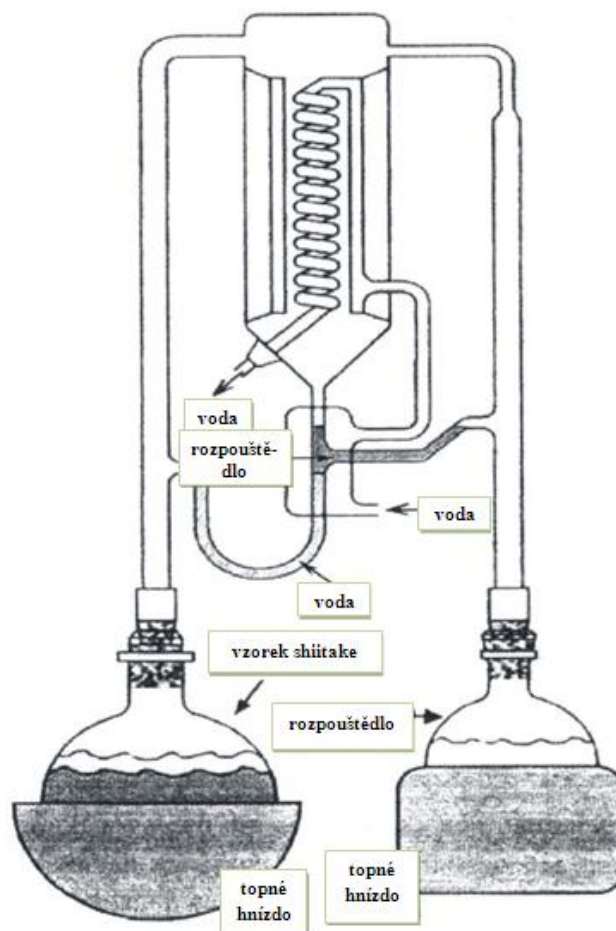
#### 4.3.3 Stanovení obsahu těkavých látek

##### 4.3.3.1 Stanovení obsahu těkavých látek pomocí Likers-Nickersonovy aparatury

Na toto stanovení bylo použito 150 g čerstvých zamražených hub, které se smísilo s 300 ml destilované vody a homogenizovalo mixerem. Vzniklý homogenát byl převeden do 1l reakční baňky s kulatým dnem a ponechán 30 min stát při laboratorní teplotě. Mezi tím se sestavila Likers-Nickersonova aparatura a do jedné reakční baňky bylo dáno 200 ml diethyletheru. Následně byla reakční baňka umístěna do topného hnízda a spojena s aparaturou, která byla obalena vatou a alobalem. Obsah baňky byl míchán magnetickým míchadlem a postupně přiveden k varu. Po zahřátí celé aparatury bylo spuštěno i zahřívání reakční baňky s diethyletherem a varnými kamínky. Od začátku varu obou roztoků se nechaly roztoky 3 hodiny vařit. Po třech hodinách se vypnula topná hnízda a aparatura se nechala vychladnout. Roztok s diethyletherem byl zbaven přebytečné vody pomocí bezvodého síranu hořečnatého. Dále byl tento roztok

přefiltrován a odpařen na vakuové odparce ( $< 30\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Takto získaný extrakt byl analyzován na plynovém chromatografu, nástřik činil  $1\text{ }\mu\text{l}$ . Analýza byla prováděna za těchto podmínek:

- nosný plyn: He
- průtok nosného plynu:  $1,3\text{ ml/min}$
- nástřik splitem: 1:30
- ionizace: elektronová,  $70\text{ eV}$
- teplota při analýze:
  - $0\text{--}3\text{ min} \rightarrow 40\text{ }^{\circ}\text{C}$
  - dále zvyšování teploty o  $4\text{ }^{\circ}\text{C/min}$  až do  $240\text{ }^{\circ}\text{C}$
  - teplota  $240\text{ }^{\circ}\text{C}$  držena  $5\text{ min}$
- teplota detektoru:  $250\text{ }^{\circ}\text{C}$
- doba analýzy:  $60\text{ min}$



Obrázek 19: Likens-Nickersonova aparatura



#### 4.3.3.2 Stanovení obsahu těkavých látek přímou extrakcí

Bylo smícháno 150 g čerstvých zamražených hub s 300 ml destilované vody a homogenizováno mixerem. Homogenát byl nechán 30 min odstát a poté u něj bylo změřeno  $\text{pH} = 6,34$ . Tento homogenát byl filtrován přes tkaninu a následovala extrakce diethyletherem třikrát po 300 ml. Tento roztok byl dále zbaven vody bezvodým síranem hořečnatým, znovu filtrován a následně zbaven diethyletheru na vakuové odparce. Výsledný extrakt byl analyzován na plynovém chromatografu stejnou metodou jako v kapitole 4.3.3.1.

#### 4.3.3.3 Stanovení obsahu těkavých látek extrakcí po úpravě pH

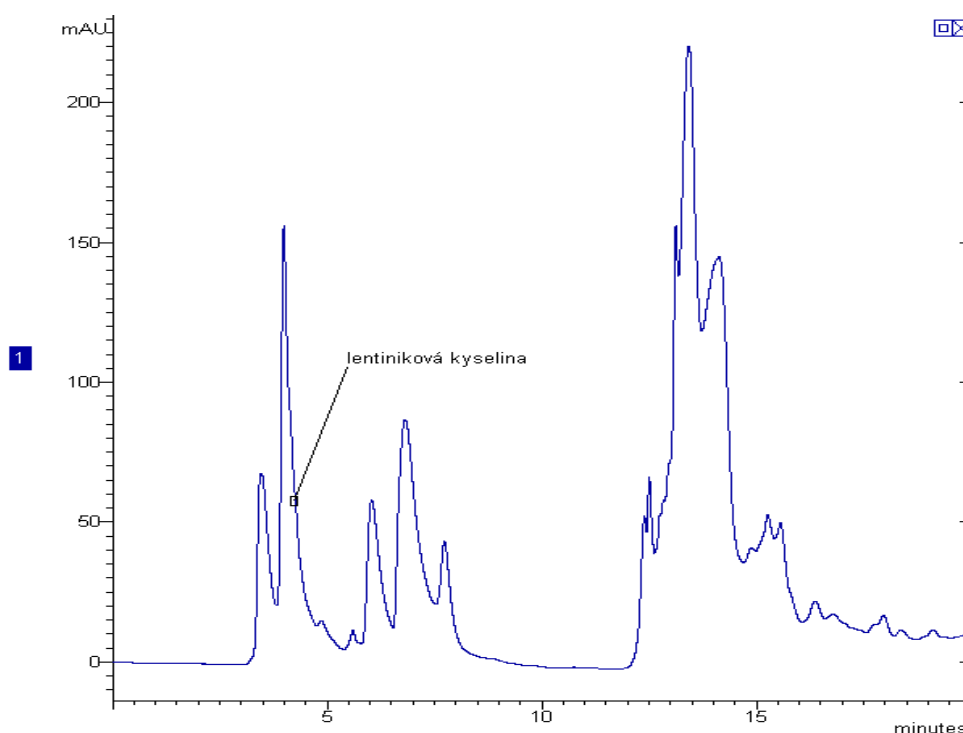
Při tomto stanovení bylo opět smícháno 150 g čerstvých zamražených hub s 300 ml destilované vody a homogenizováno mixerem. Po homogenizaci bylo změřeno  $\text{pH}$  ( $\text{pH} = 6,32$ ) a upraveno pomocí hydroxidu sodného o koncentraci 0,1 mol/l na hodnotu  $\text{pH} = 9,0$ . Homogenát byl nechán 30 min stát při laboratorní teplotě, přičemž hodnota  $\text{pH}$  klesla na 8,36. Dále byla provedena extrakce diethyletherem třikrát po 300 ml. Extrakt byl zbaven vody bezvodým síranem hořečnatým, následovala filtrace a odpaření na vakuové odparce ( $< 30\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Výsledný extrakt byl analyzován na plynovém chromatografu stejnou metodou jako v kapitole 4.3.3.1.

## 5 Výsledky a diskuse

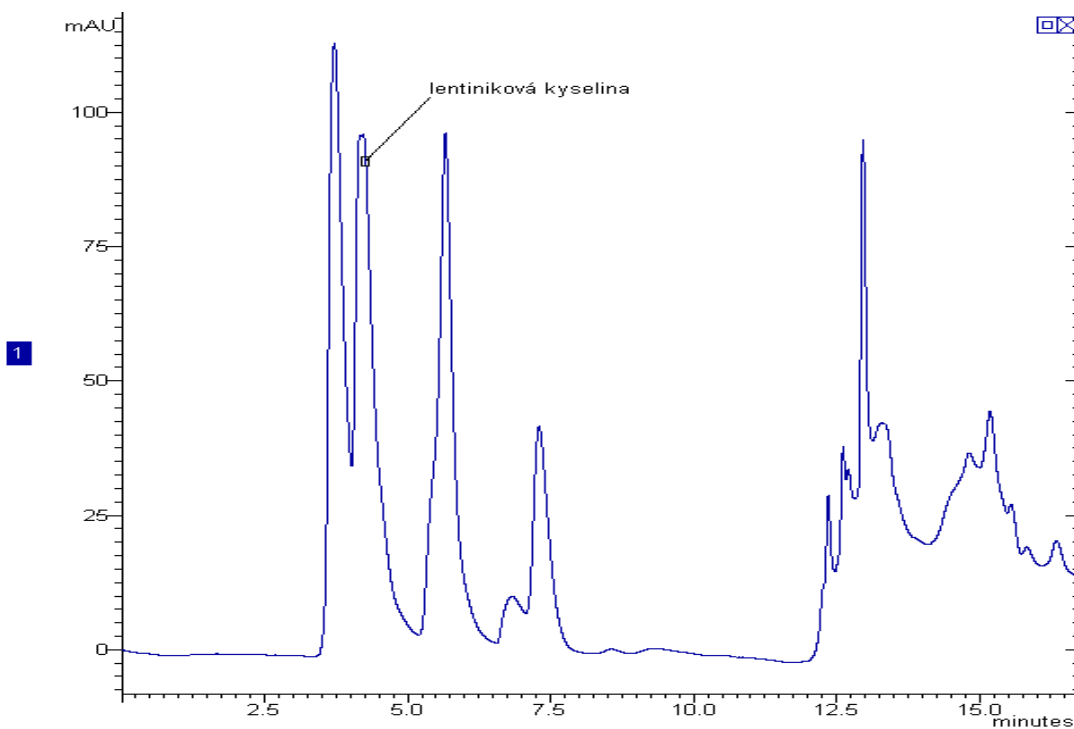
### 5.1 Lentiniková kyselina

#### 5.1.1 Izolace lentinikové kyseliny

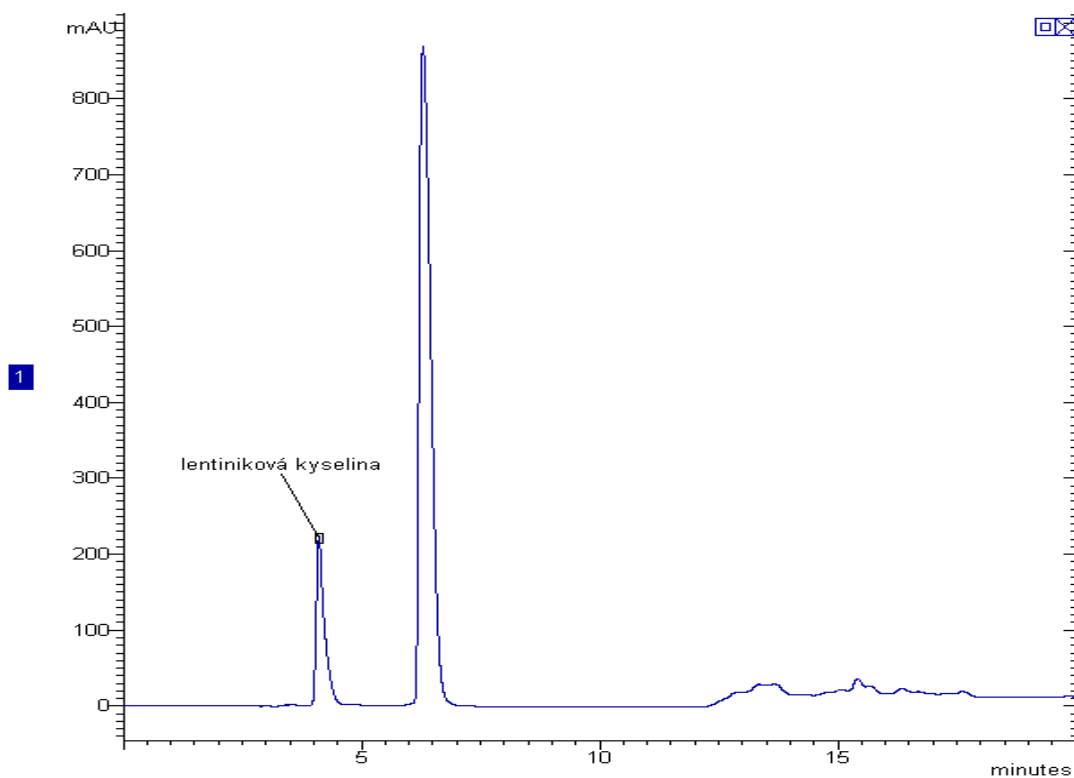
Lentiniková kyselina byla zpočátku izolována z hub shiitake pomocí metody vyvinuté Yasumotem, et al. (1971a), ale tímto postupem se nedařilo získat čistou lentinikovou kyselinu. Tudíž k izolaci byl zvolen postup podle Höfleho et al. (1976), který byl modifikován a uveden v kapitole 4.3.1. Získaný extrakt byl následně přefiltrován mikrofiltrem (0,45  $\mu\text{m}$ ) a analyzován na HPLC s DAD detekcí při 220 nm. Chromatogramy jednotlivých extraktů získaných během izolace lentinikové kyseliny jsou uvedeny na obrázcích 20–23. Jak je z těchto obrázků zřejmé, zvoleným postupem se podařilo získat čistou lentinikovou kyselinu. Identita získané lentinikové kyseliny byla potvrzena porovnáním se standardem a pomocí NMR a HR-MS spektrometrie. Na obrázku 24 je uvedeno UV spektrum lentinikové kyseliny. Retenční čas lentinikové kyseliny při zvoleném gradientu se pohyboval okolo 4 min. Po přečištění extraktu aktivním uhlím a lyofilizací byl zvážen výtěžek. Celkem z 3,45 kg čerstvých hub shiitake bylo získáno 441 mg čisté lentinikové kyseliny.



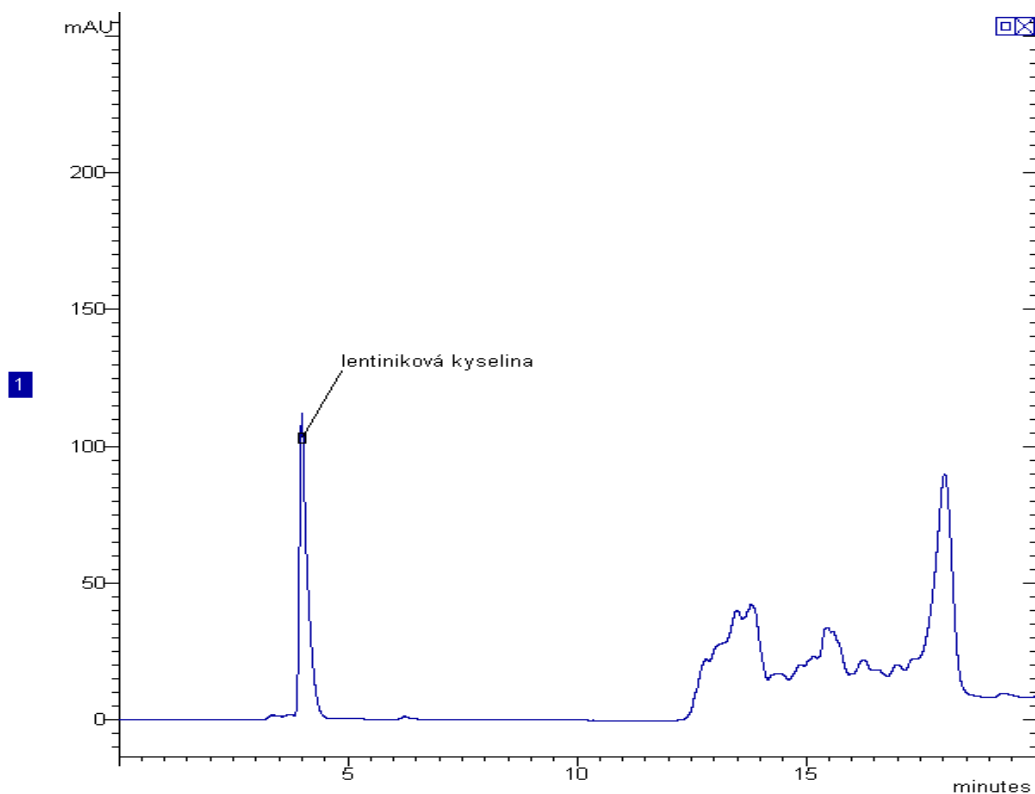
Obrázek 20: HPLC chromatogram extraktu ze shiitake po extrakci diethyletherem



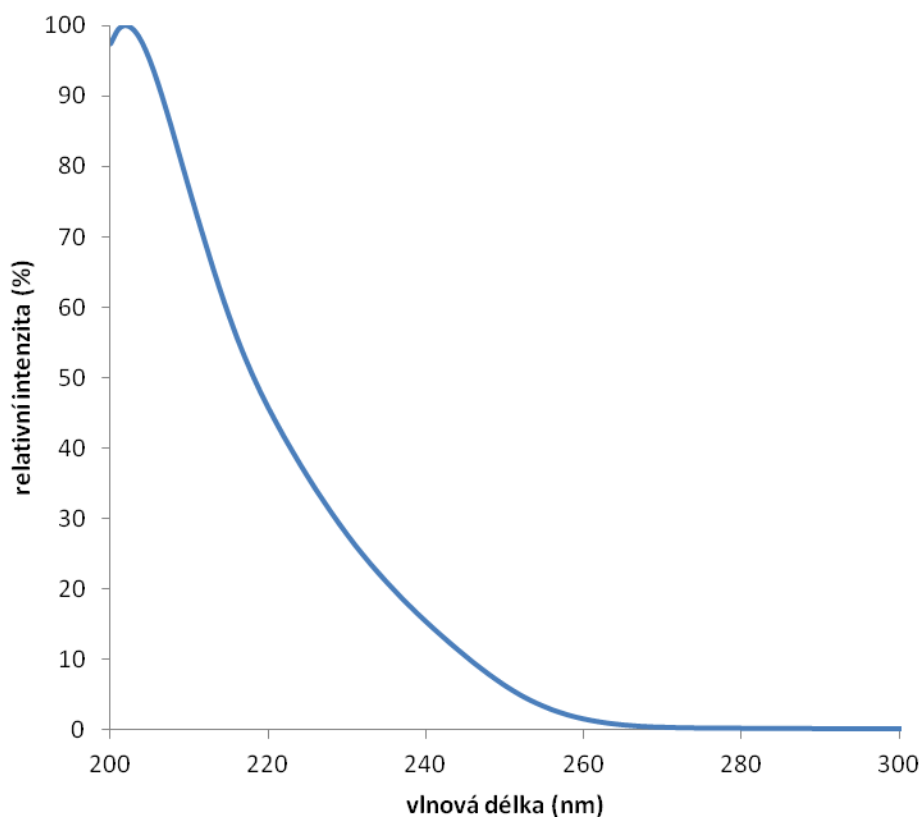
Obrázek 21: HPLC chromatogram extraktu po katexu IR-120



Obrázek 22: HPLC chromatogram extraktu po anexu DEAE Sephadex A-25



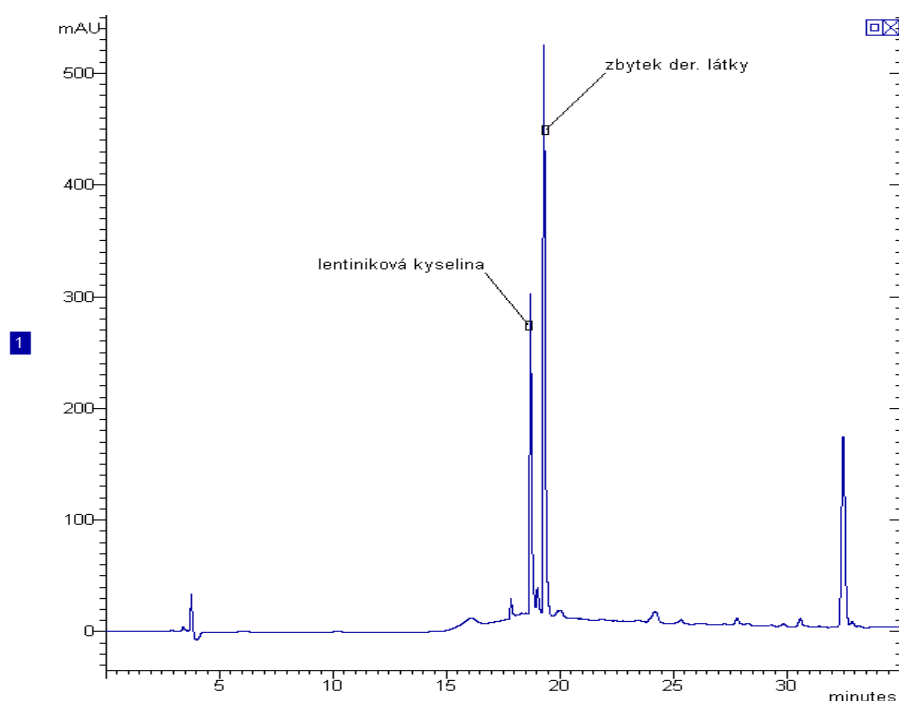
**Obrázek 23: HPLC chromatogram přečištěné lentinikové kyseliny**



**Obrázek 24: UV/VIS spektrum lentinikové kyseliny**

### 5.1.2 Zjištění mezí detekce lentinikové kyseliny

Ke zjištění mezí detekce a kvantifikace, tzn. hodnoty LOD a LOQ, bylo třeba proměřit na kapalinovém chromatografu různě koncentrované roztoky kyseliny lentinikové s cílem zjistit, při jaké koncentraci je derivatizovaná lentiniková kyselina ještě detekovatelná na chromatogramu. Na tento pokus byly připraveny roztoky lentinikové kyseliny o koncentraci: 0,5 mmol/l; 0,05 mmol/l; 0,025 mmol/l; 0,005 mmol/l a 0,0017 mmol/l. Derivatizace se prováděla přidáváním 200  $\mu$ l lentinikové kyseliny o různé koncentraci, 400  $\mu$ l dansylchloridu a 600  $\mu$ l tetraboritanového pufru. Takto připravený roztok se nechal 30 min stát a poté se přefiltroval mikrofiltrem (0,45  $\mu$ m) a analyzoval. Analýza probíhala za stejných podmínek, které byly uvedeny v kapitole 4.3.2.1. Z výsledků analýzy se určila jako hodnota LOD, při které je příslušný pík třikrát vyšší než je průměrný šum vycházející z kolony, koncentrace 1,7 nmol/l. Jako hodnota LOQ, která představuje pík, jež je desetkrát vyšší než průměrná hodnota šumu vycházejícího z kolony, byla stanovena koncentrace 5 nmol/l. S ohledem na relativně vysoký obsah lentinikové kyseliny v shiitake lze tedy tuto metodu považovat za dostatečně citlivou. Na obrázku 25 je uveden chromatogram derivatizované lentinikové kyseliny. Retenční čas derivatizované lentinikové kyseliny se pohyboval okolo 18,5 až 19 minuty.



Obrázek 25: HPLC chromatogram derivatizované lentinikové kyseliny

### 5.1.3 Obsah lentinikové kyseliny v různých vzorcích *Lentinula edodes*

K porovnání obsahu lentinikové kyseliny byly použity dva vzorky hub. První vzorek čerstvých hub byl zakoupen v Praze-Satalicích ze společnosti Samyco, spol. s r.o. Druhý vzorek čerstvých hub byl zakoupen v Nedvědicích u Soběslavi ze společnosti České houby a.s. Od obou vzorků bylo naváženo stejné množství hub a k nim přidáno stejné množství vnitřního standardu. Dále byly získány extrakty postupem uvedeným v kapitole 4.3.2.2. Extrakty po derivatizaci a přefiltrování mikrofiltrem (0,45  $\mu\text{m}$ ) byly analyzovány pomocí HPLC/DAD. Získané hodnoty byly porovnány s kalibrační křivkou uvedenou v grafu 2. Po přepočítání byl ve vzorku hub z pěstírny v Satalicích stanoven obsah lentinikové kyseliny  $0,51 \pm 0,11$  mg/g čerstvé váhy. Ve vzorku hub z pěstírny v Nedvědicích byl naměřen obsah lentinikové kyseliny  $0,64 \pm 0,09$  mg/g čerstvé hmoty. Literární údaje o obsahu lentinikové kyseliny v houbách shiitake jsou kupodivu velmi řídké. Jediným známým kvantitativním údajem o obsahu lentinikové kyseliny je práce Hiraide et al. (2010a). Tito autoři uvádějí, že množství lentinikové kyseliny v čerstvých houbách se pohybuje okolo 0,65 mg/g. Obě dvě naměřené hodnoty v této práci jsou tedy srovnatelné s hodnotou uvedenou v publikaci Hiraide et al. (2010a). Je velmi pravděpodobné, že obsah lentinikové kyseliny v shiitake závisí na mnoha faktorech. Mezi nejvýznamnější faktory ovlivňující obsah této látky patří zejména podklad, na kterém houby vyrůstají, zda rostou na kulatině či na míchaném substrátu. S kvalitou dřeva či substrátu je tedy spojena otázka množství obsahu minerálních látek, C a S. Dalším faktorem je obsah vody, jež se pohybuje v množství okolo 90 %, ale může samozřejmě významně kolísat s teplotou prostředí popř. se stářím plodnic.

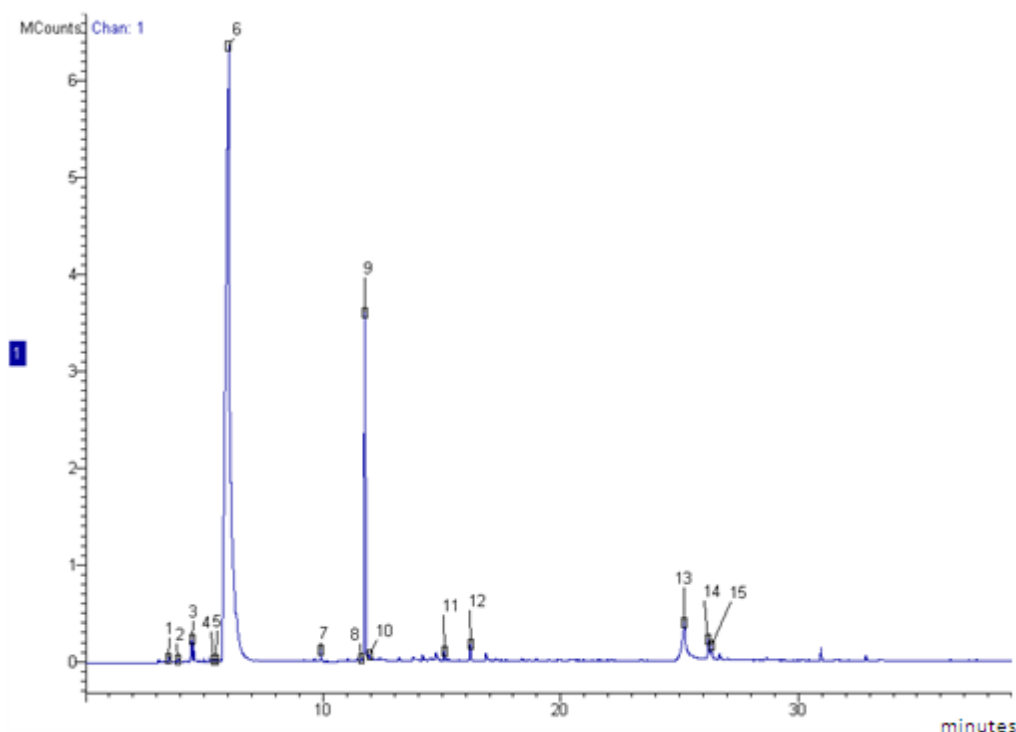
## 5.2 Těkavé látky *Lentinula edodes*

Těkavé látky shiitake byly izolovány třemi různými metodami. První metodou byla extrakce těkavých látek pomocí Likers-Nickersonovy aparatury (viz kapitola 4.3.3.1). Hlavní výhodou této techniky je fakt, že tímto způsobem (na rozdíl od přímé extrakce) jsou extrahovány pouze těkavé látky. Extrakt takto získaný byl analyzován pomocí GC/MS a výsledný chromatogram je uveden na obrázku 26. Látky

identifikované v extraktu jsou uvedené dle čísel v tabulce 9. Vzhledem k tomu, že standardy těchto látek nejsou k dispozici, byla identifikace sloučenin provedena na základě jejich MS spekter a srovnáním s údaji publikovanými v literatuře (*CHEN a HO, 1986b*). Z tohoto důvodu je tedy nutno identifikaci těchto sloučenin považovat pouze za pravděpodobnou.

Druhou metodou byla extrakce těkavých látek diethyletherem. V tomto experimentu byl homogenát připraven bez úpravy pH. Naměřené pH homogenátu shiitake při tomto experimentu bylo 6,34. Postup získání tohoto extraktu je uveden v kapitole 4.3.3.2. Chromatogram takto získaných těkavých látek je uveden na obrázku 27. Látky identifikované v extraktu jsou seřazeny dle čísel v tabulce 10.

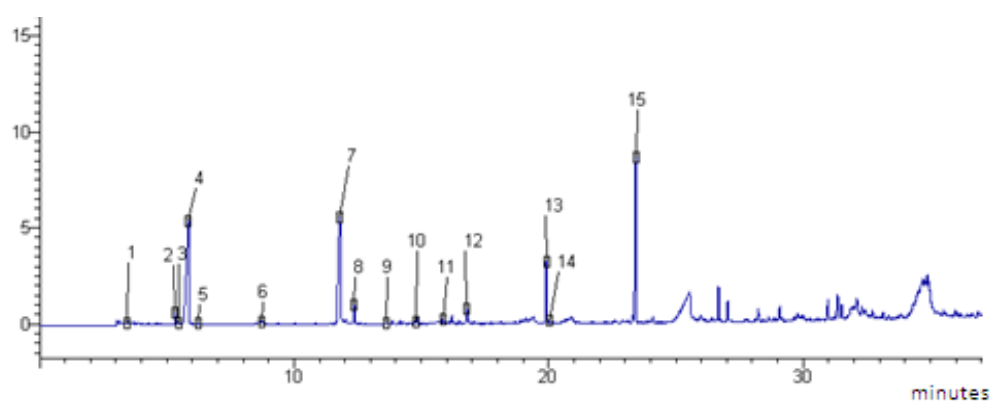
Třetí metodou byla extrakce těkavých látek diethyletherem, které předcházela úprava pH homogenátu na hodnotu 9,0 (hodnota pH optima klíčových enzymů rozkládajících lentinickou kyselinu, a sice  $\gamma$ -glutamyltranspeptidasy a C-S lyasy). Postup získání extraktu byl uveden v kapitole 4.3.3.3. Chromatogram po analýze extraktu pomocí GC/MS je uveden na obrázku 28 a v něm obsažené identifikované látky jsou uvedeny dle čísel v tabulce 11.



**Obrázek 26:** GC chromatogram extraktu těkavých látek Likers-Nickersonovou metodou

**Tabulka 9: Vyhodnocení chromatogramu extraktu těkavých látek Likers-Nickersonovou metodou**

	Mr	MS spektra						název	sumární vzorec
1	118	118 (6, M <sup>+</sup> )	120 (1, M <sup>+</sup> +2)	71 (27)	61 (36)	43 (100)	thioanhydrid kys. octové	C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub> S	
2	94	94 (100, M <sup>+</sup> )	96 (20, M <sup>+</sup> +2)	79 (47)	45 (68)	43 (39)	dimetyldisulfid	C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> S <sub>2</sub>	
3	76	76 (5, M <sup>+</sup> )	78 (1, M <sup>+</sup> +2)	45 (57)	43 (100)	42 (16)	kys. thiooctová	C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> OS	
4	100	100 (2, M <sup>+</sup> )	56 (84)	44 (75)	43 (86)	41 (100)	hexanal	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O	
5	92	92 (55, M <sup>+</sup> )	94 (10, M <sup>+</sup> +2)	59 (76)	45 (100)	43 (75)	3-sulfanylpropan-1-ol	C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> OS	
6							křemíkatá nečistota		
7							křemíkatá nečistota		
8	126	126 (3, M <sup>+</sup> )	97 (39)	70 (90)	55 (100)	32 (26)	okt-1-en-3-on	C <sub>8</sub> H <sub>14</sub> O	
9	128	128 (2, M <sup>+</sup> )	68 (39)	57 (100)	43 (21)	41 (16)	okt-1-en-3-ol	C <sub>8</sub> H <sub>16</sub> O	
10	128	128 (2, M <sup>+</sup> )	99 (49)	71 (42)	57 (100)	43 (85)	oktan-3-on	C <sub>8</sub> H <sub>16</sub> O	
11	128	128 (3, M <sup>+</sup> )	67 (57)	57 (100)	55 (47)	41 (60)	(E)-okt-2-en-1-ol	C <sub>8</sub> H <sub>16</sub> O	
12	124	124 (100, M <sup>+</sup> )	126 (20, M <sup>+</sup> +2)	78 (99)	59 (21)	46 (26)	1,2,4-trithiolan	C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> S <sub>3</sub>	
13							nečistota		
14	188	188 (20, M <sup>+</sup> )	190 (5, M <sup>+</sup> +2)	142 (78)	124 (60)	78 (100)	lentionin	C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> S <sub>5</sub>	
15	156	156 (6, M <sup>+</sup> )	158 (1, M <sup>+</sup> +2)	110 (70)	78 (100)	45 (73)	1,2,4,5-tetrathian	C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> S <sub>4</sub>	

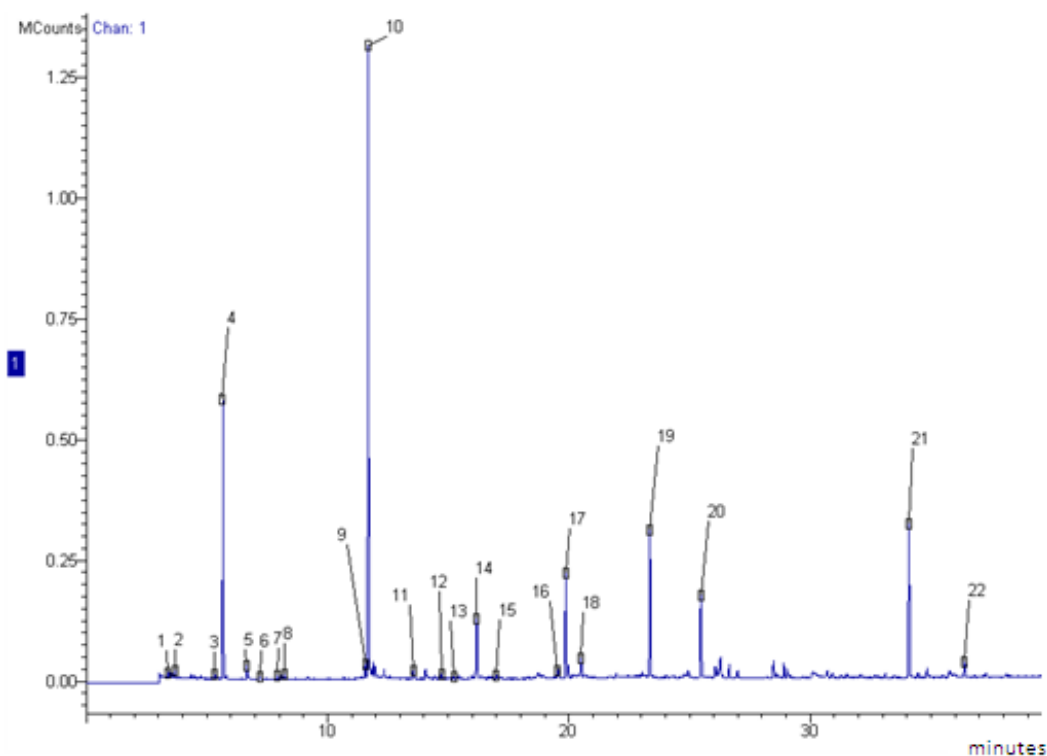


**Obrázek 27: GC chromatogram extraktu těkavých látek bez úpravy pH**

**Tabulka 10: Vyhodnocení chromatogramu extraktu těkavých látek bez úpravy pH**

	Mr	MS spektra						název	sumární vzorec
1	88	88 (60, M <sup>+</sup> )	90 (20, M <sup>+</sup> +2)	73 (96)	59 (76)	43 (100)	(1E)-1-(methylsulfanyl)prop-1-en	C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> S	
2	146	146 (1, M <sup>+</sup> )	57 (65)	56 (100)	44 (75)	41 (94)	oktan-1,3-diol	C <sub>8</sub> H <sub>18</sub> O <sub>2</sub>	
3	150	150 (6, M <sup>+</sup> )	152 (1, M <sup>+</sup> +2)	59 (23)	45 (80)	32 (40)	3-[(2-hydroxypropyl)sulfanyl]propan-1-ol	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> O <sub>2</sub> S	
4							křemíkatá nečistota		
5	102	102 (25, M <sup>+</sup> )	104 (5, M <sup>+</sup> +2)	87 (51)	45 (68)	32 (100)	2-methyltetrahydrothiofen	C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> S	
6	112	112 (100, M <sup>+</sup> )	114 (20, M <sup>+</sup> +2)	97 (61)	45 (24)	32 (29)	3,4-dimethylthiofen	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> S	
7	128	128 (1, M <sup>+</sup> )	81 (20)	69 (75)	57 (100)	43 (20)	okt-1-en-3-ol	C <sub>8</sub> H <sub>16</sub> O	
8							nečistota		
9	146	146 (6, M <sup>+</sup> )	148 (1, M <sup>+</sup> +2)	70(34)	57 (100)	41 (51)	2-ethylhexan-1-thiol	C <sub>8</sub> H <sub>18</sub> S	
10	126	126 (15, M <sup>+</sup> )	128 (3, M <sup>+</sup> +2)	81 (100)	63 (42)	45 (47)	S-methyl methansulfonothioát	C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub> S <sub>2</sub>	
11	140	140 (35, M <sup>+</sup> )	142 (5, M <sup>+</sup> +2)	125 (100)	111 (13)	97 (33)	3,4-diethylthiofen	C <sub>8</sub> H <sub>12</sub> S	
12	122	122 (89, M <sup>+</sup> )	93 (57)	92 (63)	91 (100)	65 (24)	fenylethylalkohol	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> O	
13	198	198 (5, M <sup>+</sup> )	71 (61)	57 (100)	43 (44)	41 (38)	tetradekan	C <sub>14</sub> H <sub>30</sub>	
14	124	124 (6, M <sup>+</sup> )	126 (1, M <sup>+</sup> +2)	63 (74)	61 (100)	46 (66)	(methylsulfanyl)(methylsufinyl)methan	C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> OS <sub>2</sub>	
15	268	268 (3, M <sup>+</sup> )	71 (70)	57 (100)	43 (46)	41 (27)	nonadekan	C <sub>19</sub> H <sub>40</sub>	



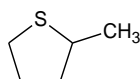


Obrázek 28: GC chromatogram extraktu těkavých látek s úpravou pH na 9,H

Tabulka 11: Vyhodnocení chromatogramu extraktu těkavých látek s úpravou pH na 9,0

	Mr	MS data			název			sumární vzorec
1	88	88 (96, M <sup>+</sup> )	90 (10, M <sup>+</sup> +2)	73 (100)	45 (66)	32 (54)	(1E)-1-(methylsulfanyl)prop-1-en	C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> S
2	88	88 (90, M <sup>+</sup> )	90 (10, M <sup>+</sup> +2)	73 (100)	45 (67)	32 (30)	3-(methylsulfanyl)prop-1-en	C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> S
3	100	100 (5, M <sup>+</sup> )	44 (60)	43 (78)	41 (100)	32 (70)	(2E)-hex-2-en-1-ol	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O
4	88	88 (23, M <sup>+</sup> )	73 (14)	61 (29)	45 (38)	43 (100)	etylacetát	C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>
5	116	116 (19, M <sup>+</sup> )	59 (82)	58 (19)	43 (100)	41 (18)	4-hydroxy-4-methylpentan-2-on	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub>
6	146	146 (10, M <sup>+</sup> )	148 (2, M <sup>+</sup> +2)	57 (35)	43 (100)	32 (76)	2-ethylhexan-1-thiol	C <sub>8</sub> H <sub>18</sub> S
7	114	114 (30, M <sup>+</sup> )	116 (5, M <sup>+</sup> +2)	99 (99)	81 (60)	45 (52)	diallylmonosulfid	C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> S
8	114	114 (25, M <sup>+</sup> )	116 (5, M <sup>+</sup> +2)	99 (89)	81 (56)	45 (86)	(1E)-1-[(1E)-prop-1-en-1-ylsulfanyl]prop-1-en	C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> S
9	126	126 (20, M <sup>+</sup> )	97 (33)	70 (95)	55 (100)	32 (24)	okt-1-en-3-on	C <sub>8</sub> H <sub>14</sub> O
10	128	128 (10, M <sup>+</sup> )	69 (14)	57 (100)	43 (20)	41 (15)	okt-1-en-3-ol	C <sub>8</sub> H <sub>16</sub> O
11	146	146 (6, M <sup>+</sup> )	148 (1, M <sup>+</sup> +2)	134 (27)	89 (38)	41 (100)	3-(prop-2-en-1-ylsulfonyl)prop-1-en	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> O <sub>2</sub> S
12	126	126 (5, M <sup>+</sup> )	55 (76)	41 (77)	39 (60)	32 (100)	(2E)-okt-2-enal	C <sub>8</sub> H <sub>14</sub> O
13	202	202 (20, M <sup>+</sup> )	204 (5, M <sup>+</sup> +2)	69 (47)	41 (99)	32 (100)	2-methylundekan-2-thiol	C <sub>12</sub> H <sub>26</sub> S
14	124	124 (96, M <sup>+</sup> )	126 (10, M <sup>+</sup> +2)	78 (100)	71 (60)	57 (90)	1,2,4-trithiolan	C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> S <sub>3</sub>
15	146	146 (53, M <sup>+</sup> )	148 (10, M <sup>+</sup> +2)	146 (53)	113 (58)	45 (100)	diallyldisulfid	C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> S <sub>2</sub>
16	144	144 (48, M <sup>+</sup> )	146 (5, M <sup>+</sup> +2)	111 (79)	97 (93)	77 (78)	3-vinyl-3,6-dihydro-1,2-dithiin	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> S <sub>2</sub>
17	168	168 (2, M <sup>+</sup> )	71 (61)	57 (100)	43 (61)	41 (51)	4-methylundek-1-en	C <sub>12</sub> H <sub>24</sub>
18	144	144 (18, M <sup>+</sup> )	146 (2, M <sup>+</sup> +2)	111 (48)	97 (31)	71 (100)	3-vinyl-1,2-dithiacyklohex-5-en	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> S <sub>2</sub>
19	186	186 (1, M <sup>+</sup> )	57 (100)	55 (64)	43 (66)	41 (60)	2-butyloktan-1-ol	C <sub>12</sub> H <sub>26</sub> O
20	156	156 (100, M <sup>+</sup> )	158 (15, M <sup>+</sup> +2)	110 (71)	64 (30)	45 (52)	1,2,4,5-tetrathian	C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> S <sub>4</sub>
21	188	188 (25, M <sup>+</sup> )	190 (5, M <sup>+</sup> +2)	142 (80)	124 (68)	78 (100)	lentionin	C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> S <sub>3</sub>
22	206	206 (27, M <sup>+</sup> )	208 (5, M <sup>+</sup> +2)	142 (100)	78 (53)	64 (51)	hexathiepan	CH <sub>2</sub> S <sub>6</sub>

*sirné těkavé sloučeniny:*



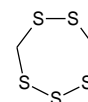
**2-methyltetrahydrothiophen**  
**(I)**



**1,2,4-trithiolan**  
**(II)**



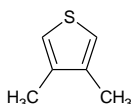
**1,2,4,5-tetrathian**  
**(III)**



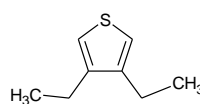
**lentionin**  
**(IV)**



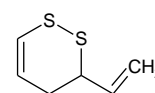
**hexathiepan**  
**(V)**



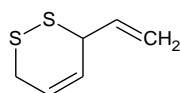
**3,4-dimethylthiophen**  
**(VI)**



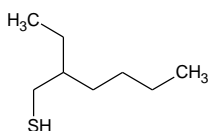
**3,4-diethylthiophen**  
**(VII)**



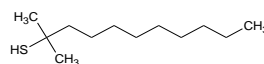
**3-vinyl-1,2-dithia-cyklohex-5-en**  
**(VIII)**



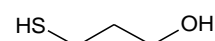
**3-vinyl-3,6-dihydro-1,2-dithiin**  
**(IX)**



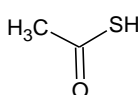
**2-ethylhexan-1-thiol**  
**(X)**



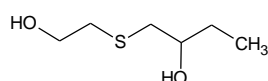
**2-methylundekan-2-thiol**  
**(XI)**



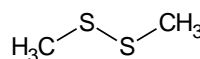
**3-sulfanylpropan-1-ol**  
**(XII)**



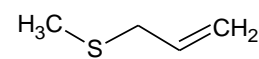
**kys. thiooctová**  
**(XIII)**



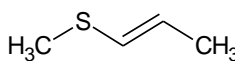
**3-[(2-hydroxypropyl)sulfanyl]propan-1-ol**  
**(XIV)**



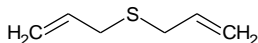
**dimetyldisulfid**  
**(XV)**



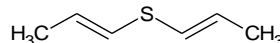
**3-(methylsulfanyl)prop-1-en**  
**(XVI)**



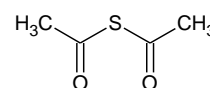
**(1E)-1-(methylsulfanyl)prop-1-en**  
**(XVII)**



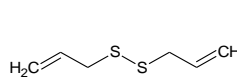
**diallylmonosulfid**  
**(XVIII)**



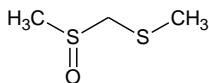
**(1E)-1-[(1E)-prop-1-en-1-ylsulfanyl]prop-1-en**  
**(XIX)**



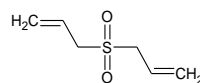
**thioanhydrid kys. octové**  
**(XX)**



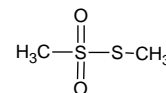
**diallyldisulfid**  
**(XXI)**



**(methylsulfanyl)**  
**(methylsulfinyl)**  
**methan**  
**(XXII)**

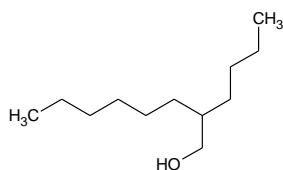


**3-(prop-2-en-1-yl-**  
**sulfonyl)prop-1-en**  
**(XXIII)**

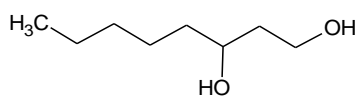


**S-methylmethan**  
**sulfonothioát**  
**(XXIV)**

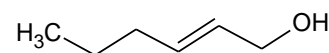
*kyslíkaté těkavé sloučeniny shiitake:*



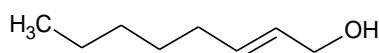
**2-butylloktan-1-ol**  
**(XXV)**



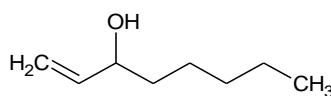
**oktan-1,3-diol**  
**(XXVI)**



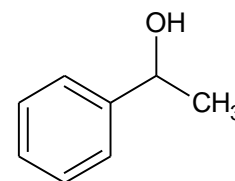
**(2E)-hex-2-en-1-ol**  
**(XXVII)**



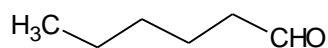
**(E)-okt-2-en-1-ol**  
**(XXVIII)**



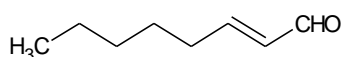
**okt-1-en-3-ol**  
**(XXIX)**



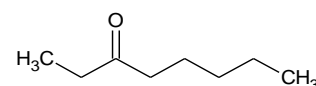
**fenylethylalkohol**  
**(XXX)**



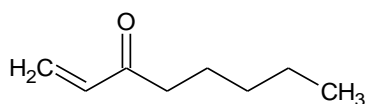
**hexanal**  
**(XXXI)**



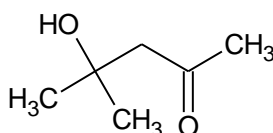
**(2E)-okt-2-enal**  
**(XXXII)**



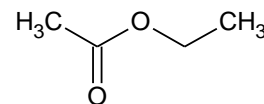
**oktan-3-on**  
**(XXXIII)**



**okt-1-en-3-on**  
**(XXXIV)**



**4-hydroxy-4-methyl-**  
**pentan-2-on**  
**(XXXV)**

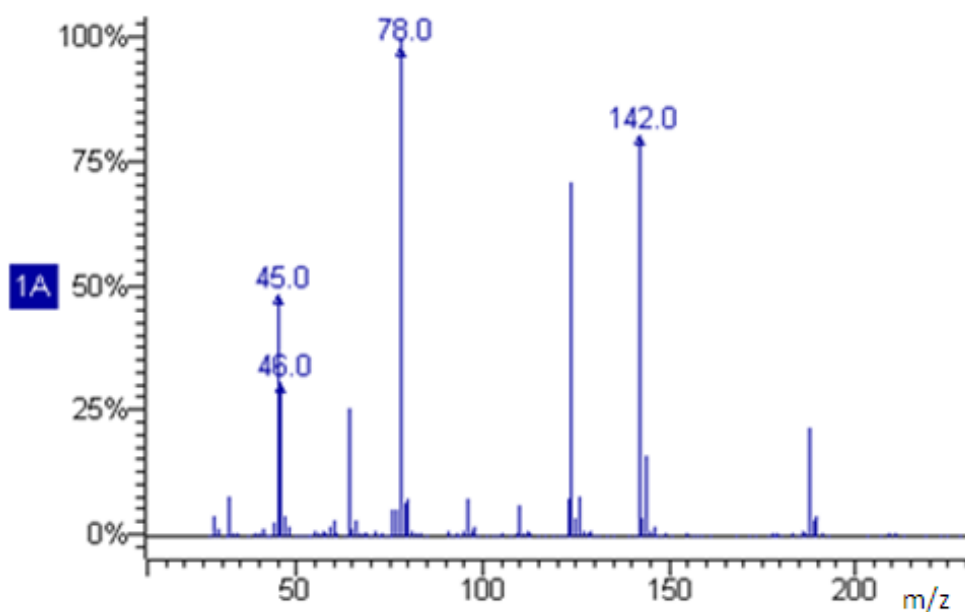


**ethylacetát**  
**(XXXVI)**

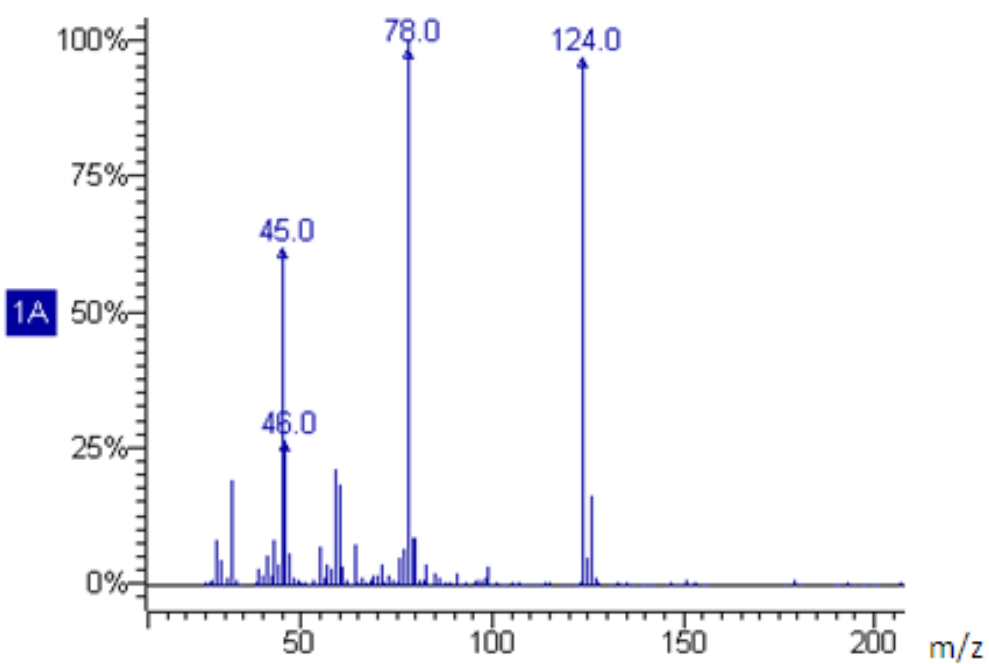
Z tabulek 9, 10 a 11 lze vyčíst, že izolované těkavé látky lze rozdělit buď na sirné, či kyslíkaté sloučeniny obsahující především osm uhlíků. V extraktu získaném pomocí Likens-Nickersonovy aparatury byly nalezeny tyto látky s nejvyšší intenzitou: okt-1-en-3-ol (**XXIX**), kyselina thiooctová (**XIII**), lentionin (**IV**), 1,2,4-trithiolan (**II**), 1,2,4,5-tetrathian (**III**), (*E*)-okt-2-en-1-ol (**XXVIII**) a oktan-3-on (**XXXIII**). V extraktu bez úpravy pH byly nalezeny tyto těkavé látky v nejvyšší intenzitou: okt-1-en-3-ol (**XXIX**), oktan-1,3-diol (**XXVI**) a 3,4-diethylthiofen (**VII**). Poslední extrakt s úpravou pH homogenátu na hodnotu 9,0, obsahoval nejvíce těkavých látek, mezi hlavními byly: okt-1-en-3-ol (**XXIX**), lentionin (**IV**), 1,2,4,5-tetrathian (**III**), 1,2,4-trithiolan (**II**), hexathiepan (**V**) a okt-1-en-3-on (**XXXIV**).

Chen et al. (1986a) identifikovali 18 necyklických a cyklických sirných sloučenin z hub shiitake uvedených v kapitole 2.6.5. Jako hlavní sirné cyklické těkavé látky označili lentionin (**IV**), 1,2,4-trithiolan (**II**) a 1,2,4,5-tetrathian (**III**). Hlavními kyslíkatými sloučeninami v shiitake jsou osmiuhlíkaté alkoholy okt-1-en-3-ol (**XXIX**) a okt-2-en-3-ol, které pravděpodobně vznikají z linolové kyseliny. (*CHEN et al., 1986a*)

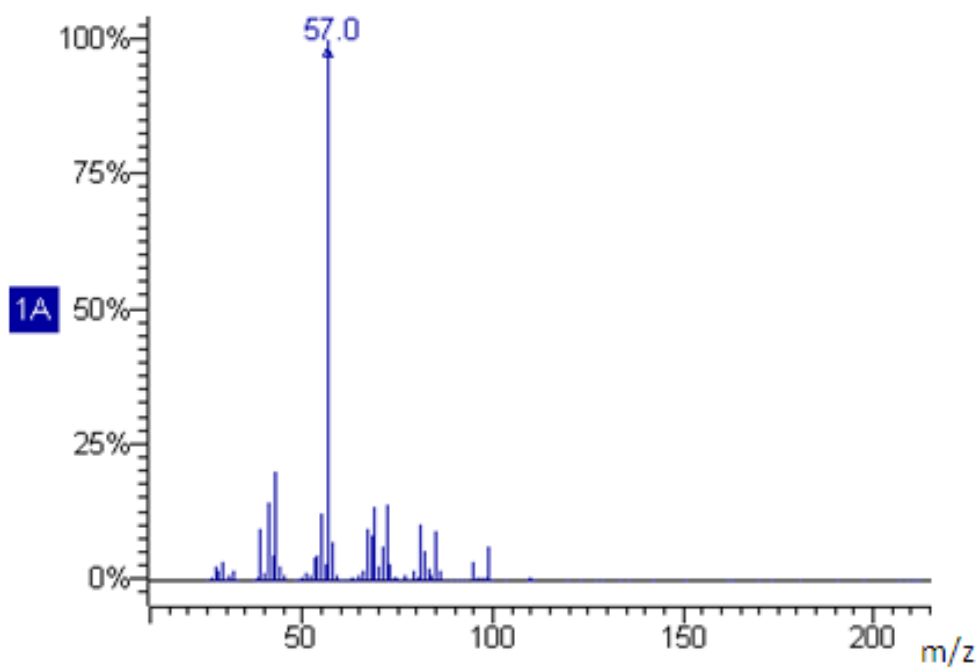
Sloučeniny v tabulkách 9, 10 a 11 odpovídají předpokladu, že v čerstvých houbách se za normálních podmínek tvoří pouze velmi malé množství těkavých látek, jelikož přirozená hodnota pH homogenátu shiitake (pH 6,4) je mimo oblast pro optimální aktivitu enzymů rozkládajících lentinikovou kyselinu (pH 9,0) (*CHEN et al., 1986a*). Avšak po úpravě pH homogenátu na hodnotu 9,0 množství těkavých látek rapidně vzrostlo. Při tomto pH dochází k přeměně netěkavé lentinikové kyseliny na těkavé sirné látky, jako je např. lentionin. Je velmi zajímavé, že enzymy z hub shiitake jsou aktivní až při hodnotách pH kolem 9. Toto pH není typická hodnota pro živé systémy a takto zásadité prostředí se za normálních podmínek v těchto houbách nevyskytuje. Tvorba sirných těkavých látek bývá také spojována s určitou ochranou organismu před predátory. Ale jak již bylo zmíněno, v shiitake není za normálních podmínek optimální stav pro enzymový rozklad lentinikové kyseliny, a tudíž není jasné, proč houby shiitake vůbec tuto polysirnou sloučeninu syntetizují.



Obrázek 29: Spektrum lenthioninu



Obrázek 30: Spektrum 1,2,4-trithiolanu



Obrázek 31: Spektrum okt-1-en-3-olu

## 6 Závěr

Tato práce se zabývala sirnými sloučeninami hub shiitake, konkrétně izolací lentinikové kyseliny a strukturou těkavých látek vznikajících v této houbě během zpracování. Byl optimalizován postup izolace lentinikové kyseliny, vyvinuta metoda pro její analytické stanovení a stanoven obsah této kyseliny ve dvou vzorcích čerstvých hub z odlišných pěstíren. Byly též analyzovány těkavé látky přítomné v homogenizovaných plodnicích hub *Lentinula edodes*, v závislosti na použité metodě získání těkavých látek a změně podmínek pH.

Lentiniková kyselina, sirná sloučenina hub shiitake, je netěkavý prekurzor těkavých cyklických sirných látek, hlavně lentioninu. Tyto těkavé látky vznikají při zpracování hub shiitake díky působení enzymů  $\gamma$ -glutamyltransferasy a C-S lyasy právě na tuto kyselinu. Těkavé látky obsažené v této houbě zahrnují jak cyklické sirné látky, tak alkoholy. Tyto látky utvářející typické aroma hub shiitake byly izolovány třemi různými postupy. První metodou byla izolace pomocí Likens-Nickersonovy aparatury, kdy byl získán extrakt hub a dále analyzován plynovou chromatografií. Touto metodou byly stanoveny více těkavé látky a dominantní sloučeninou v tomto extraktu byl okt-1-en-3-on, dále lentionin, 1,2,4-trithiolan, 1,2,4,5-tetrathian. Dále byl stanoven extrakt hub shiitake přímou extrakcí diethyletherem a výsledný extrakt opět analyzován plynovou chromatografií. V tomto extraktu převládaly následující látky: okt-1-en-3-ol, oktán-1,3-diol a 3,4-diethylthiofen. Posledním stanovení těkavých látek bylo stanovení homogenátu, u kterého bylo upraveno pH na hodnotu 9, při kterém jsou aktivní enzymy obsažené v této houbě, odpovědné za rozklad lentinikové kyseliny na těkavé cyklické sirné látky. Vzniklý extrakt byl opět analyzován na plynovém chromatografu, obsahoval velké množství těkavých látek v porovnání s předešlými extrakty, převládaly tyto látky: okt-1-en-3-ol, lentionin, 1,2,4,5-tetrathian, 1,2,4-trithiolan, hexathiepan a okt-1-en-3-on. Získané chromatogramy byly porovnány a výsledky potvrdily, že za normálních hodnot pH, vyskytujících se v shiitake, pohybujících se okolo pH 7, se tvoří pouze malé množství těkavých sirných látek. Po úpravě pH homogenátu na hodnotu 9, byly zaktivovány enzymy  $\gamma$ -glutamyltransferasa a C-S lyasa, které jsou zodpovědné za přeměnu lentinikové kyseliny na těkavé cyklické sirné látky, které utvářejí typické aroma této kulinářsky velmi oblíbené houby. U těchto výsledků je závažné, že houba shiitake obsahuje enzymy, které vykazují aktivitu při výrazně odlišné hodnotě pH, než se

nachází v této houbě. Tudíž nemohou tyto aromatické sirné látky plnit svou úlohu při ochraně této houby před predátory. Ovšem při úpravě pokrmů z čerstvých hub shiitake se doporučuje pro zvýraznění typického aroma a chuti této houby přidávat sodu, tím tedy dojde ke zvýšení pH pokrmu a tudíž ke zvýšení obsahu aromatických látek v daném jídle.



## Seznam obrázků

Obrázek 1: Plodnice shiitake ( <i>Lentinula edodes</i> , Berk., Pegler) .....	3
Obrázek 2: <i>Lentinula edodes</i> rostoucí na dřevě .....	3
Obrázek 3: Očkování <i>Lentinula edodes</i> .....	6
Obrázek 4: Kultivace <i>Lentinula edodes</i> .....	6
Obrázek 5: Sklizení shiitake .....	7
Obrázek 6: Sušené plodnice shiitake .....	8
Obrázek 7: Shiitake pěstovaná na umělém substrátu .....	9
Obrázek 8: Další pěstované houby .....	16
Obrázek 9: Struktura lentinanu (I) .....	17
Obrázek 10: Ukázka potravních doplňků obsahujících shiitake .....	19
Obrázek 11: Kulinární úpravy shiitake .....	20
Obrázek 12: Navrhovaná struktura kyseliny lentinikové Yasumotem et al.(1971a) (II) .....	21
Obrázek 13: Struktura lentinikové kyseliny (III) .....	21
Obrázek 14: Houby obsahující lentinikovou kyselinu .....	22
Obrázek 15: Struktura lentioninu (IV) .....	22
Obrázek 16: Mechanismus tvorby lentioninu z lentinikové kyseliny (YASUMOTO et al., 1974) .....	24
Obrázek 17: Mechanismus průběhu derivatizace lentinikové kyseliny .....	37
Obrázek 18: HPLC chromatogram derivatizované lentinikové kyseliny .....	37
Obrázek 19: Likens-Nickersonova aparatura .....	40
Obrázek 20: HPLC chromatogram extraktu ze shiitake po extrakci diethyletherem .....	42
Obrázek 21: HPLC chromatogram extraktu po katexu IR-120 .....	43
Obrázek 22: HPLC chromatogram extraktu po anexu DEAE Sephadex A-25 .....	43
Obrázek 23: HPLC chromatogram přečištěné lentinikové kyseliny .....	44
Obrázek 24: UV/VIS spektrum lentinikové kyseliny .....	44
Obrázek 25: HPLC chromatogram derivatizované lentinikové kyseliny .....	45
Obrázek 26: GC chromatogram extraktu těkavých látek Likers-Nickersonovou metodou .....	47
Obrázek 27: GC chromatogram extraktu těkavých látek bez úpravy pH .....	48
Obrázek 28: GC chromatogram extraktu těkavých látek s úpravou pH na 9,H .....	49
Obrázek 29: Spektrum lentioninu .....	53
Obrázek 30: Spektrum 1,2,4-trithiolanu .....	53
Obrázek 31: Spektrum okt-1-en-3-olu .....	54

## Seznam tabulek

Tabulka 1: Světová produkce čerstvé <i>Lentinula edodes</i> v různých letech (v tisících tun). (CHANG, 2002).....	13
Tabulka 2: Odhadovaná produkce (čerstvé váhy), shiitake ( <i>Lentinula edodes</i> ), v některých zemích v r. 2003. (ROYSE, 2009) .....	14
Tabulka 3: Světová produkce pěstovaných jedlých hub v roce 1986 a 2003 (v tisících tun). (ROYSE, 2009) .....	15
Tabulka 4: Získané hodnoty po anexu DEAE Sephadex .....	34
Tabulka 5: Složení mobilní fáze .....	35
Tabulka 6: Míchání roztoků na kalibrační křivku.....	36
Tabulka 7: Složení mobilní fáze .....	36
Tabulka 8: Tabulka hodnot pro sestavení kalibrační křivky.....	38
Tabulka 9: Vyhodnocení chromatogramu extraktu těkavých látek Likers-Nickersonovou metodou.....	48
Tabulka 10: Vyhodnocení chromatogramu extraktu těkavých látek bez úpravy pH.....	48
Tabulka 11: Vyhodnocení chromatogramu extraktu těkavých látek s úpravou pH na 9,0 .....	49

## Seznam grafů

Graf 1: Světová produkce čerstvé <i>Lentinula edodes</i> v různých letech (v tisících tun). (CHANG, 2002).....	14
Graf 2: Kalibrační křivka .....	38

## Literatura

ANTONÍN, V. (2006) Encyklopedie hub a lišejníků. Nakladatelství Academia, Praha, 267 a 351.

CHANG, S.T. (2002) Past and Present Trends in the Production of *Lentinula edodes* in Asia. *Mushroom Biology and Mushroom Products*, editor Sánchez a kol., ISBN 968-878-105-3.

CHEN, A.W. (2005) What is shiitake? *Mushroom Growers' Handbook 2*, kapitola 1, 1-11. (<http://www.alohamedicinals.com/book2/chapter-1-01.pdf>) k 14. 8. 2011

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. *J. Agric. Food Chem*, 32, 999-1001.

CHEN, C.C. LIU, S.E., WU, C.M, HO, C.T. (1986a) Enzymatic formation of volatile compounds in shiitake mushroom (*Lentinus edodes* Sing.). Biogenesis of Aromas, American Chemical Society: Washington, D.C., ACS SYMPHOSIUM SERIES 317, 176-183.

CHEN, C.C., HO, C.T. (1986b) Identification of sulfurous compounds of shiitake mushroom (*Lentinus edodes* Sing.). *J. Agric. Food Chem.*, 34, 830-833.

CHIRANA, G., HAMURO, J., MAEDA, Y.Y., ARAI, Y. FUKUOKA, F. (1970) Antitumor polysaccharide derived chemically from natural glucan (pachyman). *Nature*, London, 225, 943-944.

FUJIMOTO, K., TSURUMI, T., WATARI, M., AKAMA, K., KANEDA, T. (1974) The mechanism of formaldehyde formation in shii-ta-ke mushroom. *Mushroom Science*, Tokyo, 9, 385-390. ([http://www.pubhort.org/isms/9/1/v9\\_p1\\_a38.htm](http://www.pubhort.org/isms/9/1/v9_p1_a38.htm)) k 10. 10. 2011

GMELIN, R., N'GALAMULUME-TREVES, M., HÖFLE, G. (1980) Epilentinsäure, ein neuer Aroma- und Geruchs- Precursor in *Tricholoma* arten. *Phytochemistry*, 19, 553-557.

HÖFLE, G., GMELIN, R., LUXA, H.-H. N'GALAMULUME-TREVES, M., HATANAKA, Sh.I. (1976) Struktur der Lentinsäure: 2-( $\gamma$ -Glutamylamino)-4,6,8,10,10-pentaoxo-4,6,8,10-tetrathiaundecansäure. *Tetrahedron Lett.*, 36, 3129-3132.

HIRAIDE, M., KATO, A., NAKASHIMA, T. (2010a) The smell and odorous components of dried shiitake mushroom, *Lentinula edodes* V: changes in lenthionine and lenticinic acid contents during the drying process. *J. Wood Sci.*, 56, 477-482.

HIRAIDE, M., NAKASHIMA, T. (2010b) The smell and odorous components of dried shiitake mushroom, *Lentinula edodes* VI: increase in odorous compounds of dried shiitake mushroom cultivated on bed logs. *J. Wood Sci.*, 56, 483-487.

HIRASAWA, M., SHOUJI, N., NETA, T., FUKUSHIMA, K., TAKADA, K. (1999) Three kinds of antibacterial substances from *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. (Shiitake, an edible mushroom). *Int. J. Antimicrob. Agents*, 11, 151-157.

ITO, Y., TOYADA, M., SUZUKI, H., IWAIDA, M. (1978) Gas-liquid chromatographic determination of lenthionine in shiitake mushroom (*Lentinus edodes*) with special reference to the relation between carbon disulfide and lenthionine. *J. Food Sci.*, 43, 1287-1289.

IWAMI, K., YASUMOTO, K. (1980) Alliinase-like enzymes in fruiting bodies of *Lentinus edodes*: their purification and substrate specificity. *Agric. Biol. Chem.*, 44, 3003-3004.

IWAMI, K., YASUMOTO, K. (1982) Substrate preference of  $\gamma$ -glutamyltransferase from caps of fruiting bodies of *Lentinus edodes*. *Agric. Biol. Chem.*, 46, 2387-2388.

ROYSE, D.J. (2001) Cultivation of shiitake on natural and synthetic logs, College of Agricultural Sciences Agricultural Research and Cooperative Extension, (<http://pubs.cas.psu.edu/freepubs/pdfs/ul203.pdf>) k 14. 8. 2011

ROYSE, D.J. (2009) Cultivation of shiitake on natural and synthetic logs, College of Agricultural Sciences Agricultural Research and Cooperative Extension, (<http://pubs.cas.psu.edu/FreePubs/pdfs/xl0083.pdf>) k 14. 8. 2011

SHIEH, J., SUMIMOTO, M. (1992) Identification of the volatile flavor components from shiitake mushrooms grown on the medium of *cunninghamia lanceolata*. *Mokuzai Gakkaishi*, 38, 1159-1167.

SOLOMON, P. Wasser (2005) Shiitake (*Lentinus edodes*). *Encyclopedia of Dietary Supplements*, Marcel Dekker, New York, 653-664.

SMOTLACHA, M. (1992) Co jsou matsu-také a šiitaké. *Výživa a potraviny*, 2, 75-76.

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. *J. Amer. Chem. Soc.*, 126, 458-459.

WU, C.M., WANG, Z. (2000) Volatile compounds in fresh and processed shiitake mushrooms (*Lentinula edodes* Sing.), *Food Sci. Technol. Res.*, 6, 166-170.

YASUMOTO, K., IWAMI, K., MITSUDA, H., (1971a) A new sulfur-containing peptide from *Lentinus edodes* acting as a precursor for lenthionine. *Agric. Biol. Chem.*, 35, 2059-2069.

YASUMOTO, K., IWAMI, K., MITSUDA, H. (1971b) Enzyme-catalyzed evolution of lenthionine from lentinic acid. *Agric. Biol. Chem.*, 35, 2070-2080.

YASUMOTO, K., IWAMI, K., MITSUDA, H. (1974) Enzymatic formation of shii-take aroma from non-volatile precursor(s)-lenthionine from lentinic acid, Proceeding of the Ninth International, Scientific Congress on the Cultivation of Edible Fungi, Tokyo, 371-383.

### **Internetové zdroje:**

Profil taxonu. *Biolib.cz* [online]. [cit. 3. 10. 2011]. Dostupné z: <http://www.biolob.cz/cz/taxon/id350657/>

Profil taxonu. *Biolib.cz* [online]. [cit. 21. 10. 2011]. Dostupné z: <http://www.biolib.cz/cz/taxon/id59817/>

Profil taxonu. *Biolib.cz* [online]. [cit. 21. 10. 2011]. Dostupné z: <http://www.biolib.cz/cz/taxon/id174980/>

Profil taxonu. *Biolib.cz* [online]. [cit. 21. 10. 2011]. Dostupné z: <http://www.biolib.cz/cz/taxon/id60370/>

Profil taxonu. *Biolib.cz* [online]. [cit. 21. 10. 2011]. Dostupné z: <http://www.biolib.cz/cz/taxon/id59816/>

Profil taxonu. *Biolib.cz* [online]. [cit. 21. 10. 2011]. Dostupné z: <http://www.biolib.cz/cz/taxon/id60330/>

Lentinic acid. *ChEMbase.com* [online]. [cit. 22. 2. 2012]. Dostupné z: [http://chembase.com/cbid\\_335576.htm](http://chembase.com/cbid_335576.htm)

České houby a.s. *Ceskehouby.cz* [online]. [cit. 22. 2. 2012]. Dostupné z: <http://www.ceskehouby.cz/>

Dřevokazné houby. *ohoubach.blogspot.com* [online]. [cit. 3. 10. 2012]. Dostupné z: <http://ohoubach.blogspot.com/2008/01/saprofyti.html>

Samyco s.r.o. *samyco.cz* [online]. [cit. 10. 5. 2011]. Dostupné z: <http://www.samyco.cz/>

### **Obrázky:**

#### **Obrázek 1:**

[http://www.suite101.com/view\\_image\\_articles.cfm/890598](http://www.suite101.com/view_image_articles.cfm/890598) k 3.10. 2011

#### **Obrázek 2:**

[http://www.namyco.org/cultivation/common\\_cultivars.html](http://www.namyco.org/cultivation/common_cultivars.html) k 3. 10. 2011

#### **Obrázek 3:**

<http://www.vegetablegardener.com/item/4220/how-to-grow-shiitake-mushrooms> k 13.10. 2011

<http://tokyoroot.wordpress.com/2010/02/21/pestovani-hub-shiitake/> k 13.10. 2011

<http://www.vegetablegardener.com/item/4220/how-to-grow-shiitake-mushrooms> k 13.10. 2011

<http://tokyoroot.wordpress.com/2010/02/21/pestovani-hub-shiitake/> k 13.10. 2011

#### **Obrázek 4:**

<http://www.vegetablegardener.com/item/4220/how-to-grow-shiitake-mushrooms> k 13.10. 2011

[http://www.mitoku.com/products/shiitake/img/shiitake003\\_1.jpg](http://www.mitoku.com/products/shiitake/img/shiitake003_1.jpg) k 13.10. 2011

#### **Obrázek 5:**

[http://www.mitoku.com/products/shiitake/img/shiitake002\\_1.jpg](http://www.mitoku.com/products/shiitake/img/shiitake002_1.jpg) k 13.10. 2011

<http://www.vegetablegardener.com/item/4220/how-to-grow-shiitake-mushrooms>  
k 1.11. 2011

#### **Obrázek 6:**

<http://www.all-creatures.org/recipes/i-mushrooms-shiitake-dry.html> k 16.10. 2011

#### **Obrázek 8:**

[http://www.dia-potravinny.cz/hliva\\_ustricna.html](http://www.dia-potravinny.cz/hliva_ustricna.html) k 1.11. 2011

<http://vademecum-zdravi.cz/pecarka-neboli-zampion> k 1.11. 2011

[http://www.jarsvoboda.cz/ilustrace\\_hub.html](http://www.jarsvoboda.cz/ilustrace_hub.html) k 1.11. 2011

<http://www.idsystem.cz/mushrooms/jardasvoboda/js0002.htm> k 1.11. 2011

#### **Obrázek 10:**

<http://uk.solgar.com/SolgarProducts/Reishi-Shiitake-Maitake-Mushroom-Extract-Vegetable-Capsules.htm> k 3.1. 2012

[http://www.roblamberton.com/?page\\_id=41](http://www.roblamberton.com/?page_id=41) k 3.1. 2012

<http://www.supersup.com/natures-way-shiitake-maitake-100-mg-60-capsules-033674645000> k 3.1. 2012

<http://www.drugstore.com/natures-plus-source-of-life-garden-vitamin-c-vegetarian-capsules/qxp318617> k 3.1. 2012

**Obrázek 11:**

<http://www.vegeta.com/recipes/sweet-sour-soup-in-wok> k 3.1. 2012

<http://www.schweizerfamilie.ch/kochen/rezpte-aus-aller-welt/gegrillte-pilze-66715>  
k 3.1. 2012

<http://kulinariakatastrophia.blogspot.de/tag/pilze> k 3.1. 2012

<http://ohmyomiyage.wordpress.com/2011/11/30/shiitake-tea-from-a-mountain-temple/>  
k 3.1. 2012

**Obrázek 14:**

<http://www.svims.ca/council/illust/Micromphale%20perforans%203%20Steve%20Trudell.htm> k 3.1. 2012

[http://www.fungoceva.it/tav\\_collybia\\_hariolorum.htm](http://www.fungoceva.it/tav_collybia_hariolorum.htm) k 3.1. 2012

**Obrázek 19:**

[http://www.neubert-glas.de/laborglas/onlineshop/katalog\\_php/1\\_995727484085\\_1030342896125\\_997508385770/1249034082339/Likens-Nickerson-Apparatur.html](http://www.neubert-glas.de/laborglas/onlineshop/katalog_php/1_995727484085_1030342896125_997508385770/1249034082339/Likens-Nickerson-Apparatur.html) k 20.1. 2012