

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Přírodovědecká fakulta

# **Ergothionein–biologicky aktivní sekundární metabolit hub**

Bakalářská práce

**Daniel Málek**

Vedoucí práce: Ing. Petra Bittnerová, Ph.D.

(Katedra aplikované chemie, FZT JU)

České Budějovice

2023

Málek, D., 2023: Ergothionein–biologicky aktivní sekundární metabolit hub. [Ergothioneine – a biologically active secondary metabolite of fungi. Bc. Thesis, in Czech.] – 30 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

## **Annotation**

The theoretical part of the Bachelor thesis is focused on fungi of the family *Pleurotaceae*, their significance, occurrence and usage. To a greater extent it deals with ergothioneine, its biological and chemical properties, usage and occurrence.

In the experimental part, ergothioneine was extracted from the fruiting bodies of *Pleurotus ostreatus*. Components in the extract were analyzed by liquid chromatography and a new method suitable for ergothioneine isolation has been developed.

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem autorem této kvalifikační práce a že jsem ji vypracoval pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu použitých zdrojů.

V Českých Budějovicích,

dne 14. 4. 2023

.....

Daniel Málek

### **Klíčová slova**

Ergothionein, aminokyselina, antioxidant, biochemie, biomedicínské využití, biogeneze, extrakce, izolace, hlíva ústříčná, *Pleurotus ostreatus*, kapalinová chromatografie

### **Key words**

Ergothioneine, amino acid, antioxidant, biochemistry, biomedical applications, biogenesis, extraction, isolation, oyster mushroom, *Pleurotus ostreatus*, liquid chromatography

Tato práce vznikla za finanční podpory Grantové agentury Jihočeské univerzity (projekt GAJU 080/2022/Z).

## **Poděkování**

Dovolte mi tímto poděkovat vedoucí mé bakalářské práce, Ing. Petře Bittnerové, Ph.D., za usilovnou práci, ochotu, trpělivost, odhodlání a cenné rady, s nimiž vedla moji bakalářskou práci.

Dále bych rád poděkoval prof. Ing. Romanu Kubcovi, Ph.D. a Mgr. Ivetě Štefanové, Ph.D. za příjemné prostředí a ochotu, s níž poskytovali cenné rady v experimentální části.

Nakonec patří velké díky mé rodině a přátelům, bez jejichž pomoci a podpory bych neměl možnost nadále studovat na JU.

# Obsah

<b>1</b>	<b>ÚVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>CÍLE PRÁCE</b> .....	<b>2</b>
<b>3</b>	<b>TEORETICKÁ ČÁST</b> .....	<b>3</b>
3.1	ROD <i>PLEUROTUS</i> .....	3
3.1.1	<i>Charakteristika Pleurotus ostreatus</i> .....	3
3.1.2	<i>Růst a pěstování</i> .....	4
3.1.3	<i>Nutriční hodnoty a využití v medicíně</i> .....	4
3.2	L-(+)-ERGOTHIONEIN .....	6
3.2.1	<i>Historie objevu</i> .....	6
3.2.2	<i>Výskyt a potravní zdroje</i> .....	6
3.2.3	<i>Biochemické a fyzikální vlastnosti</i> .....	7
3.2.4	<i>Biogeneze L-ergothioneinu</i> .....	8
3.2.5	<i>Biomedicínské využití</i> .....	9
3.2.6	<i>Možnosti stanovení ESH v plodnicích hub</i> .....	10
<b>4</b>	<b>EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST</b> .....	<b>13</b>
4.1	HOUBOVÝ MATERIÁL.....	13
4.2	POUŽITÉ PŘÍSTROJE A CHEMIKÁLIE .....	13
4.2.1	<i>Přístroje</i> .....	13
4.2.2	<i>Chemikálie</i> .....	13
4.2.3	<i>Použitý software</i> .....	14
4.3	METODY A POSTUPY .....	14
4.3.1	<i>Příprava vzorků pro extrakci</i> .....	14
4.3.2	<i>Metody extrakce látek z Pleurotus ostreatus</i> .....	14
4.3.3	<i>Přečištění extraktu</i> .....	15
4.3.4	<i>Příprava vzorku na preparativní HPLC</i> .....	16
4.3.5	<i>Odsolení ergothioneinu po preparativní HPLC</i> .....	16
4.3.6	<i>Chromatografické metody</i> .....	17
<b>5</b>	<b>VÝSLEDKY</b> .....	<b>18</b>
5.1	VÝBĚR EXTRAKČNÍHO ČINIDLA A POSTUPŮ EXTRAKCE.....	18
5.2	PŘEČIŠTĚNÍ EXTRAKTU .....	18
5.3	OPTIMALIZACE METODY PRO PREPARATIVNÍ HPLC .....	20
5.4	PREPARACE ESH .....	20
<b>6</b>	<b>DISKUZE</b> .....	<b>23</b>

<b>7</b>	<b>ZÁVĚR</b> .....	<b>24</b>
<b>8</b>	<b>SHRNUTÍ</b> .....	<b>25</b>
<b>9</b>	<b>SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK</b> .....	<b>25</b>
<b>10</b>	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY</b> .....	<b>26</b>
10.1	KNIŽNÍ ZDROJE .....	26
10.2	INTERNETOVÉ ZDROJE .....	26

# 1 Úvod

Hlíva ústříčná (*Pleurotus ostreatus*) je jedním z druhů rodu *Pleurotus*, který patří do řádu Agaricales. Je to dřevokazná, jedlá houba charakteristicky vázaná na kmeny listnatých stromů, hlavně dubu. Rozšířená je globálně s výjimkou Antarktidy. Pro své bohaté složení našla využití v gastronomii převážně asijských a evropských zemí. Tento druh obsahuje velké množství proteinů, polysacharidů, aminokyselin a jiných látek s hypocholesterolemickým působením, včetně lovastatinu. Další velmi významnou složkou je derivát histidinu obsahující síru, L-ergothionein. Ten je pro své antioxidační účinky vhodnou látkou pro boj proti reaktivním formám kyslíku a taky se u něj ukazuje vysoký potenciál v medicíně, zvláště u tzv. civilizačních chorob. Hlíva ústříčná patří spolu s pečárkou dvouvýtrusou (žampion, *Agaricus bisporus*) mezi nejčastěji kultivované druhy hub na světě (Piska et al. 2017).

## 2 Cíle práce

Cílem teoretické části bylo vypracovat literární rešerši zaměřenou na výskyt, biochemii a možnosti stanovení obsahu ergothioneinu v plodnicích hub.

V experimentální části bylo cílem práce vypracovat postup vedoucí k izolaci ergothioneinu z vybraných druhů hub a získané výsledky poté vyhodnotit, vhodně zdokumentovat a diskutovat.



## 3 Teoretická část

### 3.1 Rod *Pleurotus*

Rod *Pleurotus* (hlíva) je jeden z několika rodů nacházejících se v čeledi Pleurotaceae (hlívovité), která je součástí řádu Agaricales (pečárkotvaré). Celý řád je pak systematicky zařazen do třídy Agaricomycetes (stopkovýtrusé) a říše Fungi (houby). Do rodu *Pleurotus* patří více než 45 druhů hlív, včetně *P. ostreatus* (**Obr. 1**).



**Obr. 1:** *Pleurotus ostreatus* (česká nomenklatura: hlíva ústříčná).<sup>a</sup>

#### 3.1.1 Charakteristika *Pleurotus ostreatus*

Hlívu ústříčnou poprvé popsal holandský přírodovědec Nikolaus J. Freiherr von Jacquin v roce 1775. Tehdy ji zařadil do rodu *Agaricus*, stejně jako byla zařazena většina žábrových hub. Z tohoto důvodu byl tento druh hlívy pojmenován *Agaricus ostreatus*. V roce 1871 byl německým mykologem Paulem Kummerem definován nový rod *Pleurotus*. Ve stejný rok také převedl *Agaricus ostreatus* do tohoto rodu a pojmenoval ji *Pleurotus ostreatus*, jenž je nyní současným uznávaným vědeckým názvem (Hadar 2021).

*Pleurotus ostreatus*, neboli hlíva ústříčná, je dřevokazná houba, kloboukem dorůstající 5–15 cm. Barva klobouku bývá šedá až hnědá. Třeň je dlouhý 1,5–2 cm a široký 1,8–2 cm (Deepalakshmi et al. 2014; ČMS<sup>b</sup>).

<sup>a</sup><https://cz.depositphotos.com/121145140/stock-photo-pleurotus-ostreatus-on-white-background.html> [15.1. 2023]

<sup>b</sup>ČMS = Česká mykologická společnost

Plodnice rostou hojně v trsech nebo střešovité nad sebou. Je to dřevokazná houba rostoucí na živých i mrtvých kmenech převážně listnáčů, jako jsou duby, ořešáky, občasně i topoly (Piska et al. 2017). Stromy poškozují bílou hnilobou (Valíček 2011).

### 3.1.2 Růst a pěstování

Kultivace hlívy byla vyvinuta v Německu během první světové války, kdy byly houby shledány jako nový zdroj potravy během hladomorů (Piska et al. 2017). V 60. letech 20. století se poté v pěstování pokračovalo hlavně v Číně, Thajsku, Pákistánu, Nigérii, USA nebo na Filipínách. Tyto země jsou dnes jedny z největších vývozců *P. ostreatus*.

Pěstování hlívy ústřičné je relativně jednoduché a může být prováděno i v domácích podmínkách. Tyto houby jsou vázány na určité druhy stromů a preferují mírné až subtropické oblasti. Komerční mycelium je založeno na využití různých organických lignocelulózových štěpů, jako je například sláma, kukuřičná vřetená nebo papír, které musí být sterilizovány. K rozkladu lignocelulózových odpadů využívá *P. ostreatus* systém enzymů, a to převážně laktázu, celulózu a peroxidázu (Jablonský et al. 2019).

Pro růst *P. ostreatus* jsou důležité faktory jako teplota, pH a světlo. Optimální teplota pro klíčení je přibližně 28 °C a pro růst se pohybuje v rozmezí 18–22 °C, přičemž teploty pod 0 °C mycelium sice nezničí, ale zpomalí jeho vývoj. Ideální pH růstu se pohybuje kolem 5,5–6,5 a je nutné ho upravovat přidávkou vápence kvůli okyselování prostředí vlivem růstu mycelia. Světlo není během kolonizace mycelia natolik potřebné, pro vývoj plodnic však důležité je (Jablonský et al. 2019).

### 3.1.3 Nutriční hodnoty a využití v medicíně

Hlíva ústřičná obsahuje 89,2 % vody. Zbytek (sušina) zaujímá široké spektrum významných skupin látek. Ty byly shrnuty podle dat z USDA (U.S. Department Of Agriculture) z roku 2019 a Deepalakshmi et al. (2014) do tabulky (**Tab. I**). Množství jednotlivých látek se samozřejmě liší v závislosti na použitém substrátu, času sklizně, stáří houby a dalších faktorech.

**Tab. I:** Obsah nutričně významných látek v hlívě ústříčné.

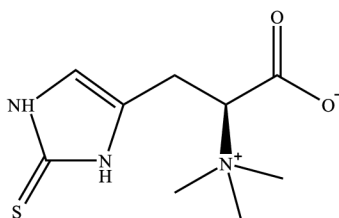
Skupina látek	Množství [g/100 g sušiny]	Příklady látek
sacharidy	56,4	glykogen, vláknina, celulóza, chitin, glukany, manany
bílkoviny	21,9-45,0	komplexní bílkoviny
vitamíny, minerální látky	4,0-8,9	<b>vitamíny:</b> B1, B2, C, D2, thiamin, riboflavin, pyridoxin, kyselina pantotenová, nikotinová, listová, kobalamin, ergosterol, biotin, tokoferol, <b>minerální látky:</b> měď, železo, draslík, hořčík, fosfor, zinek a sodík
vláknina	13,9-31,5	n.h.
lipidy	2,6-6,1	<b>mononenasyčená MK:</b> kyselina olejová <b>polynenasycené MK:</b> kyselina linolová (prekurzor vůně sušených hub), kyselina arachidonová
aminokyseliny	25,6	<b>neesenciální:</b> Gly, Ala, Cys, Asp, His, Arg <b>esenciální:</b> Thr, Val, Met, Ile, Trp a další <b>neproteinogenní:</b> GABA (neurotransmitter)

Hlívě jsou přisuzovány antibakteriální (pleuran), antivirotické (lakáza působící proti hepatitidě C), antidiabetické, antioxidační, antihypercholesterolové, protinádorové a imuno-modulační účinky (Deepalakshmi et al.2014).

## 3.2 L-(+)-Ergothionein

Ergothionein (ESH), zobrazený na **Obr. 2**, je přirozeně se vyskytující L-histidinový derivát, *N*( $\alpha$ ),*N*( $\alpha$ ),*N*( $\alpha$ )-trimethyl-L-histidin, ve kterém je vodík, nacházející se na druhé poloze na imidazolovém kruhu, nahrazen sulfanylovou skupinou. Systematický název ESH je (2*S*)-3-(2-sulfanyliden-1,3-dihydroimidazol-4-yl)-2-(trimethylazaniumyl)propanoát.

ESH je látka, která má silné antioxidační účinky. Je syntetizována různými mikroorganismy a houbami. Rostliny ani zvířata nejsou schopni tuto aminokyselinu syntetizovat, a proto jsou nuceni ji získávat z půdy, resp. prostřednictvím stravy (Kalač 2021).



**Obr. 2:** Struktura molekuly L-Ergothioneinu.

### 3.2.1 Historie objevu

První zmínka o ergothioneinu pochází z roku 1909, kdy ji Charles Tanret objevil v námelu *Claviceps purpurea* (paličkovice nachová), který devastoval žitná zrna. Po izolaci této látky identifikoval roku 1911 její strukturu a tuto krystalickou látku obsahující síru podle místa výskytu pojmenoval ergothionein (ergot–námel; thiol–SH skupina) (Halliwell a Cheah, 2022).

### 3.2.2 Výskyt a potravní zdroje

Nejbohatším zdrojem ESH ve volné přírodě jsou plodnice hub, zejména pak houževnatec jedlý (*L. edodes*, známý též jako shii–take), hlíva ústříčná (*P. ostreatus*) a pečárka dvouvýtrusá (*A. bisporus*). Vysoký obsah je pak také v tempehu (fermentovaný výrobek ze sóji) (Kalač, 2021). Kalač ve své přehledové práci také shrnul obsah ergothioneinu v některých druzích hub (**Tab. II**).

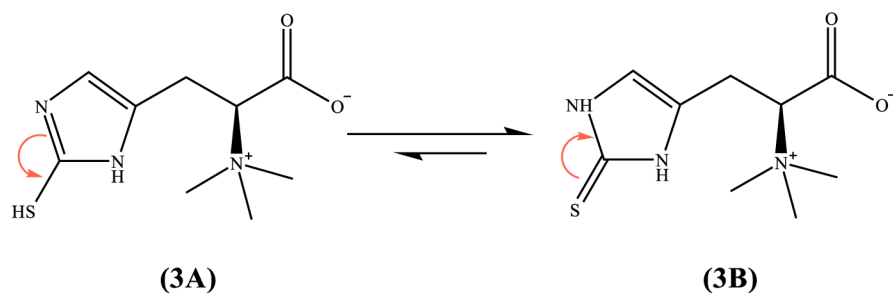
**Tab. II:** Množství ESH ve 100 g sušiny některých druhů hub.

Český název	Latinský název	Obsah ESH v mg/100 g sušiny
bělečehratka obrovská	<i>Leucopaxillus giganteus</i>	170
hlíva citronová	<i>Pleurotus citrinopileatus</i>	312–394
hlíva máčková	<i>Pleurotus eryngii</i>	62–141
hlíva ústříčná	<i>Pleurotus ostreatus</i>	94–378
hnojník obecný	<i>Coprinus comatus</i>	76–258
houževnatec jedlý (shiitake)	<i>Lentinula edodes</i>	33–198
hřib smrkový	<i>Boletus edulis</i>	49–727
korálovec ježnatý	<i>Hericium erinaceus</i>	56–1120
kukmák sklepní	<i>Volvariella volvacea</i>	54
liška obecná	<i>Cantharellus cibarius</i>	20
pečárka dvouvýtrusá	<i>Agaricus bisporus</i>	21–179
pečárka mandlová	<i>Agaricus subrufescens</i>	0–3,9
pečárka polní	<i>Agaricus campestris</i>	99
penízovka sametonohá	<i>Flammulina velutipes</i>	10–67
smrž obecný	<i>Morchella esculenta</i>	47
šupinovka nameko	<i>Pholiota nameko</i>	23

### 3.2.3 Biochemické a fyzikální vlastnosti

Ergothionein je poměrně stabilní sloučenina. Čistý ESH je velmi stálý vůči působení světla, teplotě do 100 °C až po dobu 24 hod, kyselému a zásaditému prostředí. Za přítomnosti mědnatých iontů jeho stabilita klesá (Liu 2020; Kitsanayanyong et al. 2022). Teplota tání se pohybuje v rozmezí 275–277 °C (AlfaChemistry 2023). Molekulová hmotnost ESH je 229,086 g/mol a maximum v absorpčním spektru se pohybuje kolem  $\lambda = 260$  nm (Tsiantas et al, 2021).

ESH je bílá krystalická látka dobře rozpustná ve vodě (vodný roztok je bezbarvý). V roztoku se zároveň nachází ve dvou tautomerech zobrazených na **Obr. 3**. Cheah a Halliwell (2012) ve své práci uvedli, že v prostředí o fyziologickém pH převládá thion forma, čímž získává ESH své antioxidační vlastnosti.



**Obr. 3:** Tautomerie ESH; **A:** THIOL forma, **B:** THION forma

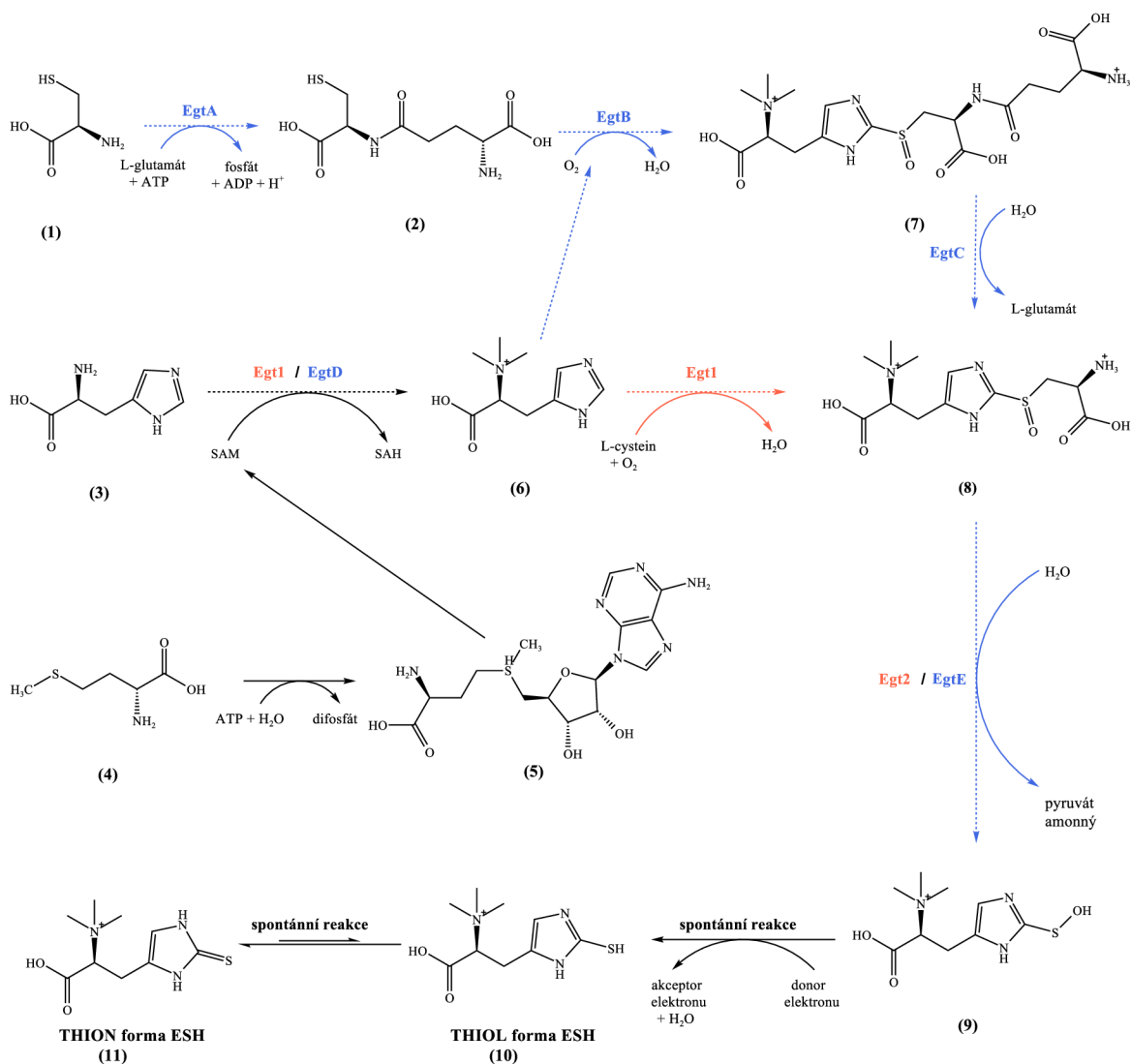
### 3.2.4 Biogeneze L-ergothioneinu

Schopnost syntetizovat ESH mají v přírodě jen určité druhy organismů, jako jsou bakterie, houby, kvasinky, cyanobakterie, aktinomycety a některé rostliny. Živočichové tuto schopnost nemají (Kalač 2021). Na začátku biosyntézy je prekurzorem aminokyselina histidin, dále se zapojují aminokyseliny methionin a cystein.

Syntéza ESH probíhá ve dvou reakčních cestách – bakteriální a houbová. Obě reakční schémata jsou zobrazena na **Obr. 4** (van der Hoek et al. 2019 a 2022, Zhu 2022). Syntézy ESH se zpočátku účastní L-histidin, L-cystein a tři methylové skupiny získané z *S*-adenosylmethioninu (SAM) vzniklého z methioninu (**4**).

U bakterií je celý proces řízen enzymy vytvářených pěti geny (EgtA-E). L-Cystein (**1**) je za přítomnosti L-glutamátu a ATP přeměněn na  $\lambda$ -L-glutamyl-L-cystein (**2**). Mezitím je L-histidin (**3**) za přítomnosti SAM (**5**) methylován na hercinin (**6**), který pak spolu s  $\lambda$ -L-glutamyl-L-cysteinem reaguje za tvorby  $\gamma$ -L-glutamyl-*S*-(hercin-2-yl)-L-cystein-*S*-oxidu (**7**). Ten hydrogenací a za uvolnění L-glutamátu vytvoří *S*-(hercin-2-yl)-L-cystein-*S*-oxid (**8**), který ztrátou pyruvátu amonného za přítomnosti  $\beta$ -lyázy vytvoří 2-(hydroxysulfanyl) hercinin (**9**). Následující reakce pak probíhají spontánně a vedou ke vzniku obou tautomerů ESH (**10,11**) s převahou THION formy (předpokládáme fyziologické pH). Syntéza ESH v houbách je řízena dvěma geny (Egt1-2). L-Histidin (**3**) je za přítomnosti SAM (**5**) methylován na hercinin (**6**). Enzym genu Egt1 poté za přítomnosti O<sub>2</sub> naváže L-cystein (**1**) za vzniku HCO (**8**). Syntéza je poté stejná jako u bakterií.

Komerčně se pro výrobu ESH používá geneticky upravená kultura fakultativně methylotrofních bakterií *Methylobacterium species* (Alamgir et al. 2015).



**Obr. 4:** Biogeneze ESH bakteriální a houbovou cestou.

### 3.2.5 Biomedicínské využití

Zvířata a lidé si pro ESH vytvořili vysoce selektivní přenašeč ETT (ergothioneine transporter), známý také jako OCTN1, nacházející se v plazmatické membráně (Cheah a Haliwell 2012; Markova et al. 2009; Kitsanayanyong et al. 2022). Množství přenašeče ETT je v plazmatických membránách jednotlivých tkáních odlišný. Více se nachází v plazmatických membránách buněk, které snáze podléhají oxidativnímu stresu (např. v neuronech nebo erythrocytech). Borodina et al. (2020) si ve své práci dále všimá snížené koncentrace ESH během mnoha chronických zánětlivých onemocnění. Důvodem je zapojení ESH do ochrany buněk a s tím spojená jeho degradace.

Smith et al. (2020) zmínil ve své práci dlouholetou švédskou studii probíhající 21 let. V krevní plazmě více než 3200 účastníků bylo stanoveno 112 ukazatelů. Výsledkem bylo zjištění, že ESH má významný vliv v řadě civilizačních chorob. Čím vyšší byla jeho hladina, tím nižší byla pravděpodobnost vzniku srdečních poruch a úmrtnosti na tato onemocnění (Kalač 2021).

Borodina et al. (2020) dále ve své práci shrnuje v několika bodech vliv ESH při různých zdravotních problémech. ESH může působit proti různým reaktivním formám kyslíku, jako jsou například peroxid, superoxid, hydroxylový radikál, apod. U hlodavců snižuje oxidační stres v buňkách jater a ledvin, chrání buňky před apoptózou vyvolanou  $\beta$ -amyloidem (např. u neuronů), buněčnou smrtí způsobenou kyselinou palmitovou i peroxidem vodíku, dysfunkci vyvolanou chloridem rtuťnatým, poškození DNA mědí. Dále snižuje toxicitu vyvolanou pyrogalolem, oxaplatinou apod. Mimo akutní problémy je ESH schopen působit i proti chronickým onemocněním. Příklady těchto onemocnění mohou být chronická obstrukční plicní nemoc, preeklampsie, hyperhydratovaná dědičná stomatocytóza či leukémie. Vyšší hodnota ESH je rovněž spojena s nižší pravděpodobností výskytu koronárního a kardiovaskulárního onemocnění. ESH má také značný vliv i na rozvoj neurologických a kognitivních funkcí, jako jsou Alzheimerova choroba, nebo Parkinsonova choroba. Značně rozdílné hodnoty ESH byly vyzorovány i u syndromu náhlého úmrtí kojenců. Ergothionein má pozitivní vliv i na progresi a zmírnění následků nemoci COVID-19 způsobené koronavirem SARS-CoV-2, jak sepisují ve své práci Cheah a Halliwell (2020). Dále se předpokládá o roli ESH jako kofaktoru v důsledku jeho zapojení do biosyntézy linkosamidového antibiotika linkomycinu či jeho role v udržování sníženého množství Fe a Cu v těle (Borodina et al. 2020).

### 3.2.6 Možnosti stanovení ESH v plodnicích hub

Od doby objevu ESH se stihlo vyvinout mnoho extrakčních metod a postupů vedoucí k izolaci čistého ESH. Vzhledem k polaritě ESH se využívají jako extrakční činidla methanol (Sapozhnikova et al. 2014 a Tsiantas et al. 2021), ethanol (Tao et al. 2021), popř. ethanol s příměsí dalších látek zabraňující oxidaci ESH jako jsou 1,4-dithiothreitol, betadin a 1-methyl-2-sulfanyl imidazol (Dubost et al. 2006, Chen et al. 2012, Woldegiorgis et al. 2012, Chilanti et al. 2022) a voda (Zhou et al. 2014, Zhang et al. 2016, Qi et al. 2016, Pang et al. 2021 a Nguyen et al. 2012).



Analytická měření pak probíhala za využití kolon s různými stacionárními fázemi. Ve všech studiích bylo měřeno při vlnových délkách v rozmezí od 254–260 nm.

Nejčastěji používaná byla kolona se stacionární fází C18 (Dubost et al. 2006, Woldegiorgis et al. 2012, Bhattacharya et al. 2014, Zhou et al. 2014, Zhang et al. 2016, Tsiantas et al. 2021, Nquyen et al. 2012 a Chilanti et al. 2022).

Další kolony používané pro měření ESH byly HILIC kolona (Qi et al. 2016 a Tao et al. 2021), kolona C8 (Sapozhnikova et al. 2014), kolona NH<sub>2</sub> (Pang et al. 2021, Nyquen et al. (2012) a kolona PFP (Chen et al. 2012, Dubost et al. 2006).

Bližší informace o některých možnostech stanovení byly pro lepší přehlednost sepsány do **Tab. III.**

Tab. III: Shrnutí metod možností extrakcí a HPLC měření při stanovení ESH.

DRUH	EXTRAKČNÍ ČINIDLO	EXTRAKCE	KOLONA TEPLOTA / OBJEM NÁSTRÍKU	MOBILNÍ FÁZE PRÚTOK	ČAS GRAD.	DETEKTOR VLN. DÉLKA	MNOŽSTVÍ ESH	AUTOR
<i>P. citrinopileatus</i>	vodný roztok methanolu (1:4)	míchání (20 min), centrifugace	C18 (100 × 2,1 mm, 3,5 μm) 25 °C / 10 μl	A: voda + 0,1% HCOOH (30 %); B: acetonitril (70 %) 0,2 ml/min	15 min	MS/MS (100–350 m/z) UV-Vís (260 nm)	88,45 mg/kg s.v.	Tsiantas et al. (2021)
<i>P. ostreatus</i>	vodný roztok methanolu (4:1) + 10 μg ISTD methimazolu	míchání (20 min), centrifugace	C8(2) (100 × 4,6 mm, 3,5 μm) 30 °C / 20 μl	A: voda + 0,1% HCOOH (30 %); B: methanol (70 %) 0,4 ml/min	5 min	MRMs (230,2–127,1 m/z) UV-Vís (n.h.)	9,7–10,4 mg/g s.v.	Sapozhnikova et al. (2014)
<i>F. velutipes</i>	ethanol (70%)	vodní lázeň (15min), centrifugace, RVO (do 1/4), ethanol (95%), RVO (do sucha)	HILIC (250 × 4,6 mm, 5 μm) n.h. / 10 μl	A: voda (3 %); B: acetonitril (97 %) 1,0 ml/min	n.h.	N.H. UV-Vís (254 nm)	15,29 mg/g extraktu	Tao et al. (2021)
<i>A. bisporus</i>	ethanol (70%) + 10 mM DTT, 100 μM betain, 100 μM MMI	mixování, centrifugace, RVO pod N <sub>2</sub> (do sucha), rozpuštění (H <sub>2</sub> O), centrifugace	C18 (250 × 4,6 mm, 5 μm) N.H. / 10 μl	A: voda + 50 mM fosfát sodný (97 %) B: acetonitril + 0,1% triethylamin (3 %) 1 ml/min	n.h.	LC-MS (252 m/z) UV-Vís (254 nm)	0,4–2,0 mg/g s.v.	Dubost et al. (2006)
<i>P. ostreatus</i>	ethanol (70%) + 10 mM DTT, 100 μM betain, 100 μM MMI	míchání (90 s), přidání 10g/l dodecyl sulfátu, centrifugace, RVO (do 5 ml)	PPFP(2) (250 × 4,6 mm, 5 μm) n.h. / n.h.	voda + 500 mmol/l fosfát sodný; 30ml/l acetonitril + 1 ml/l triethylamin 1ml/min	n.h.	n.h. UV-Vís (254 nm)	2,85 mg/g s.v.	Chen et al. (2012)
<i>Pleurotus ssp.</i>	ethanol (70%) + 10 mM DTT, 100 μM betain, 100 μM MMI	míchání (90 s), přidání 2 ml dodecyl sulfátu a 1 ml ethanolu, míchání, centrifugace, lyofilizace, rozpuštění (H <sub>2</sub> O), filtrace (0,22um)	C18 (150 × 4,6 mm, 5 μm) 30 °C / 10 μl	A: 0,7% dibazický fosfát sodný (97 %), B: acetonitril + 0,1% triethylamin (3 %) 0,4 ml/min	n.h.	n.h. UV-Vís (254 nm)	0,9–295,3 mg/100g s.v.	Chilanti et al. (2022)
<i>P. ostreatus</i>	ethanol (70%) + 10 mM DTT, 100 μM betain, 100 μM MMI	míchání (10 s), přidání 2 ml 1% dodecyl sulfátu a ethanolu, míchání, centrifugace, lyofilizace, rozpuštění (H <sub>2</sub> O)	C18 (250 × 4,6 mm, 5 μm) n.h. / 10 μl	50mM dibazický fosfát sodný (97 %), acetonitril + 0,1% triethylamin 0,4 ml/min	n.h.	DAD (254 nm)	3,78 mg/g s.v.	Woldegiorgis et al (2014)
n.h.	voda (90 °C)	míchání, filtrace	C18 (250 × 4,6 mm, 5 μm) 25 °C / 5 μl	1% methanol + kyselina boritá 0,7 ml/min	n.h.	MS (230 m/z) UV-Vís (257 nm)	n.h.	Zhou et al. (2014)
<i>P. ostreatus</i>	voda (90 °C)	míchání (30 min), filtrace	C18 (250 × 4,6 mm, 5 μm) 25 °C / 5 μl	1% methanol + kyselina boritá 0,7 ml/min	n.h.	UV-Vís (257 nm)	109,97 ± 2,75 mg/l ex.	Zhang et al. (2016)
<i>P. ostreatus</i>	voda (90 °C)	míchání, filtrace	HILIC (250 × 4,6 mm, 5 μm) 40 °C / 10 μl	20 mmol/l acetonitril, acetát amonný (85:15), kyselina octová 1,0 ml/min	n.h.	ESI-MS (228,08 m/z) UV-Vís (254 nm)	172 mg/l ex.	Qi et al. (2016)
<i>P. ostreatus</i>	voda (100 °C)	filtrace, RVO (1/3), homogenizace 95% ethanolom, odstáto 24 hod, centrifugace, RVO (do vypaření ethanolu), lyofilizace, rozpuštění (H <sub>2</sub> O)	NH <sub>2</sub> (250 × 4,6 mm, 5 μm) 30 °C / 10 μl	A: acetonitril (80 %), B: 50mM acetát sodný 1 ml/min	n.h.	ESI-MS (230 m/z) UV-Vís (254 nm)	191,6 mg/100 g s.v.	Pang et al. (2021)
<i>P. eryngii</i>	voda (95 °C)	centrifugace, RVO (do sucha) homogenizace 70% vodných ethanolom, míchání, odstáti, centrifugace, RVO (do vypaření ethanolu), homogenizace (H <sub>2</sub> O), přidání 1 ml methimazolu ve vodě (2 mg/ml), míchání, centrifugace, RVO	C18 (250 × 4,6 mm, 5 μm) 40 °C / 20 μl	10% methanol + 0,1% kyselina mravenčí 0,2 ml/min	n.h.	ESI-MS (230 m/z) PDA (254 nm)	234,85 ± 9,75 mg/kg č.v.	Nguyen et al. (2012)
s.v.: suchý vzorek (sušina) č.v.: čerstvý vzorek UV-Vís: viditelné a ultrafialové záření n.h.: nejsou hodnoty m/z: poměr hmotnost náboj		DDT: 1,4-dithiothreitol MMI: 2-mercapto-1-methylimidazol MRMs: monitorování více reakcí MS: hmotnostní spektrometrie ex.: extrakt	ESI-MS: ionizace elektrospřejem spojená s hmotnostním spektrometrem DAD: detektor s polem diod LC-MS: kapalinová chromatografie (LC) a hmotnostní spektrometrie (MS) MS-MS: tandemová hmotnostní spektrometrie					

## 4 Experimentální část

### 4.1 Houbový materiál

V experimentální části této práce byly použity plodnice hlívy ústříčné (*P. ostreatus*), které byly získány od společnosti České houby a.s. (Nová 538, 392 01 Soběslav). Houby byly zpracovány pár hodin po sklizni.

### 4.2 Použité přístroje a chemikálie

#### 4.2.1 Přístroje

Chromatografické separace analytů byly prováděny na přístroji 1260 Infinity II preparative (**Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA**) s detektorem 1260 Infinity II PDA WR.

Pro analytickou separaci a následnou detekci pomocí PDA a MS (UHPLC-PDA-MS/MS) byl použit systém UHPLC Ultimate3000, MS LTQ XL (**ThermoFisher Scientific**). Systém využívá vysokotlaké binární pumpy HPG-3200SD a detektor diodového pole PDA-3000 a hmotnostní spektrometr na principu lineární iontové pasti od společnosti **ThermoFisher Scientific**.

Kolony použité při analytickém měření na HPLC:

- LC kolona Biphenyl (250 × 4,6 mm, 5 μm) od firmy **Kinetex®**
- LC kolona Phenyl-Hexyl (250 × 4,6 mm, 5 μm) od firmy **Kinetex®**
- Microsorb-MV C18 (250 × 4,6 mm, 5 μm) od firmy **Varian**
- Microsorb-MV C8 (250 × 4,6 mm, 5 μm) od firmy **Varian**
- RP-Amide (250 × 4,6 mm, 5 μm) od firmy **Ascentis®**

Kolona použitá pro preparativní HPLC:

- Microsorb C8 Dynamax (250 × 21,4 mm, 5 μm) od firmy **Varian**

#### 4.2.2 Chemikálie

Pro extrakci ergothioneinu z plodnic *P. ostreatus* byly použity methanol (≥99,9%), acetonitril (≥99,9%) od firmy **Honeywell** (Charlotte, USA), aktivní uhlí od společnosti

**Fluka** (Buchs, Švýcarsko), dichlormethan (99,8%) od společnosti **RCI Lab-Scan** (Bangkok, Thajsko) a destilovaná voda.

Pro přečištění ESH byly použity kolony anexu (Dowex 1x8, 200–400 mesh) a katexu (IR-120 H<sup>+</sup>, 16–45 mesh) od výrobce **Acros Organics** (Geel, Belgie), kyselina octová (99%), hydroxid amonný (24%) od společnosti **Penta** (Praha, Česká republika) a destilovaná voda.

Pro chromatografické měření byly použity jako mobilní fáze methanol ( $\geq 99,9\%$ ), a acetonitril ( $\geq 99,9\%$ ) od firmy **Honeywell** (Charlotte, USA). Dále kyselina mravenčí (98%) od společnosti **Lach–Ner, s.r.o.** (Neratovice, Česká republika) a dihydrogenfosforečnan draselný p.a. (99%) od společnosti **Penta** (Praha, Česká republika). Standard ESH pocházel od firmy **Sigma–Aldrich** (St. Louis, Missouri, USA).

### 4.2.3 Použitý software

Pro vyhodnocování hmotnostních spekter byl využit software Xcalibur (**Thermo Fisher Scientific**).

Chemické vzorce a reakční schémata byla vytvořena v programu KingDraw Chemical Structure Editor od společnosti **Precision Agriculture technology Co.,Ltd.**

## 4.3 Metody a postupy

### 4.3.1 Příprava vzorků pro extrakci

Čerstvé plodnice hlívy ústříčné, celkem 1016,3 g, byly nakrájeny na menší kousky a vloženy do mrazáku při  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$  na 24 hodin. Po zmražení byly vzorky lyofilizovány při  $-50,6\text{ }^{\circ}\text{C}$  po dobu 72 hod. Suché vzorky byly rozmixovány na jemný prášek.

### 4.3.2 Metody extrakce látek z *Pleurotus ostreatus*

#### Extrakce 1

Navážka 0,5 g suchého prášku *P. ostreatus* byla homogenizována 50 ml roztoku vodného methanolu v poměru 1:4 (voda:methanol). Roztok byl míchán po dobu 20 min při pokojové teplotě. Následovala centrifugace při 4400 rpm po dobu 30 min. Supernatant byl odpařen na rotační vakuové odparce (RVO) při teplotě  $38\text{ }^{\circ}\text{C}$  do vypaření methanolu.

Odparek byl rozpuštěn ve 100 ml vody a filtrován přes Büchnerovu nálevku s filtračním papírem KA1 a SPE C18 kolonu.

### **Extrakce 2**

Metoda byla odvozena od **Extrakce 1**. Při postupu se manipulovalo pouze s poměrem vodného roztoku, který byl nyní tvořen 1:4 (methanol:voda).

### **Extrakce 3**

Tato metoda byla odvozena od **Extrakce 1**. Při postupu se manipulovalo se složením extrakčního roztoku, který byl nyní složen pouze z methanolu.

### **Extrakce 4**

Byl navážen 1 g suchého prášku hlívy ústřičné a homogenizován 50 ml acetonitrilu. Roztok byl promíchán po dobu 20 min. Následovala centrifugace při 4400 rpm po dobu 30 min. Acetonitril v supernatantu byl odpařen na RVO při teplotě 38 °C. Odparek byl rozpuštěn v destilované vodě. Následovala filtrace přes Büchnerovu nálevku s filtračním papírem KA1 a SPE C18 kolonu.

### **Extrakce 5**

Navážka 1 g suchého prášku *P. ostreatus* byla homogenizována v 50 ml destilované vody. Roztok byl míchán po dobu 20 min a poté centrifugován při 4400 rpm po dobu 20 min. Supernatant byl extrahován v dělicí nálevce 3 × 20 ml dichlormethanu. Organická fáze byla spojena a odpařena pomocí RVO do sucha. Odparek byl rozpuštěn ve vodě a přefiltrován přes Büchnerovu nálevku s filtračním papírem KA1 a SPE C18 kolonou.

## **4.3.3 Přečištění extraktu**

### **Přečištění extraktu aktivním uhlím**

Byl navážen 1 g suchého prášku *P. ostreatus* a homogenizován v 50 ml methanolu. Roztok byl promíchán po dobu 20 min. Následovala centrifugace při 4400 rpm po dobu 30 min. Supernatant byl odpařen na RVO při teplotě 38 °C do sucha. Odparek byl rozpuštěn v 50 ml H<sub>2</sub>O a bylo přidáno malé množství aktivního uhlí. Následovala filtrace přes Büchnerovu nálevku s filtračním papírem KA1 a SPE C18 kolonu.

#### **Přečištění extraktu na katexu IR-120**

Katex byl aktivován 10% kyselinou chlorovodíkovou a před nanášením vzorku bylo upraveno pH v koloně promytím vodou na pH 3,0. Výška kolony činila 3,5 cm a šířka 3 cm. Vzorek byl přefiltrován přes filtrační papír KA2. Hodnota pH vzorku byla upravena na pH 3,0. Na kolonu bylo nanášeno celkem 75 ml vzorku. Katexová kolona byla poté promyta 250 ml destilované vody. Pro eluci ESH z kolony byl použit 0,2M roztok NH<sub>4</sub>OH. Frakce byly jímány po 40 ml. U všech frakcí bylo upraveno pH na hodnotu 5,0.

#### **Přečištění extraktu na anexu Dowex 1x8**

Dowex 1x8 byl aktivován roztokem 10% kyselinou octovou. Výška kolony činila 12 cm a šířka 2 cm. Bylo upraveno pH kolony na hodnotu 4,0. Vzorek byl přefiltrován přes filtrační papír KA2. U filtrátu bylo upraveno pH na hodnotu 9,0. Na kolonu bylo nanášeno celkem 75 ml. Z kolony byly jímány frakce po 40 ml. Kolona byla ještě vymyta 80 ml destilované vody a opět jímána po 40 ml do frakcí. U všech frakcí bylo upraveno pH na hodnotu 5,0.

#### **4.3.4 Příprava vzorku na preparativní HPLC**

Zmražené frakce byly vloženy do lyofilizátoru při teplotě -50 °C po dobu 120 hod. Vzorky byly poté rozpuštěny v pufru 25mM dihydrogenfosforečnanu draselném o pH 5,0 v poměru 2:1 (m:v). Takto připravené roztoky byly centrifugovány přes centrifugační filtr CIPV-02 po dobu 1 min při 3000 rpm.

#### **4.3.5 Odsolení ergothioneinu po preparativní HPLC**

Z najímané frakce ergothioneinu byl na RVO odpařen methanol a frakce byla následně zlyofilizována. Zbylý dihydrogenfosforečnan draselný byl odstraněn rozpuštěním vzorku v methanolu a oddělením jeho sraženiny od roztoku filtrací přes Büchnerovu nálevku s filtračním papírem KA1. Methanol byl následně odpařen na RVO při teplotě 38 °C.

## 4.3.6 Chromatografické metody

## Metoda 1

průtok [ml/min]	čas [min]	mobilní fáze [%]	
		A: 25Mm KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 5,0	B: MeOH
0,9	0–7	97	3
	7–10	50	50
	10–12	50–40	50–60
	12–19	40	60
	19–22	40–97	60–3
vlnová délka [nm]		260	

## Metoda 2

průtok [ml/min]	čas [min]	mobilní fáze [%]	
		A	B
0,9	0–12	97	3
	12–15	97–5	3–95
	15–19	5	95
	19–20	5–97	95–3
vlnová délka [nm]		260	

A: H<sub>2</sub>O + 0,05% HCOOH; B: ACN + 0,05% HCOOH nebo MeOH + 0,05% HCOOH

## Metoda 3: Preparativní HPLC metoda

průtok [ml/min]	čas [min]	mobilní fáze [%]	
		A: 25mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 5,0	B: MeOH
18	2–7	97	3
	7–10	97–50	3–50
	10–12	50–40	50–60
	12–15	40	60
	15–18	60–97	60–3
vlnová délka [nm]		260	

## 5 Výsledky

L-Ergothionein je sice komerčně dostupnou, ale velmi drahou sloučeninou (pro představu, 5 mg čisté látky stojí přes 8 tisíc Kč). Cílem této práce bylo najít vhodnou metodu pro izolaci ergothioneinu, který by se dále mohl použít pro rozsáhlejší výzkumy.

### 5.1 Výběr extrakčního činidla a postupů extrakce

V této části práce je porovnáno využití celkem pěti různých extrakčních postupů s extrakčními činidly. Byla sledována výtěžnost ergothioneinu s využitím různých extrakčních činidel a vyzkoušeno několik odlišných postupů extrakce.

V rámci prvních čtyř postupů (**Extrakce 1-4**) bylo zkoumáno ideální složení extrakčního činidla (vodný methanol v poměru 1:4, vodný methanol v poměru 4:1, methanol a acetonitril). Na základě provedených HPLC analýz (**Metoda 1**, kolona Biphenyl) byla jako nejvhodnější metoda zvolena extrakce 100% methanolem, která vedla k nejvyššímu podílu ergothioneinu v extraktu.

Další možností byla extrakce dichlormethanem z vodného roztoku (**Extrakce 5**). Tento postup nevedl k získání ergothioneinu, jelikož bylo zjištěno, že ESH do organické fáze nepřechází.

### 5.2 Přechištění extraktu

Pro první kontrolní HPLC analýzy byla zvolena kolona se stacionární fází Biphenyl. Měřeno bylo za izokratického gradientu (3 % methanolu). U analýz bylo nutné používat pufr. (viz **Metoda 1**)

#### Přechištění extraktu pomocí aktivního uhlí

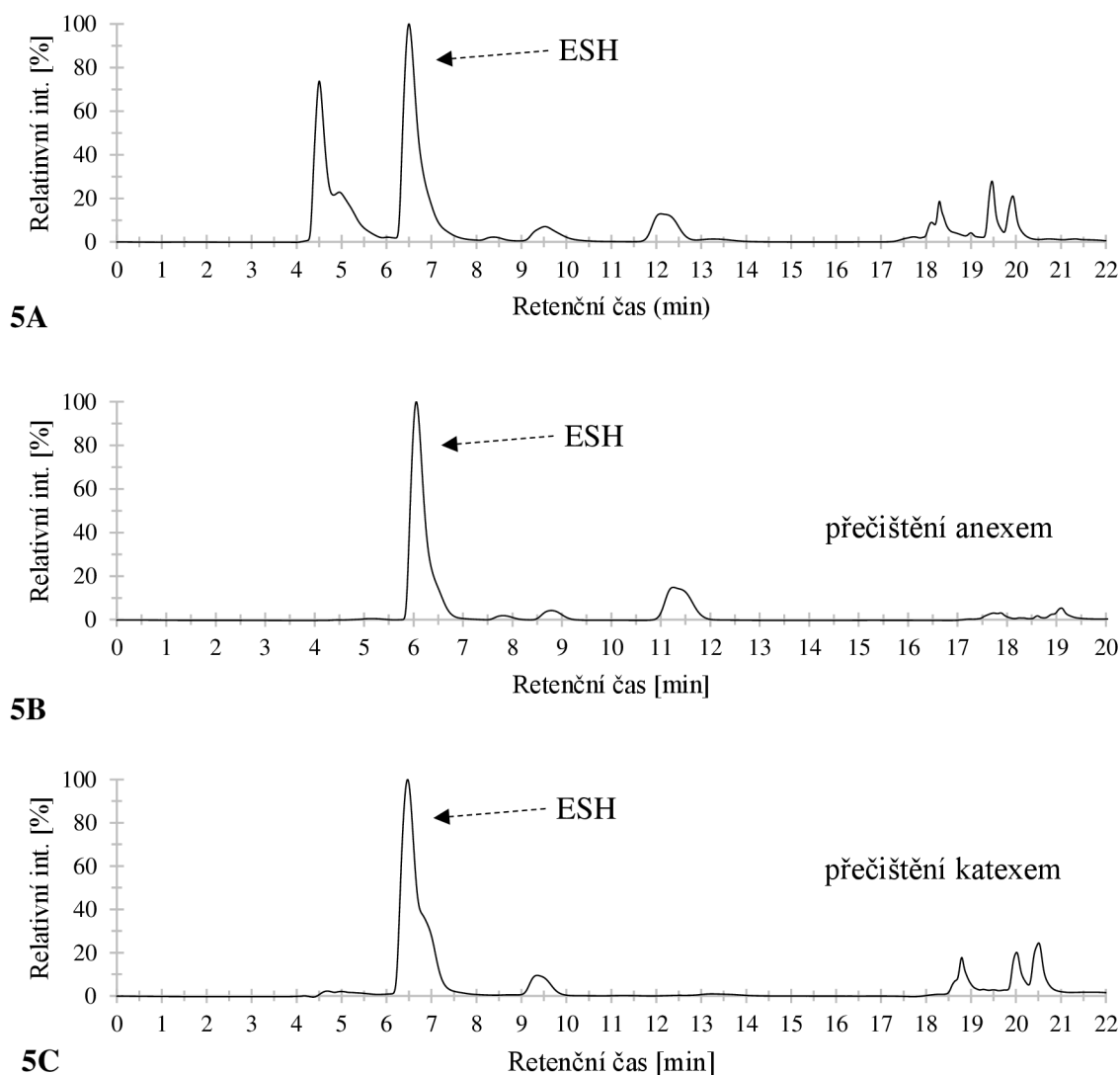
Bylo odzkoušeno odstranění žlutého zbarvení z methanolového extraktu ergothioneinu pomocí aktivního uhlí. Po zanalyzování extraktu bylo zjištěno, že aktivní uhlí sorbuje také ergothionein. Tento postup byl pro odstranění nežádoucího zbarvení zvolen jako nevhodný.

#### Přechištění extraktu pomocí iontoměničové kolony

Vzhledem k aminokyselinové povaze ESH bylo vyzkoušeno přechištění jeho extraktu pomocí iontoměničových kolon. Byly použity dva různé ionexy. Katex byl zvolen IR-120



a anex Dowex 1×8. Následně byly přečištěné extrakty po ionexech analyzovány. Výsledky přečištění po jednotlivých ionexech jsou uvedeny na **Obr. 5**.



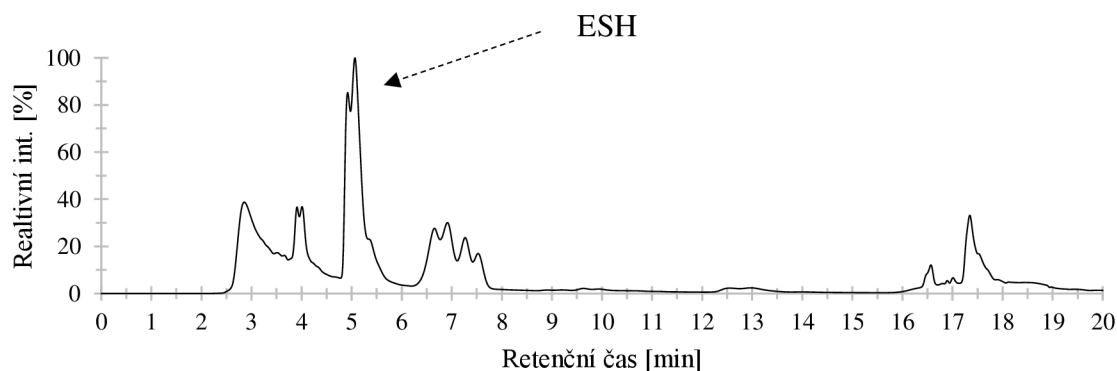
**Obr. 5:** **A:** HPLC chromatogram extraktu před přečištěním, **B:** HPLC chromatogram extraktu po přečištění anexem Dowex 1×8, **C:** HPLC chromatogram extraktu po přečištění katexem IR-120.

Katex IR-120 během přečištění extraktu zachytil kladně nabitě částice, včetně ESH, který musel být následně z kolony eluován. Anex Dowex 1×8 tyto částice naopak propouštěl. Výsledky přečištění na obou ionexech byly velmi podobné. Pro další přečišťování byl tedy zvolen méně časově náročný anex (Dowex 1×8).

### 5.3 Optimalizace metody pro preparativní HPLC

V této fázi byla sledována separace jednotlivých látek v extraktu z hlívy ústříčné na kolonách s různými stacionárními fázemi (C8, C18, Phenyl-Hexyl, RP-Amide a Biphenyl) a dvěma různými mobilními fázemi (methanol a acetonitril). Bylo potřeba najít metodu s dobře oddělenými píky pro následnou preparativní HPLC. Použitý gradient byl izokratický v poměru 3 % mobilní fáze B. Analýzy byly prováděny pomocí UHPLC-PDA-MS/MS, tak bylo nutné měřit s okyselenými mobilními fázemi (A: okyselená demineralizovaná voda, B: okyselený methanolem/okyselený acetonitril) (**Metoda 2**). K analýze byl použit vzorek z nepřečištěného methanolového extraktu ergothioneinu.

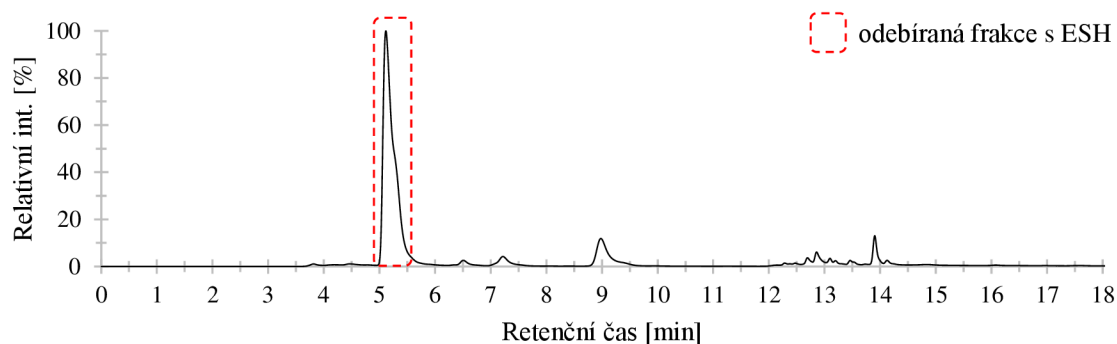
Po porovnání chromatogramů z analýz na všech kolonách byla k následné izolaci ergothioneinu vybrána kolona C8. Tato kolona nejlépe separovala analyzované látky s použitím mobilní fáze s methanolem (**Obr. 6**).



**Obr. 6:** HPLC chromatogram extraktu na analytické koloně C8, mobilní fáze: A ( $\text{H}_2\text{O}$  + 0,05%  $\text{HCOOH}$ ) a B ( $\text{MeOH}$  + 0,05%  $\text{HCOOH}$ ).

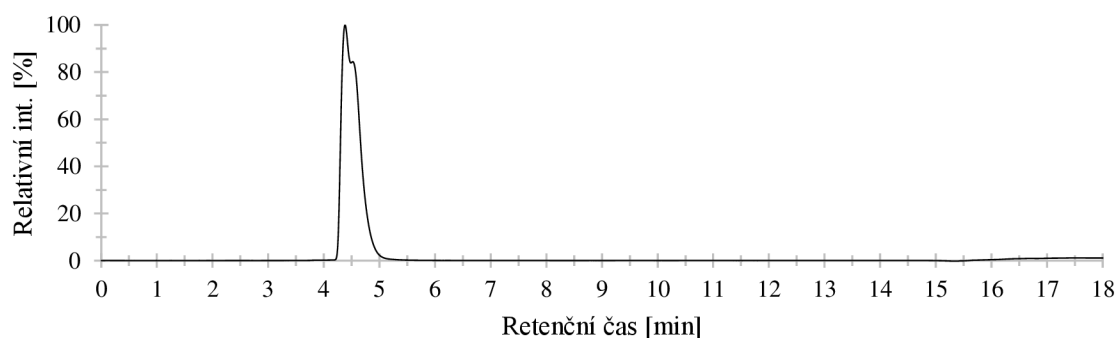
### 5.4 Preparace ESH

Pro preparativní HPLC izolaci byla použita **Metoda 3** o délce 18 minut za izokratického gradientu (3 % mobilní fáze B). Mobilní fáze byla složena z A (25mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 5,0) a B (methanol). K preparativní separaci pomocí HPLC byl použit extrakt přečištěný pomocí anexu Dowex 1×8. **Obr. 7** znázorňuje průběh preparativní HPLC.



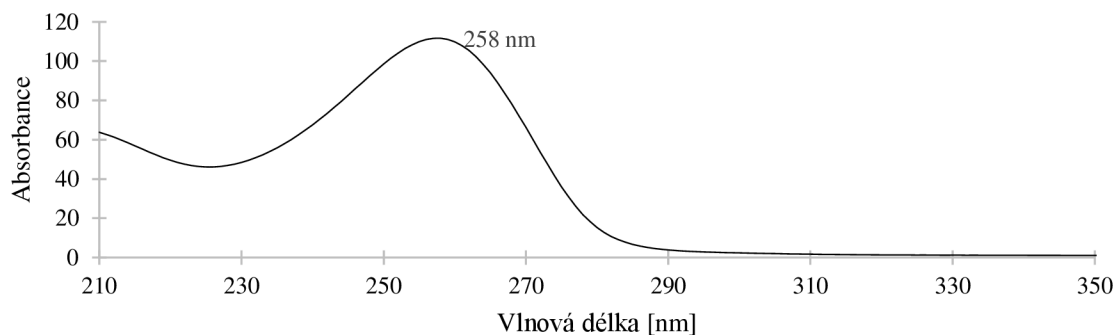
**Obr. 7:** Preparativní HPLC

Po preparativní HPLC proběhlo kontrolní měření na analytické koloně C8, které ukázalo čistý pík. Chromatogram z analýzy je zobrazený na **Obr. 8**.

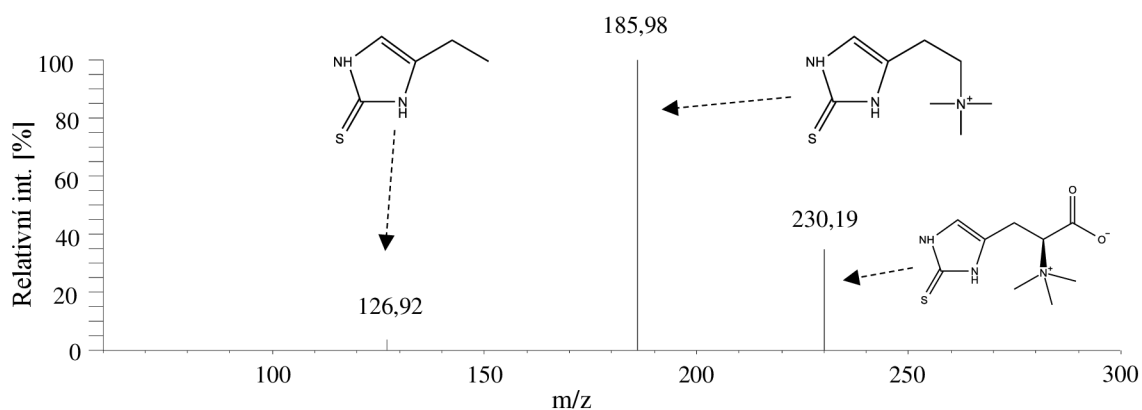


**Obr. 8:** HPLC chromatogram izolovaného ESH

Z hlívy ústříčné se podařilo izolovat ergothionein mírně nažloutlé barvy. Na chromatogramu pík ergothioneinu vykazoval ramínko, což je pravděpodobně důsledkem spontánní tautomerizace této sloučeniny. Celkové množství izolovaného ESH ze 107 g lyofilizovaného houbového prášku činil 195 mg. Čistota lyofilizovaného ESH byla zkontrolována změřením teploty tání. Měření bylo provedeno ve dvou opakování s výsledky 234 °C a 235 °C.



**Obr. 9:** Absorpční spektrum ergothioneinu.



**Obr. 10:** Hmotnostní spektrum ergothioneinu s odpovídajícími fragmenty.

Ze získaného ergothioneinu byla změřena absorpční křivka s maximem  $\lambda = 258$  nm (**Obr. 9**). Absorpční spektrum je zcela v souladu s absorpčním spektrem standardu ergothioneinu. Dále bylo z izolovaného ergothioneinu změřeno hmotnostní spektrum a přiřazeny jeho odpovídající fragmenty (**Obr. 10**).

## 6 Diskuze

Pro izolaci ergothioneinu byly zvoleny plodnice hlívy ústříčné z důvodu vysokého obsahu této sloučeniny (Kalač 2021) a snadné dostupnosti čerstvých plodnic této houby.

V experimentální části byla vyvinuta extrakční metoda vycházející z publikace Tsiantase et al. (2021) s drobnými úpravami během extrakce. Jako extrakční roztok byl použit methanol. Vyzorovali jsme, že extrakci methanolem, na rozdíl od vodného roztoku methanolu, nebyly v získaném extraktu přítomny i další nežádoucí látky.

Pro přečištění vzorků byly vyzkoušeny dva typy iontoměničů. Katex IR-120 pracuje na principu zachycení kladně nabitých molekul (včetně ESH) ze vzorku a jejich následné eluci vodným roztokem  $\text{NH}_4\text{OH}$  z kolony. Anex Dowex 1×8 pracuje na principu zachycení všech záporně nabitých částic z roztoku a propuštění kladně nabitých molekul, včetně ESH. Výsledky obou přečištění byly velmi podobné, ale kvůli menší časové náročnosti byl k dalšímu použití zvolen anex.

Během vývoje a optimalizace HPLC separace jednotlivých látek bylo testováno několik kolon s různými stacionárními fázemi, a sice C8, C18, Phenyl-Hexyl, RP-Amide a Biphenyl. Ze všech kolon byly používány dvě s vhodnou separací analyzovaných látek, a to kolony s Biphenyl a C8 stacionární fází. Obě kolony lépe separovaly jednotlivé látky při použití mobilní fáze A ( $\text{H}_2\text{O} + 0,05\% \text{HCOOH}$ ) a B ( $\text{MeOH} + 0,05\% \text{HCOOH}$ ).

Po izolaci pomocí preparativní HPLC, odsolení najímané frakce od  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  byl získán světle nažloutlý suchý prášek s bodem tání  $234,5 \text{ }^\circ\text{C}$ , což je v porovnání s tabelovanou hodnotou ( $275\text{--}277 \text{ }^\circ\text{C}$ ) výrazně nižší. Také díky mírně nažloutlé barvě získaného vzorku lze usuzovat, že ve vzorku pravděpodobně nějaké minoritní nečistoty zůstaly, i když nebyly při kontrolní analýze na HPLC viditelné. Tento výsledek je však pro další předpokládané využití získaného ergothioneinu v naší laboratoři dostačující.

Obsah ESH v plodnicích hlívy je podle literárních údajů  $94\text{--}378 \text{ mg}/100 \text{ g}$  sušiny (viz **Tab. II**). Nám se podařilo získat  $182 \text{ mg}/100 \text{ g}$  sušiny, což je tedy v souladu s očekáváním.

## 7 Závěr

Během metabolismu této houby vzniká látka zvaná L-ergothionein. Tento velmi stabilní histidinový derivát je uznáván pro svoje antioxidační vlastnosti užitečné pro vylučování reaktivních forem kyslíku, díky čemuž má vysoký medicínský potenciál. Nachází se téměř ve všech živých organismech, z nichž jen některé jej dokážou syntetizovat.

V průběhu teoretické části této práce byly shrnuty základní informace pojednávající o významných antioxidačních vlastnostech Ergothioneinu, o jeho biochemických a fyzikálních vlastnostech, výskytu, potenciálního využití v medicíně a možnostech stanovení v plodnicích hub. Experimentální část byla zaměřena na jeho extrakci z hlívy ústříčné. Byla vyvinuta nová metoda pro jeho detekci v houbových extraktech a následnou izolaci čistého ESH.

I přestože je ergothionein zcela běžně vyskytovanou přírodní látkou, je jeho izolace ve větším množství obvykle velice časově a finančně náročná. Některé společnosti sice už používají specificky geneticky modifikované druhy bakterií pro jeho biosyntézu, ale ani tento postup izolace nemá razantní vliv na cenu čistého ergothioneinu. Hodnoty prodávaných standardů se i nadále pohybují v rozmezí tisíců korun za miligramy. Postup vyvinutý v mé bakalářské práci představil způsob získání vysokého množství dostatečně čistého ESH, který lze využít pro další výzkumné účely v naší laboratoři.

## 8 Shrnutí

- ✓ Teoretická část obsahuje informace o výskytu, biochemii a možnosti stanovení ergothioneinu v plodnicích hub.
- ✓ Je vypracován postup vedoucí k izolaci ergothioneinu z plodnic hlívy ústříčné.
- ✓ Výsledky jsou zdokumentovány a vhodně prodiskutovány.

## 9 Seznam použitých zkratk

ESH	ergothionein
ETT	ergothioneine transporter
GABA	kyselina gama-aminomáselná
HPLC	kapalinová chromatografie
MeOH	methanol
MK	mastné kyseliny
m/z	hmotnost iontu/náboj
n.h.	nejsou hodnoty
OCTN1	organic cation transporter novel type 1
rpm	otáčky za minutu
RVO	rotační vakuová odparka
SAM	S-adenosylmethionin
SLC22A4	solute carrier family 22, member 4
SPE	extrakce na pevné fázi
s.v.	suchý vzorek (sušina)

## 10 Seznam použité literatury

### 10.1 Knižní zdroje

Hadar Y. (2021). Biodegradation of aromatic toxic pollutants by white rot fungi. *Encyclopedia of mycology*. 1, 197-204. ISBN 978-01-28199-90-9.

Jablonský I., Šašek V. a Koudela M. (2019). *Jedlé a léčivé houby a jak je pěstovat*. Praha: Profi Press, ISBN 978-80-88306-03-0.

Valíček P. (2011). *Houby a jejich léčivé účinky*. Benešov: Start, ISBN 978-80-86231-54-9.

### 10.2 Internetové zdroje

Alamgir K. M., Masuda S., Fujitani Y., Fukuda F. a Tani A. (2015). Production of ergothioneine by *Methylobacterium* species. *Frontiers in microbiology*, 6, 1185. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01185> [15.1. 2023]

Askari A. a Melville D. B. (1962). The reaction sequence in ergothioneine biosynthesis: hercynine as an intermediate. *Journal of biological chemistry*, 237(5), 1615–1618. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)83750-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)83750-X) [11.1. 2023]

Bhattacharya M., Srivastav P. P. a Mishra H. N. (2014). Optimization of process variables for supercritical fluid extraction of ergothioneine and polyphenols from *Pleurotus ostreatus* and correlation to free-radical scavenging activity. *The journal of supercritical fluids*. 95, 51–59, Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2014.07.031> [20.10. 2023]

Borodina I., Kenny L. C., McCarthy C. M., Paramasivan K., Pretorius E., Roberts T. J., van der Hoek S. A. a Kell D. B. (2020). The biology of ergothioneine, an antioxidant nutraceutical. *Nutr Res Rev*. 33(2), 190–217. Dostupné z: <https://doi.org/10.1017/S0954422419000301> [8.1. 2023]

Chen S.–Y., Ho K.–J., Hsieh Y.–J., Wang L.–T. a Mau J.–L. (2012). Contents of lovastatin,  $\gamma$ -aminobutyric acid and ergothioneine in mushroom fruiting bodies and mycelia, *LWT*, 47(2), 274–278. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.01.019> [15.10. 2022]



Chilanti G., Rosa L. O., Poletto L., Branco C. S., Camassola M., Fontana R. C. a Dillon A. J. P. (2022) Effect of different substrates on *Pleurotus* spp. cultivation in Brazil—Ergothioneine and lovastatin. *Journal of food composition and analysis*, 107, Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2021.104367> [10.11. 2022]

Cumming B. M., Lamprecht D. A., Wells R. M., Saini V., Mazorodze J. H. a Steyn A. J. C. (2014). The physiology and genetics of oxidative stress in mycobacteria. *Microbiology spectrum*, 2(3). Dostupné z: <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.MGM2-0019-2013> [15.1. 2023]

Deepalakshmi S., Krishnamoorthy S. a Mirunalini S. (2014). *Pleurotus ostreatus*: an oyster mushroom with nutritional and medicinal properties. *Journal of Biochemical Technology*, 5(2), 718–726. Dostupné z: <https://jbiochemtech.com/s-to-rage/models/article/NG23jvirki6MsPU83nHuA6CbEMW8XcyYx1abn0BuLtqBOKsnuWPknyki9rj5/Pleurotus-ostreatus-an-oyster-mushroom-with-nutritional-and-medicinal-properties.pdf> [23.12. 2022]

Dubost N. J., Beelman R. B., Peterson D., Royse D. J. a Wasser E. (2006). Identification and quantification of ergothioneine in cultivated mushrooms by liquid chromatography–mass spectroscopy. *International journal of medicinal mushrooms*. 8(3), 215–222. Dostupné z: <https://doi.org/10.1615/IntJMedMushr.v8.i3.30> [23.10. 2022]

Halliwell B. a Cheah I. (2022), Ergothioneine, where are we now? *FEBS Lett*, 596, 1227–1230. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/1873-3468.14350> [18.11. 2022]

Hoa H. T., Wang C. L. a Wang C. H. (2015). The effects of different substrates on the growth, yield, and nutritional composition of two oyster mushrooms (*Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus cystidiosus*). *Mycobiology*, 43(4), 423–434. Dostupné z: <https://doi.org/10.5941/MYCO.2015.43.4.423> [23.12. 2022]

Cheah I. K. a Halliwell B. (2012) Ergothioneine; antioxidant potential, physiological function and role in disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)—Molecular basis of disease*, 1822(5), 784–793. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2011.09.017> [8.1. 2023]

Cheah I. K. a Halliwell B. (2020). Could ergothioneine aid in the treatment of coronavirus patients? *Antioxidants*, **9**(7), 595. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/antiox9070595>

Kalač P. (2021), Jedlé houby jsou zdrojem účinného antioxidantu ergothioneinu. *Výživa a potraviny*, **4**, 86–88. Dostupné z: <https://www.vyzivaspol.cz/vyziva-a-potraviny-42021/>

Kitsanayanyong L. a Ohshima T. (2022). Ergothioneine: a potential antioxidative and antimelanosis agent for food quality preservation. *FEBS letters*, **596**(10), 1330–1347. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/1873-3468.14267> [11.1. 2023]

Alfa chemistry, L-(+)-Ergothioneine. [online]. New York, USA. Dostupné z: <https://www.alfa-chemistry.com/l-ergothioneine-cas-497-30-3-item-292204.htm> [18.1. 2023]

Liu X., Huang Y., Wang J., Zhou S., Wang Y., Cai M., Yu L. a Tang Q. (2020). A study on the antioxidant properties and stability of ergothioneine from culinary–medicinal mushrooms. *International journal of medicinal mushrooms*, **22**(3), 211–220. Dostupné z: <https://doi.org/10.1615/IntJMedMushrooms.2020033625> [10.1. 2023]

Markova N. G., Karaman–Jurukovska N., Dong K. K., Damaghi N., Smiles K. A. a Yarosh D. B. (2009). Skin cells and tissue are capable of using L-ergothioneine as an integral component of their antioxidant defense system, *Free Radical Biology and Medicine*, **46**(8), 1168–1176. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2009.01.021> [10.1. 2023]

Nguyen T. H., Giri A. a Ohshima T. (2012). A rapid HPLC post–column reaction analysis for the quantification of ergothioneine in edible mushrooms and in animals fed a diet supplemented with extracts from the processing waste of cultivated mushrooms. *Food chemistry*, **133**(2), 585–591. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.01.061> [25.10. 2022]

Pang L., Wang T., Liao Q., Cheng Y., Wang D., Li J., Fu C., Zhang C. a Zhang J. (2021). Protective role of ergothioneine isolated from *Pleurotus ostreatus* against dextran sulfate sodium–induced ulcerative colitis in rat model. *Journal of food science*, **87**(1), 415–426. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/1750-3841.15982> [23.10. 2022]

Piska K., Sułkowska–Ziaja K. a Muszyńska B. (2017). Edible mushroom *Pleurotus ostreatus* (oyster mushroom)-its dietary significance and biological activity. *Acta Scientiarum Polonorum Hortorum Cultus*, **16**(1), 151–161. Dostupné z: <https://czasopisma.up.lublin.pl/index.php/asphc/article/view/2285> [21.12. 2022]

Qi L., Zhang W., Wang H., Li Y., Liu W., Wang Q., Liu D., Chen N. a Jiang W. (2016). Validation of a HILIC Method for the analysis of ergothioneine in fermentation broth, *Journal of Chromatographic Science*, **54**(6), 934–938, Dostupné z: <https://doi.org/10.1093/chromsci/bmw023> [11.10. 2022]

Sapozhnikova Y., Byrdwell W. C., Lobato A. a Romig B. (2014). Effects of UV–B radiation levels on concentrations of phytosterols, ergothioneine, and polyphenolic compounds in mushroom powders used as dietary supplements. *Journal of agricultural and food chemistry*, **62**(14), 3034–3042. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/jf403852k> [10.10. 2023]

Smith E., Ottosson F., Hellstrand S., Ericson U., Orho–Melander M., Fernandez C. a Melander O. (2020) Ergothioneine is associated with reduced mortality and decreased risk of cardiovascular disease. *Heart*. **106**(9), 691–697. Dostupné z: <https://doi.org/10.1136/heartjnl-2019-315485> [8.1. 2023]

Tao Y., Xiao S., Cai J., Wang J. a Li L. (2021). Effects of ergothioneine–enriched mushroom extract on oxidative stability, volatile compounds and sensory quality of emulsified sausage. *Animal bioscience*, **34**(10), 1695–1704. Dostupné z: <https://doi.org/10.5713/ab.20.0817> [5.1. 2022]

Tejkal K. *Pleurotus ostreatus*. *Česká mykologická společnost* [online]. Dostupné z: <https://www.myko.cz/myko-atlas/Pleurotus-ostreatus/> [30.12. 2022]

Tsiantas K., Tsiaka T., Koutrotsios G., Siapi E., Zervakis G. I., Kalogeropoulos N. a Zoumpoulakis P. (2021). On the identification and quantification of ergothioneine and lovastatin in various mushroom species: assets and challenges of different analytical approaches. *Molecules*, **26**(7), 1832. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/molecules26071832> [16.1. 2023]

U.S. Department of Agriculture (USDA). *FoodData Central* [online]. 2019. Dostupné z: <https://fdc.nal.usda.gov/fdc-app.html#/food-details/168580/nutrients> [23.12. 2022]

van der Hoek S. A., Darbani B. A., Zugaj E. K., Prabhala B. K., Biron M. B., Randelovic M., Medina J. B., Kell D. B. a Borodina I. (2019) Engineering the yeast *Saccharomyces cerevisiae* for the production of L-(+)-ergothioneine. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 7. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00262> [25.1. 2023]

van der Hoek S. A., Rusnák M., Wang G., Stanchev L. D., Alves L. de F., Jessop-Fabre M. M., Paramasivan K., Jacobsen I. H., Sonnenschein N., Martínez J. L., Darbani B., Kell D. B. a Irina B. (2022). Engineering precursor supply for the high-level production of ergothioneine in *Saccharomyces cerevisiae*, *Metabolic Engineering*, 70, 129–142. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2022.01.012> [28.1. 2023]

Woldegiorgis A. Z., Abate D., Haki G. D. a Ziegler G. R. (2014). Antioxidant property of edible mushrooms collected from Ethiopia. *Food chemistry*, 157, 30–36. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.02.014> [28.10. 2022]

Zhang W., Liu Q., Zhou T., Mei B., Chen N. a Jiang W. (2016). Aqueous extraction of ergothioneine from mycelia of *Pleurotus ostreatus* and ergothioneine accumulation regularity during submerged fermentation. *Research a reviews: Journal of microbiology and biotechnology*. 5(1). Dostupné z: <https://www.rroj.com/open-access/aqueous-extraction-of-ergothioneine-from-mycelia-of-Pleurotustreatus-and-ergothioneine-accumulation-regularity-duringsubmerged-f-.php?aid=68708> [15.10. 2022]

Zhou T., Qi L., Wenxia J. a Ning Ch. (2014). A new strategy for quantitative analysis of ergothioneine in fermentation broth by RP-HPLC. *Lecture notes in electrical engineering*. (249), 313–321. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/978-3-642-37916-1-32>

Zhu M., Han Y., Hu X., Gong C. a Ren L. (2022). Ergothioneine production by submerged fermentation of a medicinal mushroom panus conchatus. *Fermentation*, 8(9), 431. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/fermentation8090431> [25.1. 2023]

Zicha, O., Jirásek S. a Novák J. (2021). Hlíva ústříčná–*Pleurotus ostreatus*. *BioLib* [online]. Dostupné z: <https://www.biolib.cz/cz/taxon/id60374/> [21.12. 2022]