

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra kvality zemědělských produktů



**Chemické složení léčivých dřevokazných hub a jejich
význam pro zdraví člověka**

Diplomová práce

Autor práce: Mag. Iuliia Stiazhkina

Obor studia: Výživa a potraviny

Vedoucí práce: Ing. Gordon Karikoga Gomba, Ph.D.

© 2018 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci " Chemické složení léčivých dřevokazných hub a jejich význam pro zdraví člověka" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne _____

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala vedoucímu práce panu Ing. Gordon Karikoga Gomba, Ph.D. za metodické vedení práce, za pomoc a jeho vynaložený čas.

Chemické složení léčivých dřevokazných hub a jejich význam pro zdraví člověka

Souhrn

Diplomová práce se věnuje tématu chemickému složení léčivých dřevokazných hub a jejich významu pro zdraví člověka. Práce je rozdělena na teoretickou a praktickou část. Teoretická část je zaměřena na charakterizaci dřevokazných hub podle uvedených odborných zdrojů. Důraz je kladen na účinné látky obsažené v houbách. Praktická část naplňuje cíl diplomové práce, kterým bylo pomocí analytických metod analyzovat polysacharidy, bílkoviny, terpeny, fenolické sloučeniny a další látky obsažené v houbách *Ganoderma lucidum* a *Inonotus obliquus*. Získané výsledky jsou vyhodnoceny dostupnými metodami, a to jak z hlediska kvalitativního, tak kvantitativního.

Klíčová slova: Lesklokorka lesklá (*Ganoderma lucidum*), Rezavec šikmý (*Inonotus obliquus*), β – glukany, polysacharidy, aromatické látky.

Chemical composition of medicinal wood-decay mushrooms and their importance to human health

Summary

The diploma thesis deals with the chemical composition of medicinal wood-decay fungi and their significance for human health. The thesis is divided into a theoretical and a practical part. The theoretical part is focused on the characterization of wood-destroying fungi according to the mentioned sources. Emphasis is placed on the biologically active substances contained in the mushrooms. The practical part fulfills the aim of the diploma thesis by analyzing polysaccharides, proteins, terpens, phenolic compounds and other vaaluable substances contained in the mushrooms *Ganoderma lucidum* and *Inonotus obliquus*. The results obtained are evaluated by available methods, both qualitatively and quantitatively.

Keywords: *Ganoderma lucidum*, *Inonotus obliquus*, β – glucans, polysaccharides, volatile compounds.

Obsah

1 Úvod	9
2 Cíl práce	10
3 Literární přehled současného stavu problematiky	10
3.1 Charakteristika hub z hlediska výživy	10
3.2 Charakteristika léčivých účinků hub.....	11
3.3 Základní látky hub.....	12
3.3.1 Bílkoviny.....	12
3.3.2 Polysacharidy.....	13
3.3.3 β -glukany.....	13
3.3.4 Lipidy.....	14
3.3.5 Steroidy.....	14
3.3.6 Fenolické látky.....	14
3.3.7 Vitaminy.....	15
3.3.8 Minerální látky.....	15
3.3.9 Jiné další látky vyskytující se v houbách.....	15
3.4 Vliv hub na lidské zdraví.....	16
3.4.1 Imunostimulační a protirakovinné účinky polysacharidů hub.....	16
3.4.3 Antioxidační aktivita hub.....	17
3.4.3 Protizánětlivé účinky hub.....	17
3.4.4 Antidiabetická a antihyperlipidemická aktivita.....	18

3.5 Charakteristiká vybraných druhů hub.....	19
3.5.1 Lesklokorka lesklá (<i>Ganoderma lucidum</i>).....	19
3.5.2 Rezavec šikmý (<i>Inonotus obliquus</i>).....	21
3.6 Analytické metody využité pro stanovení účinných látek zkoumaných hub.....	23
3.6.1 Příprava vzorku.....	23
3.6.1.1 Homogenizace vzorku.....	23
3.6.1.2 Extrakce vzorku.....	24
3.6.1.3 Izolace.....	24
3.6.2 Analytické metody.....	24
3.6.2.1 GC-MS spektrometrie.....	24
3.6.2.2 FT-IR spektrometrie.....	24
3.6.3 Analytické metody pro stanovení polysacharidů v <i>Ganoderma lucidum</i> a <i>Inonotus obliquus</i> podle vědeckých článků.....	25
4 Praktická část.....	29
4.1 Seznam vzorků a přehled analýz.....	29
4.1.1 Použité chemikálie, materiály a přístrojové vybavení.....	31
4.1.2 Extrakce polysacharidů.....	32
4.1.3 Stanovení izolovaných polysacharidů v houbách pomocí FT-IR a NIR spektroskopie.....	32
4.1.4 Stanovení aromatických látek.....	32
5 Výsledky.....	33

5.1 Chromatografická analýza.....	33
5.2. Extrakce polysacharidů.....	35
5.3 Spektroskopické analýzy.....	36
5.3.1 Interpretace FT-IR spekter.....	36
6 Diskuze.....	37
7 Závěr.....	40
8 Seznam použité literatury.....	42
9 Samostatné přílohy.....	48

1 Úvod

Houby obecně patří k nejstarším formám života na Zemi a jsou součástí lidské kultury od pravěku. Dle archeologických nálezů lidé prokazatelně konzumovali houby před více než 30 000 lety. Po několik tisíc let jsou již také houby užívány za účelem cílené léčby, ale mnohem častěji se používají spíše jako preventivní prostředek před pestrou škálou onemocnění (Vančuříková, 2012).

Houby jsou organismy, které jsou v přírodě velmi rozšířené a nacházejí se v různých, někdy neočekávaných stanovištích. Existují v půdě a ve vodě, na různých mrtvých zbytcích rostlin a živočichů a některé druhy parazitují na živých organizmech (Gorlenko et al., 1986). Na naší planetě se vyskytuje několik tisíc druhů hub (Socha, 2014). Dnes je popsáno přibližně 130 000 druhů hub, ale předpokládá se více než dvojnásobné množství (Valíček, 2011). V České republice existuje zhruba 30 000 druhů, z toho okolo 4000 druhů hub jsou makromycety viditelné pouhým okem (Socha, 2014).

Úloha hub v koloběhu organických a anorganických látek je velmi důležitá (Socha, 2014). Rozkladem organických zbytků se houby spolu s bakteriemi podílejí na tvorbě půdy a zejména na tvorbě úrodné půdní vrstvy a humusu.

Člověk dlouho používá houby v různých průmyslových odvětvích, příkladem ve vinařství a pekařství lidé využívají vlastnosti kvasinek běžně. Později byly houby používány při výrobě některých druhů sýrů a v jiných odvětvích potravinářského průmyslu. První antibiotikum penicilin bylo získáno z penicilinové houby existující v půdě, čímž se vyvolal zájem o farmakologicky účinných látek získaných právě z hub (Gorlenko et al., 1986).

V posledních letech se výzkum hub zintenzivnil v důsledku zájmu západní i východní medicíny (Vančuříková, 2012). Asijské a východní země, především Čína, Japonsko a Korea, používají léčivé houby přibližně 2000 let (Socha, 2014). Na prvním místě zájmu jsou především imunomodulační vlastnosti látek obsažených v houbách (polysacharidy, enzymy, peptidoglykany, glykopeptidy, sekundární metabolity, vitaminy a další), které může medicína využívat především k léčbě nádorových onemocnění a poruch imunity, mezi které patří alergie, imunodeficience atd. (Vančuříková, 2012).

2 Cíl práce

Cílem diplomové práce je extrakce a porovnání biologické aktivních houbových látek. Pomocí různých extrakčních metod lze z hub izolovat biologické aktivní látky a následně použitím plynové chromatografie detekovat zastoupení jednotlivých aktivních látek. Soustředit budeme zejména na polysacharidy. Polysacharidy jsou složité biologické makromolekuly, které interagují s jinými organickými makromolekulami, jako jsou proteiny, polyfenoly atd., k tvorbě ještě více komplexních sloučenin známých jako glyko-konjugáty. Bude se také snažit zjistit, jestli je možné izolovat polysacharidy.

Hypotéza: Houby jsou obrovským zdrojem biologické aktivních látek, které mají mimo jiné antimikrobiální účinky. Tyto látky mohou být odpověď na mnohé současné civilizační choroby.

3 Literární přehled současného stavu problematiky

3.1 Charakteristika hub z hlediska výživy

Čerstvé houby obsahují 95 % vody. Sušené houby mají hmotnost asi desetkrát níže a obsahují podle druhu cca 5–30 % bílkovin. Z nich stravitelných bílkovin je málo, ale z pohledu aminokyselinového spektra jsou rovnocenné živočišným (Vančuríková, 2012).

Houby mají docela nízkou energetickou hodnotu kvůli zanedbatelnému obsahu tuků a sacharidů, ale jejich nutriční hodnota není zanedbatelná, jelikož houby obsahují celou řadu důležitých bioaktivních látek, jakými jsou bílkoviny, aminokyseliny, sacharidy, lipidy, vitaminy aj (Socha, 2014). Mimo jiné houby mají vysoký podíl nenasycených mastných kyselin a neobsahují cholesterol.

Pokud jde o senzorické vlastnosti, houby slouží jako chutná potravina a také jako zdroj látek určených k aromatizaci potravin (kvůli jejich jedinečné příchuti). Kromě těkavých sloučenin s osmi uhlíky se typická houbová příchut' skládá z ve vodě rozpustných chuťových složek, jakými jsou rozpustné cukry, polyoly, organické kyseliny, volné aminokyseliny a pět nukleotidů. Pokud jde o příznivé výživové účinky hub, je třeba poukázat na skutečnosti, že houby jsou nízk energetické, čímž je lze doporučit v redukčních dietách. Houby mají významnou úroveň purinu, což je přínosné pro výživu lidí trpících metabolickými chorobami. Kromě toho, houby mají nízkou hladinu glukózy a více mannitolu, což je velmi vhodné pro diabetiky. Dále houby mají přirozeně velmi nízkou koncentraci sodíku, což je přínosné pro

výživu lidí trpících hypertenzí. Kvůli vysokému obsahu několika klíčových vitaminů v houbách, může být pokryta značná část každodenního požadavku na různé základní vitamíny. Co se týká minerálních látek, houby mají vysoký obsah draslíku a fosforu. Mezi dalšími důležitými látkami, houby také mají vysoký obsah selénu, který je považován za vynikající antioxidant (Gargano et al., 2017).

3.2 Charakteristika léčivých účinků hub

Po tisíciletí byly houby lidmi považovány za jedlé a lékařské prostředky. Současné výzkumy potvrdily a zdokumentovaly hodně starých znalostí o léčivých houbách. Oblast vědy, která studuje léčivé houby, byla vyvinuta a stále více demonstruje silné a jedinečné vlastnosti sloučenin získaných z řady druhů hub v posledních třech desetiletích (Gargano et al., 2017).

Léčivé houby se dnes používají jako dietní potraviny, potravinové doplňky (například česká společnost Terezia Company s.r.o., která se zabývá vývojem, výrobou a distribucí doplňků stravy), nová třída léčiv nazvaná "Mushroom Pharmaceuticals". Pak se houby používají jako přírodní biokontrolní činidla pro ochranu rostlin, která demonstrují insekticidní, fungicidní, baktericidní, herbicidní, nematocidní a antifytovirální účinky. Z hub se vyrábí kosmetické prostředky-kosmetické společnosti používají různé látky léčivých hub a jejich účinky jako jsou aktivace epidermálního růstového faktoru, antioxidační, antialergický, antibakteriální a protizánětlivé účinky, stimulace aktivity kolagenu, inhibice autoimunního vředů a léčba akné (Gargano et al., 2017).

Farmakologické vlastnosti hub jsou v současné době široce uznávány. Tvoří rozsáhlý, a přesto převážně nevyužitý zdroj nových farmaceutických produktů. Pro moderní medicínu představují léčivé houby neomezený zdroj polysacharidů (zejména β -glukanů) a polysacharidových proteinových komplexů s protirakovinnými a imunostimulačními vlastnostmi (Gargano et al., 2017).

Existuje celkem více než 130 léčivých účinků hub. Nedávno studované léčivé účinky hub zahrnovaly (Gargano et al., 2017) komplexní posílení organismu včetně imunity (Wang et al., 2013; Hu et al., 2017), zvýšení odolnosti organismu vůči infekcím (Wang et al., 2013; Muszynska et al., 2018) obranu proti nádorům, podporu při terapii nádorových onemocnění (Wang et al., 2013). Bylo prokázáno, že houby mohou pomoci při léčbě alergických reakcí i autoimunitních zánětů, mají antioxidační i detoxikační účinnost, ovlivňují látkovou výměnu (metabolismus cholesterolu, kyseliny močové i cukru) (Muszynska et al., 2018). Navíc houby vykazují antifungální, antibakteriální, hepatoprotektivní, neuroprotektivní, neuroregenerační

aktivitu a podporují regulaci krevního tlaku a reologických vlastností krve (Gargano et al., 2017).

Na základě těchto vlastností se studují účinky jednotlivých látek obsažených v houbách, jako jsou polysacharidy, enzymy, triterpenoidy, lektiny, statiny, vláknina, steroly, vitaminy a minerály (Vančuríková, 2012).

3.3 Základní látky hub

Biologicky aktivní sloučeniny obsažené v houbách zodpovědné za jejich léčivé účinky. Tyto látky patří k různým chemickým skupinám, zejména polysacharidům (β -glukany), polysacharidovým proteinovým komplexům, terpenům (triterpenům, diterpenům a sesquiterpenům), fenolickým sloučeninám, alkaloidům, peptidům, lektinům a nukleosidům (Gargano et al., 2017).

3.3.1 Bílkoviny

Základní stavební látkou každého živého organismu jsou bílkoviny, které se sestávají z aminokyselin (Valíček, 2011). Cca 14-52 % sušiny hub tvoří dusíkaté látky, jakými jsou bílkoviny, peptidy, aminokyseliny atd. Bílkoviny hub se liší od bílkovin rostlin nebo zvířat a mají často unikátní vlastnosti (Socha, 2014) podle zastoupení jednotlivých aminokyselin. Volné a esenciální aminokyseliny hrají důležitou roli ve výživě a zdraví člověka (Valíček, 2011).

Houby obsahují deset esenciálních aminokyselin, například methionin, fenylalanin, histidin, arginin, leucin, lysin aj. (Bach et al., 2017; Valíček, 2011), které jsou velmi důležité pro lidský organismus, jelikož si je naše tělo nedokáže vytvořit samo a musí být tedy dodány potravou. Houby obsahují rovněž i aminokyseliny, které naopak tělo vytvořit dokáže, například alanin, cystein, glycin, prolin aj. (Bach et al., 2017; Socha, 2014).

Řada bílkovin obsažených v houbách vykazuje protinádorové, antiproliferační a imunomodulační účinky. Ze všech bílkovin hub se nejčastěji studují lektiny, které jsou schopné rozpoznávat a vázat sacharidy, volné nebo vázané v glykolipidech a glykoproteinech. Tyto vlastnosti se využívají například v diagnostice při rozlišení zdravých a rakovinných buněk. Kromě toho jsou lektiny schopny srážet červené krvinky a také případně způsobit jejich hemolýzu.

Dalšími důležitými bílkovinami hub jsou houbový imunomodulační protein a ribozom inaktivující protein. Poslední je enzym vykazující různé aktivity, kde můžeme zmínit inhibici růstu rakovinných buněk a antifungální vlastnosti (Socha, 2014).

3.3.2 Polysacharidy

Léčivé houby obsahují celou řadu rozpustných (např. glukany) i nerozpustných (např. chitin) polysacharidů (Vančuríková, 2012). Bylo prokázáno, že polysacharidy hub (β -glukany) mají pozitivní vliv na lidské zdraví (Muszynska et al., 2018). Polysacharidy dodávají lidskému organismu energii potřebnou k realizaci metabolických procesů, hrají velkou roli na úrovni imunitního systému. Z nich jsou sledované především β -glukany, které vykazují účinky imunostimulační a protinádorové (Vančuríková, 2012).

Polysacharidy jsou složité molekuly, které vznikají spojováním jednoduchých cukrů do dlouhých, různě větvených řetězců (Vančuríková, 2012). Také v houbách jsou obsaženy komplexní sacharidy, ke kterým patří glykolipidy a glykoproteiny (Socha, 2014).

Polysacharidy, které jsou součástí houbových hyf, včetně glukánů, chitinu a chitosanů, jsou velmi důležité pro zvýšení imunity a modulace obranných reakcí organismu. Tyto sloučeniny plní funkci vlákniny a po konzumaci přispívají k ochraně střevních sliznic (Muszynska et al., 2018). Polysacharidy hub stimulují kolonizaci přirozené lidské mikrobioty a jsou klasifikovány jako probiotika (Muszynska et al., 2018; Chou et al., 2013).

Chitosany a glukany vykazují antilipidemické účinky tím, že snižují hladinu celkového a LDL cholesterolu a absorpci tuku v zažívacím traktu (Muszynska et al., 2018). Kromě toho regulují glykemii (Vitak et al., 2017), čímž zabraňují vzniku kardiovaskulárních onemocnění, obezity a diabetu (Muszynska et al., 2018).

Sacharidy jsou významnou složkou buněčných stěn hub a také jsou rezervními látkami obsaženými v plazmě. Z monosacharidů se v houbách nachází glukosa, galaktosa, mannososa, xylosa a fruktosa. Pomocí nich je tvořena řada různých derivátů, například aminocukry, deoxycukry, alkoholické cukry a cukerné kyseliny (Socha, 2014). Z disacharidů houby obsahují hlavně trehalózu, která má protizánětlivé účinky (Muszynska et al., 2018; Socha, 2014).

3.3.3 β -glukany

Mezi nejdůležitější látky s léčivými účinky patří β -glukany (Valíček, 2011). Glukany jsou významnou skupinou polysacharidů složených z glukozových jednotek v houbách (Jablonský, 2014). Rozlišují se podle umístění glykosidické vazby mezi uhlíky sousedních glukozových jednotek, podle optické otáčivosti a podle dalších vlastností (Jablonský, 2006). Nejrozšířenější

jsou β -(1,3)-D-glukany, β -(1,6)-D-glukany a α -(1,3)-D-glukany. Nejúčinnější z nich je β -(1,3)-D-glukan, jelikož vazba (1,6) je méně účinná a α glukany mají nižší aktivitu. Glukany zvyšují aktivitu protinádorových buněk, stimulují tvorbu interferonu, aktivují mikrofágy, makrofágy, leukocyty a T-lymfocyty (Jablonský, 2014; Valíček, 2011).

3.3.4 Lipidy

Obsah lipidů v houbách je nepatrný a pohybuje se v rozmezí 2-6 % v sušině (Socha, 2014). To závisí na druhu hub a podmínkách prostředí (Valíček, 2011). Lipidy v houbách představují zejména zdroj zásobních látek. Jedná se především o neutrální jednoduché lipidy, například triacylglyceroly. Z nasycených mastných kyselin obsahují houby kyselinu stearovou, palmitovou, laurovou aj. K nenasyceným mastným kyselinám hub patří především omega kyseliny linolová a α -linolenová. Jsou pro člověka velmi důležité, jelikož patří k esenciálním látkám, které můžeme získat pouze s potravou (Socha, 2014). Navíc vykazují silnou protizánětlivou aktivitu (Muszynska et al., 2018).

3.3.5 Steroidy

Všechny houby obsahují ergosterol, který je ekvivalentem lidského cholesterolu a je biologickým prekurzorem ergokalciferolu (Socha, 2014). Ergosterol je charakteristickým sekundárním metabolitem léčivých a jedlých hub s významnou biologickou aktivitou (Chen et al., 2017). Ergosterol zabraňuje vstřebávání cholesterolu do krve (Valíček, 2011) indukuje úmrtí nádorových buněk a inhibuje progresi nádorových buněčných cyklů (Chen et al., 2017).

Dalším houbovým steroidem je ergosterolperoxid, který vykazuje řadu léčivých účinků. Bylo zjištěno, že hraje klíčovou roli při regulaci zánětlivých procesů, vykazuje imunosupresní, antivirální aktivity, působí inhibičně na patogenní bakterie *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Sarcina lutea* a na kvasinky *Candida albicans*.

V řadě druhů hub byla nalezena steroidní látka ergon, která má diuretickou, imunomodulační aktivitu, protirakovinné účinky a inhibuje produkci oxidu dusnatého (Gargano et al., 2017).

3.3.6 Fenolické látky

Fenolické látky jsou velmi rozmanitou skupinou sloučenin, které jsou charakterizovány jedním nebo více aromatickými kruhy s jednou nebo více hydroxylovými skupinami. Zahrnují velké množství podtříd, jakými jsou chinony, flavonoidy, fenolové kyseliny, včetně hydroxybenzoových kyselin a kyseliny salicylové, stilbenů, tokoferolů, lignanů a ligninů,

taninů, curcuminoidů, kumarinů a oxidovaných polyfenolů. Fenolické látky jsou primárně známé díky svým antioxidačním vlastnostem. Nicméně v závislosti na jejich redoxním stavu a okolní hodnotě pH se mohou stát prooxidujícími, a tak přispívají k tvorbě reaktivních druhů kyslíku. Reaktivní druhy kyslíku hrají důležitou roli při obraně proti infekcím. Kromě toho Fenolické látky vykazují antikarcinogenní, antimutagenní a protizánětlivé (Gargano et al., 2017).

3.3.7 Vitaminy

Houby jsou významným zdrojem množství vitaminů, které jsou pro člověka nezbytné (Valíček, 2011). Především to je skupina vitaminu B – riboflavin, tiamin, kyselina pantothenová a kyanokobalamin. Dále houby obsahují hodně vitaminu PP, množstvím, kterého předčí ryby, čerstvé maso a luštěniny (Kalač, 2009; Socha, 2014). Obsah vitaminu C závisí na druhu houby, například v lišce bylo nalezeno okolo 12 %, naopak v hříbu smrkovém jen 2,5 % (Socha, 2014; Valíček, 2011). Výskyt vitaminu D₂ závisí na světelném režimu jednotlivé houby (Bilbao-Sainz et al., 2017; Kalač, 2009; Socha, 2014). Mezi dalšími vitaminy, které jsou přítomny v houbách, patří E, K, A (Bilbao-Sainz, et al., 2017; Kalač, 2009; Muszynska et al., 2018; Socha, 2014; Valíček, 2011)

3.3.8 Minerální látky

Houby jsou bohaté na minerální látky, přičemž jejich obsah u některých druhů hub je vyšší než u některé zeleniny (Socha, 2014). K nejvíce zastoupeným minerálním látkám obsažených v houbách patří především draslík, sodík, fosfor a hořčík (Bach et al., 2017; Niedzielski et al., 2017; Socha, 2014). Docela vynikající je obsah selenu, kterého u hub je mnohem víc než u zelených rostlin. U některých druhů hub je zastoupeno germanium, které má protinádorové účinky (Valíček, 2011). Z mikroprvků v houbách jsou obsaženy měď, zinek, jod, fluor, chrom, mangan, lithium aj.

Na druhé straně houby jsou schopny akumulovat z okolního prostředí těžké kovy, například olovo, rtuť a kadmium, které vážně poškozují lidské zdraví (Niedzielski et al., 2017; Valíček, 2011).

3.3.9 Jiné další látky vyskytující se v houbách

Houby obsahují celou řadu specifických látek, které nejsou základními stavebními složkami hub, ale mají prokázané léčivé účinky. Jde většinou o tzv. sekundární metabolity, které jsou typické pro majoritu hub. Jsou to triterpenoidy, včetně fytosterolů, saponinů aj.

Triterpenoidy obsahuje převážně *Ganoderma lucidum*. Jde např. o kyselinu ganodermovou, ganodermadiol, lanostan, ganodersyren A-Z atd. Tyto látky vykazují imunomodulační, protinádorové, antioxidační, protizánětlivé účinky, snižují hladinu cholesterolu v krvi, zlepšují průtok krve cévami, mají antivirové působení (Valíček, 2011).

Kromě uvedených látek houby obsahují eritadenin a lovastatin, které snižují hladinu cholesterolu v krvi (Jablonský, 2014).

3.4 Vliv hub na lidské zdraví

3.4.1 Imunostimulační a protirakovinné účinky polysacharidů hub

Imunostimulační a protirakovinné účinky polysacharidů hub mají složitý mechanismus, a proto je předmětem soustředěného výzkumu.

Polysacharidy různých druhů hub jsou strukturálně rozmanité molekuly a mají odlišnou molekulovou hmotnost, stupeň větvení a terciální strukturu makromolekuly. Ze všech biopolymerů polysacharidy mají největší kapacitu přenášet biologickou informaci kvůli tomu, že mají největší potenciál strukturální variability. Na rozdíl od nukleotidů a aminokyselin, monosacharidové jednotky polysacharidů se mohou spojovat v různých místech a tvořit různorodé větvené nebo lineární struktury (Jablonský, 2006).

Nejúčinnější houbové polysacharidy jsou β -glukany. Struktury typu β -(1,3) vazeb na hlavním skeletu glukanu spolu s β -(1,6) vazbami na postranních řetězcích jsou nezbytné pro protinádorovou účinnost a terciální konformace ve formě šroubovic postranních řetězců β -(1,3)-glukanů podmiňuje imunofarmakologické vlastnosti polysacharidů hub (Jablonský, 2006). Imunomodulační aktivita glukanů rychle klesá s molekulovou hmotností, a tak se tedy výrazně ztrácí v žaludku v důsledku hydrolýzy kyselinou chlorovodíkovou (Socha, 2014). Dalšími účinnými látkami jsou různé heteroglykany, β -glukan-proteiny, α -mano- β -glukany, α -glukan-proteiny nebo heteroglykan-proteinové komplexy.

β -glukany působí tak, že podporují nervový, imunitní i hormonální systémy organismu člověka. Stimulují nespecifické rezistence proti infekcím, nádorům a radiačnímu poškození. Vyjma toho zachycují volné radikály, přičemž mají nejvyšší afinitu k volným hydroxylovým radikálům, a zmenšují vedlejší účinky chemoterapie (Jablonský, 2006). Dále β -glukany zabráňují poškození DNA a snižují hladinu metabolitů s karcinogenním charakterem (Muszynska et al., 2018). β -glukany neatakují přímo rakovinotvorné buňky, ale aktivují různé imunitní mechanismy. Například zvyšují aktivitu makrofágů, stimulují tvorbu lymfocytů a urychlují fagocytózu. Dále β -glukany udržují rovnováhu mezi leukocyty Th-1 a Th-2.

Mechanismus imunomodulační aktivity β -glukanů spočívá v tom, že molekula β -glukanu se naváže na specifický receptor fagocytu, a tak se fagocyt aktivuje. β -glukany s více vazebnými místy mají vyšší imunomodulační aktivitu. Schopnost imunitního systému identifikovat β -glukany vznikla během evoluce (Jablonský, 2006).

3.4.2 Antioxidační aktivita hub

Antioxidační látky omezují aktivitu kyslíkových radikálů a tím snižují oxidace organismu. Mezi antioxidačními látkami obsaženými v houbách patří β -glukany (Valíček, 2011), které zabraňují poškození DNA a snižují hladinu metabolitů s karcinogenním charakterem. Dále na tomto účinku se podílí fenolické sloučeniny. Jejich mechanismus antioxidačního působení nastává několika způsoby. Především mohou darovat elektrony, čímž neutralizují reaktivní druhy kyslíku a chrání buňky před poškozením. Fenolické sloučeniny jsou také schopné chelátovat ty prvky (např. Fe, Cu), které mohou vytvářet reaktivní druhy kyslíku. Kromě toho inhibují tvorbu volných radikálů prostřednictvím inhibice enzymů, především oxidáz (Muszynska, 2018).

Dále antioxidační účinek mají některé enzymy, které chrání buňky před toxicitou peroxidu vodíku, pak vitaminy C, E a B2, karotenoidy, flavonoidy, polyfenoly, také některé sloučeniny selenu, manganu, zinku a mědi (Valíček, 2011).

3.4.3 Protizánětlivé účinky hub

Houby mají protizánětlivý účinek díky různorodým látkám. Ze sacharidů vykazuje takovou aktivitu disacharid trehalóza, která může inhibovat prozánětlivé proteiny, jmenovitě cyklooxygenázu-2 a indukovatelnou syntázu oxidu dusnatého (iNOS). Dále inhibuje degeneraci I κ B- α podjednotky, inhibitor nukleárního transkripčního faktoru NF- κ B. Také trehalóza snižuje peroxidaci lipidů a kyseliny arachidonové z fosfolipidů buněčné membrány indukovaných reaktivními druhy kyslíku. β -glukany jsou schopné ovlivňovat tvorbu jak pro-, tak protizánětlivých cytokinů. Konkrétně (1 $\rightarrow$ 6)- β -D-glukan demonstruje represivní účinek na geny s prozánětlivými znaky, stejně jako inhibici zánětlivé reakce způsobené lipopolysacharidy, a to prostřednictvím potlačování proteinů COX-2 a interleukinu 1 (Muszynska et al., 2018; Socha, 2014).

Protizánětlivé účinky hub také jsou spojeny s obsahem aminokyselin (jak esenciálních, tak i neesenciálních), o kterých je známo, že ovlivňují metabolismus prostaglandinu. Tak protizánětlivé vlastnosti houby *Pleurotus ostreatus* (ústřice) byly částečně vysvětleny

přítomností aminokyselin, jako jsou leucin, isoleucin, tyrosin a fenylalanin (Muszynska et al., 2018).

Mastné kyseliny obsažené v houbách jsou schopny podporovat protizánětlivé procesy u lidí kvůli vysokému obsahu nenasycených mastných kyselin. Polynenasycené mastné kyseliny jsou prekurzory eikosanoidů, které zajišťují rovnováhu mezi zánětlivými a protizánětlivými procesy (Muszynska et al., 2018; Socha, 2014).

Fenolické sloučeniny taky mají protizánětlivé vlastnosti, které vykazují vliv na expresi zánětlivých markerů, jako je IL-1 β a IL-6 a na produkci oxidu dusnatého (Muszynska et al., 2018; Lee et al., 2018).

Další skupinou látek s protizánětlivými účinky nalezenými v houbách jsou vitaminy. Vitamín D je známý pro své protizánětlivé vlastnosti. Jedním z mechanismů protizánětlivého účinku ergosterolu a jeho derivátů je inhibice translace NF-kB na buněčné jádro, čímž se zabráňuje expresi prozánětlivých genů (Muszynska et al., 2018; Socha, 2014; Lee et al., 2018).

Terpenoidy tvoří velkou skupinu houbových sloučenin s protizánětlivou aktivitou. Mechanismus protizánětlivého působení je založen na inhibici signalizačních cest NF-kB a AP-1. Terpenoidy mají významný vliv na snížení exprese COX-2 a na inhibici produkce prostaglandinu E2 (Muszynska et al., 2018).

Na protizánětlivém účinku hub se také podílí některé minerální látky. Zinek má významný protizánětlivý účinek. Mechanismus protizánětlivého účinku zinku zahrnuje indukci transkripce zinkově závislých transkripčních faktorů, jako je MTF-1 nebo A20, a inhibice aktivace NF-kB, což vede ke snížení produkce prozánětlivých cytokinů. Protizánětlivou aktivitu také vykazují selen a (Muszynska et al., 2018).

3.4.4 Antidiabetická a antihyperlipidemická aktivita

Hyperglykémie, obezita, vysoký krevní tlak a hyperlipidémie jsou důležitými složkami metabolického syndromu, předstupně diabetu typu 2 a kardiovaskulárních chorob (Gargano et al., 2017). Léčba hyperglykemie a hyperlipidémie s minimálními vedlejšími účinky v klinických zkušenostech a relativně nízkými náklady je stále problémem pro zdravotnický systém (Sun et al., 2008).

Řada hub obsahuje látky, které značně ovlivňují hladinu cholesterolu a tuku v krvi, to jsou především statiny. V současné době nejúčinnějším z nich je lovastatin, obsažený v plodnicích hlívy ústříčné. Významně snižuje hladinu cholesterolu, tuku a cukru v krvi. Stejnou aktivitu má purinový alkaloid eritadenin, který obsahuje houba houževnatec jedlý

(*Lentinula edodes*). Také deriváty kyseliny ganodermové z lesklokorky lesklé mají antilipidémický účinek.

K dnešnímu dni bylo zjištěno, že stále více a více aktivních složek, včetně polysacharidů a jejich proteinových komplexů a dalších sloučenin extrahovaných z hub, vykazují hypoglykemickou aktivitu (Xiao et al., 2017). Některé houby mohou přímo ovlivňovat produkci inzulínu. Například houba rosolovka listová (*Tremella foliacea*) obsahuje glukuronoxylomanan, který stimuluje tvorbu inzulínu a urychluje metabolismus glukózy (Valíček, 2011). Polysacharid Ganoderan B nalezený v lesklokorce lesklé zvyšuje hladinu inzulínu v krvi a urychluje metabolismus glukózy prostřednictvím potenciace aktivity jaterních klíčových enzymů účastnících se metabolismu sacharidů (Xiao et al., 2017). Jiné druhy hub, jako jsou rezavec šikmý (*Inonotus obliquus*), korálovec ježatý (*Hericium erinaceus*), housenice čínská (*Cordyceps sinensis*) aj, také značně snižují glykemii (Valíček, 2011).

3.5 Charakteristika vybraných druhů hub

3.5.1 Lesklokorka lesklá (*Ganoderma lucidum*)

Lesklokorka lesklá patří mezi chorošovitě houby. Má lesklou plodnici jakoby nalakovanou (obr. 1). Vyskytuje se na celé planetě, jak i v subtropických, tak i v oblastech s mírným klimatem (Jablonský, 2014). Roste od června do listopadu v listnatých a smíšených lesích na pařezech, při bázích listnatých stromů, hlavně dubů, habrů a jedlých kaštanů (Socha, 2014).

Lesklokorka lesklá je velmi ceněnou dřevokaznou houbou, která má svou domovinu ve východní Asii. Je zajímavé, že ve starověké Číně tuto houbu směla konzumovat pouze císařská rodina a z tohoto důvodu má přezdívku božská houba nesmrtelnosti. Je známa pod japonským jménem reiši a čínským ling-ži. Hojivé vlastnosti lesklokorky byly zjištěny již před 2000 lety v Číně. Obvykle tuto houbu používaly ve formě tinktur a extraktů (Socha, 2014).

Každý rok se celosvětově z vypěstovaných plodnic a podhoubí vyrábí různé léky a doplňky stravy v hodnotě 3,8 mld. dolarů. Existují velká řada forem léků z lesklokorky lesklé jako jsou tablety, kapsle, granule a také injekce. Podle čínské tradice se účinné látky z plodnic získávaly buď jejich vařením ve vodě, nebo macerací v některém z čínských alkoholických nápojů. Moderní metody pouze modifikovaly tyto staré osvědčené techniky extrakce (Jablonský, 2014). K léčbě se doporučuje využívat lesklokorku ve formě tinktury, sirupu, prášku v kapslích nebo v polévce či čaji (Socha, 2014).



Obr. 1: *Ganoderma lucidum* (autor foto: Milan Schirlo)

V pestrosti obsahu léčivých látek leskokorka lesklá patří mezi houbami na první místo (Jablonský, 2014). Jak z mycelia, tak i z plodnic bylo izolováno velké množství biologicky aktivních látek, více než 100 polysacharidů a více než 130 triterpenoidů.

V současné době je popsáno, že leskokorka posiluje imunitní systém, snižuje krevní tlak a hladinu cholesterolu v krvi, vykazuje významné hepatoprotektivní účinky a antihepatotoxickou aktivitu kvůli obsahu kyseliny ganosporerové a kyseliny ganoderové R a S. Je velmi účinná při léčbě celé řady chorob, například diabetu, kardiovaskulárních potíží, hepatitidy typu B, astmatu, nefritidy, žaludečních vředů aj. Kromě toho, leskokorka vykazuje výrazné protinádorové účinky díky obsahu β -glukanů (Socha, 2014). Nedávné studie prokázaly, že polysacharidy extrahované z plodnic, mycelia a spór leskokorky lesklé mají různé farmakologické účinky. Strukturní studie houbových polysacharidů je důležitá pro pochopení mechanismu účinku, vztahu struktury a funkce polysacharidů s terapeutickými účinky a pro výběr nových cílů pro léky (Wang et al., 2017). V leskokorce lesklé byly nalezeny polysacharid-proteinové komplexy s hypoglykemickými účinky, heteropolysacharidy rozpustné ve vodě, hlavně arabinoxylo- β -D-glukan, xylo- β -D-glukan, manno- β -D-glukan a xylomanno- β -D-glukan, vykazující antitumorovou aktivitu. Z leskokorky lesklé byl izolován peptidoglykan snižující krevní tlak a také protein ganodermin s antifungální aktivitou. Methanolový extrakt z houby obsahuje flavonoidy, chinony, polyfenoly a terpeny, které mají antimikrobiální účinek. Také leskokorka lesklá obsahuje 18 volných aminokyselin, různé mastné kyseliny, nukleosidy, vitaminy skupiny B, vitamin C, E a celou řadu minerálních látek (Socha, 2014).

3.5.2 Rezavec šikmý (*Inonotus obliquus*, čága)

Rezavec šikmý je dřevokazná chorošovitá medicínální houba (Chaga a monocyty), která se vyskytuje mimo jiné v Rusku, kde je známa pod jménem čaga (obr. 2). Roste místy relativně hojně po celý rok v listnatých a smíšených lesích (Socha, 2014). Vyskytuje se nejčastěji na břízách, jasanu a jilmu (Chaga a monocyty), po dobu 10 i více let (Socha, 2014). Z těchto stromů rezavec šikmý získává živiny (Chaga a monocyty). Rezavec šikmý je třeba sbírat pouze z živých nebo čerstvě sklizených břízy pro vyšší obsah účinných látek.



Obr. 2: *Inonotus obliquus* (autor foto Tomas Čekanavičius)

Od 12. století se rezavec šikmý tradičně používá v Rusku k léčbě gastrointestinálních poruch, kardiovaskulárních onemocnění, diabetu a dokonce i rakoviny. Údajně byl ruský kníže Vladimír Monomach vyléčen z rakoviny rtu rezavcem šikmým (Shikov et al., 2014). V Sibiři rezavec šikmý používali ve formě čaje proti tuberkulóze, bolesti břicha, chorobám jater aj. Již po několik desetiletí se z rezavce šikmého připravuje koncentrovaný výtažek Befungin (obr. 3) (Socha, 2014). Přípravky z rezavce šikmého mají posilující, tonické a protinádorové účinky a používají se při léčbě a prevenci gastrointestinálních onemocnění, pooperační léčbě maligních nádorů a syndromu chronické únavy (Zhukovich et al., 2010). Čaj z rezavce šikmého zvyšuje celkovou vytrvalost, zmírňuje bolesti a používá se k léčbě srdečních, žaludečních a jaterních onemocnění (Shikov, et al. 2014).

Biologicky aktivní aditiva na bázi extraktů z rezavce šikmého se v současné době používají v Rusku: Čagovit ve formě kapsle a elixíru, Extrabesungin, balzam Berezka, Litovit Č v tabletách, suchý extrakt z rezavce šikmého aj. Existuje značná poptávka po léčivých přípravcích Čága Tinktura (obr. 4) a Befungin (Zhukovich et al., 2010). Čága a Befungin jsou

v Rusku k dispozici v lékárnách bez lékařského předpisu a doporučují se pro perorální podání v dávce 100 ml výluhu 6krát denně nebo 20 ml Befunginu 3krát denně po dobu 3-5 měsíců jako



Obr. 3: Befungin

regulátor metabolismu a jako součást komplexní terapie gastrointestinálních onemocnění (Shikov, 2014). Ale existuje nedostatek těchto přípravků, co vyplývá převážně ze skutečnosti, že výrobci mají potíže spojené se standardizací. Normativní dokumenty pro Befungin (monografie lékopisu FS 42-3991-83), Čága Tinktura (FS 42-659-94) a Čága (Státní lékopis, 11. vydání, část 2, s. 63) jsou značně zastaralé a neodpovídají současným požadavkům. Tyto články poskytují kvalitativní a kvantitativní stanovení "chromogenního komplexu" - nejasného konceptu bez definice jeho chemického složení, založeného na gravimetrickém měření (Zhukovich, et al., 2010).

Rezavec šikmý je v Rusku známá a populární houba a její bezpečnost a některé důkazy o účinnosti jsou založeny na dlouhé tradici empirického použití. Nicméně v literatuře chybí informace o její účinnosti za kontrolovaných podmínek. Proto jsou další klinické studie vyžadovány pro posouzení nárokové aktivity u pacientů a také by byly žádoucí pro další podrobnosti o bezpečnosti léčivých přípravků z rezavce šikmého (Shikov et al., 2014).



Obr. 4: Čága Tinktura

Výrazné farmakologické účinky rezavce šikmého jsou založeny na přítomnosti různých biologicky aktivních látek a stimulují podrobné chemické studie její složení (Zhukovich, 2010).

Polysacharidy jsou hlavní aktivní složky rezavce šikmého, která vykazuje mnoho biologických aktivit, jako jsou protinádorové, imunomodulační (Lee et al., 2017) a antioxidační účinky (Du et al., 2013; Xu et al., 2014; Cui et al., 2005). Mimo jiné, rezavec šikmý vykazuje výraznou hypoglykemickou, hypolipidemickou, antivirovou a antifungální aktivitu (Sun, et al., 2008).

Radomír Socha (2016) uvádí, že z rezavce šikmého byl izolován polysacharid fukoglukomanan, který se vyznačuje protirakoviným účinkem souvisejícím s imunostimulací a aktivací B buněk a makrofágů.

Rezavec šikmý obsahuje celou řadu fenolických sloučenin s antioxidační aktivitou. K významným polyfenolům s antioxidačním účinkem patří inonoblíny A, B a C a phelligridiny D, E a G (Socha, 2014). Kromě polyfenolů se na antioxidační aktivitě podílí triterpenoidy a steroidy včetně lanosterolu, inotodiolu, trametenolu a peroxidu ergosterolů (Cui et al., 2005).

Kromě toho výzkumy prokázaly, že extrakty z plodnic rezavce šikmého se vyznačují antibakteriálními a protizánětlivými účinky (Socha, 2014).

3.6 Analytické metody využité pro stanovení účinných látek zkoumaných hub

Příprava vzorku pro analýzu zahrnovala řadu postupu:

- Homogenizace vzorku
- Extrakční metoda pro získání ze vzorku látek, které potřebujeme pro analýzu
- Izolace účinných látek.

K analýze účinných látek hub *Ganoderma lucidum* a *Inonotus obliquus* je možno zvolit řadu analytických metod:

- GC-MS spektrometrie
- Infračervená spektrometrie

3.6.1 Příprava vzorku

3.6.1.1 Homogenizace vzorku

Homogenizace je proces, při kterém pomocí míchání a zmenšování částic vzorků z původní heterogenní směsi dosáhneme homogenní. K homogenizaci pevných vzorků se

používá mletí, drcení apod. Důkladná homogenizace je základem pro získání správného materiálu pro následující analytickou část (Preanalytická příprava vzorků).

3.6.1.2 Extrakce vzorků

Extrakce je separační metoda, při které přechází složka ze směsi látek v kapalně či tuhé fázi do jiné kapalně fáze. Účinnost extrakce je založena na selektivní rozpustnosti látek v jednotlivých rozpouštědlech. Volba rozpouštědla závisí na charakteru látek, které mají být extrahovány (Klouda et al., 2003). V našem případě jsme používali extrakce z pevné fáze do kapaliny.

3.6.1.3 Izolace

K izolaci účinných látek bylo využito srážení ethanolem. Vysražení má za cíl deaktivace enzymů a odstranění nízkomolekulárních látek, hydrolýzu vzorku a izolaci nerozpustných v ethanolu polysacharidů (Du et al., 2013).

3.6.2 Analytické metody

K analýze účinných látek hub *Ganoderma lucidum* a *Inonotus obliquus* je možno zvolit řadu analytických metod.

3.6.2.1 GC-MS spektrometrie

Plynová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií je analytická metoda, která kombinuje vysokou separační účinnost kapilární plynové chromatografie s detekcí vysoce specifickou pro daný analyt a umožňují získání informace o struktuře neznámých sloučenin (Klouda, 2003).

3.6.2.2 GC-MS spektrometrie

Infračervená spektroskopie je analytická technika určená především pro identifikaci a strukturní charakterizaci organických sloučenin a také pro stanovení anorganických látek. Principem metody je absorpce infračerveného záření při průchodu vzorkem, při níž dochází ke změnám rotačně vibračních energetických stavů molekuly v závislosti na změnách dipólového momentu molekuly (Klouda, 2003).

3.6.3 Analytické metody pro stanovení polysacharidů v *Ganoderma lucidum* a *Inonotus obliquus* podle vědeckých článků

Metoda izolace polysacharidů z hub *Inonotus obliquus*, který použili ve své studii XiuJu Du, HongMei Mu, Shuai Zhou et al., 2013, zahrnovala přípravu různých polysacharidových frakcí pomocí odstředění a vysrážení 95% ethanolem.

Dalším krokem bylo stanovení celkové obsahu cukru metodou fenol-kyselina sírová. Výsledky ukázaly, že frakce IOP40 obsahovala nejvíce celkového cukru - 35,1 %.

Pak byl stanoven neutrální obsah cukru a obsah kyseliny uronové v každé frakce pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPAEC-PAD). Výsledky ukázaly, že frakce IOP40 obsahovala nejvíce neutrálních cukrů a uronové kyseliny - 30,1 % a 5 %.

Obsah bílkovin byl měřen metodou Bradfordu. Výsledky ukázaly, že frakce IOP80 obsahovala nejvíce bílkovin – 4,6 %.

Dalším krokem bylo zjištění monosacharidové kompozice a molárního poměru polysacharidů v každé frakce pomocí HPAEC-PAD. Podle výsledků polysacharidy *Inonotus obliquus* obsahovaly nejvíce d-Glukosy (Du et al., 2013).

Autoři dalšího vědeckého článku, Sheng-quan Huang, Shaodong Ding, Liuping Fan et al., 2012, postupovaly podobně jako předchozí autoři. Ale na rozdíl od prvního článku, vysrážení ethanolem a vodní extrakce v daném článku prováděly po dobu 3 hodin a postup neopakovaly. Získané surové polysacharidy *Inonotus obliquus* byly frakciovány pomocí gelové chromatografie a výtěžky těchto čtyř frakcí byly 30,2 % IOP1, 42,3 % IOP2, 14,7 % IOP3 a 12,8 % IOP4. Vzhledem k rozdílu molekulové hmotnosti byly frakce dále čištěny chromatografií na koloně Sepharose CL-6B, aby se získala pět hlavních homogenních frakcí IOP1b, IOP2a, IOP2c, IOP3a a IOP4.

Molekulová hmotnost všech vzorků byla stanovena pomocí vysoce výkonné gelové permeační chromatografie (HPGPC).

Pro identifikaci a kvantifikaci monosacharidů byla použita plynová chromatografie. Analýza ukázala, že IOP1b se skládá pouze z glukózy. Analýza cukrového řetězce frakce IOP3a byla prováděna pomocí beta-eliminační reakcí. Výsledky ukázaly, že polysacharidy z *I. obliquus* byly složeny převážně z glukózy a manózy.

Analýza celkové obsahu cukru ukázala, že nejvíce cukru obsahovala frakce IOP1b, celkem 97,2 %. Dále pomocí vysoce výkonné gel-permeační chromatografie (HPGPC) bylo zjištěno, že pouze frakce IOP3a obsahovala kromě cukru ještě protein, což znamená, že IOP3a je glykoprotein. Co se týká obsahu uronové kyseliny, první frakce IOP1b neobsahovala ji

vůbec, IOP2a obsahovala 7,5 %, IOP2c – 7,7 %, IOP3a – 21,2 % a IOP4 – 23,3 % (Huang et al., 2012).

V dalším výzkumu autoři Yang Hu, Yi Sheng, Min Yu et al., 2016, prováděly extrakce jiným způsobem než předchozí autoři. Extrahovaly při teplotě 60 °C po dobu 2,5 hodiny. Po filtraci byl supernatant koncentrován na 30% původního objemu vakuovou rotační odparkou při 60 °C. Pak ze supernatantu byly odstraněny proteiny pomocí Sevagova činidla a získaný koncentrovaný supernatant byl umístěn do 95% ethanolu při teplotě 4 °C po dobu 12 hodin. Dalším krokem byla frakcionace pomocí kolony DEAE. Byly získány tři polysacharidových frakcí IOP-I, IOP-II a IOP-III. Každá frakce byla čištěna pomocí gelové kolony Sephadex G-200.

Pomocí FT-IR analýzy byla stanovena přítomnost β -glykosidické vazby v molekulární struktuře IOP.

Monosacharidová kompozice IOP byla analyzována pomocí HPLC. Bylo pozorováno, že purifikovaná frakce IOP se skládá z Man, Rha, Glu, Gal, Xyl a Ara v molárním poměru 9,8: 13,6: 29,1: 20,5: 21,6: 5,4.

Homogenita a molekulová hmotnost IOP byla stanovena pomocí vysoce výkonné gelové permeační chromatografie (HPGPC) - asi 32,5 kDa (Hu et al., 2016).

Autoři dalšího výzkumu, Yiyong Chen, Youru Huang, Zhumei Cui et al., 2015, extrahovaly polysacharidy vroucí vodou a ethanolom. Po filtraci extract byl rozpouštěn v destilované vodě a frakcionován na koloně DEAE. Bylo odebráno devět frakcí a stanoven celkový obsah cukru metodou fenol-kyselina sírová. Tři frakce označené jako IP1, IP2 a IP3 byly shromážděny, dialyzovány a lyofilizovány. Ze všech frakcí byla zvolena pouze IP3 kvůli protinádorové aktivitě. Frakce IP3 dále byla frakcionována pomocí gelové chromatografií. Byly získány dvě frakce označené jako IP3a a IP3b a poté lyofilizovány. Frakce IP3a byla dále čištěna pomocí chromatografie na koloně Sephadex G-200.

Homogenita a průměrná molekulová hmotnost IP3a byly stanoveny pomocí HPGPC jako v předchozím článku. Analýza ukázala, že průměrná molekulová hmotnost IP3a - 48 820 Da.

Monosacharidová kompozice IP3a byla analyzována pomocí plynové chromatografie. Výsledky ukázaly, že IP3a sestává z ramnózy, arabinózy, glukózy a galaktózy v molárním poměru 2,5: 4,6: 1,0: 2,6.

Celkový obsah kyseliny uronové byl stanoven pomocí m-hydroxydifenylového testu. Test ukázal, že frakce IP3 obsahuje 30,13 % uronové kyseliny.

Dalším krokem bylo stanovení celkové obsahu cukru metodou fenol-kyselina sírová. Výsledky ukázaly, že frakce IP3 obsahovala 73,73 % celkové cukru.

Jako v předchozím výzkumu byla stanovena přítomnost β -glykosidické vazby v molekulární struktuře IP3 pomocí FT-IR analýzy (Chen et al., 2015).

Lishuai Ma, Haixia Chen, Wenchai Zhu, 2013, extrahovaly polysacharidy z hub *Inonotus obliquus* jinak než autoři předchizích článků. Nejprve vzorek hub byl třikrát vysražen 80% ethanolem při 80 °C po dobu 2 hodin. Pak sušené zbytky byly extrahovány destilovanou vodou. Potom z extraktu byly odstraněny proteiny a potom byl přidán 95% ethanol, aby se vysrážely polysacharidy. Sraženina byla odstředována a poté promyta acetonem a petroletherem. Sraženiny dále byly sušeny a označeny jako IOPS-H, IOPS-V a IOPS-F.

Kompozitní analýza frakcí IOPS-H, IOPS-V a IOPS-F zahrnovala stanovení obsahu neutrálního cukru, kyseliny uronové a bílkovin. Analýza obsahu kyseliny uronové byla provedena pomocí modifikovaného karbazolového testu s použitím jako standardu kyseliny galakturonové. Obsah bílkovin byl analyzován metodou coomassie brilliant blue s použitím hovězího sérového albuminu jako standardu. Analýza prokázala, že frakce IOPS-F obsahovala nejvíc neutrálního cukru (26,51 %), kyseliny uronové (20,22 %) a bílkovin (10,85 %).

Složení monosacharidu ve frakcích bylo měřeno plynovou chromatografií. Podle analýzy byly všechny tři vzorky IOPS složeny z ramnózy, arabinózy, manózy, galaktózy a glukózy, ale jejich molární obsah byl značně odlišný.

Molekulová hmotnost IOPS byla stanovena gelovou permeační chromatografií. Výsledky ukázaly, že sacharidové frakce IOPS se pohybují v širokém distribučním rozmezí molekul, což ukazuje podle autorů, že IOPS je vysoce dispergovatelné bez ohledu na způsob sušení (Ma, 2013).

Autoři dalšího výzkumu, Chun Xiao, Qingping Wu, Jumei Zhang et al., 2017, zkoumaly houbu druhu *Ganoderma lucidum*. Extrakce polysacharidů byla prováděna za tepla destilovanou vodou a ethanolem jako ve většině předchozích článků. Následující izolace a čištění polysacharidů autoři prováděly na koloně chromatografie DEAE Sepharose Fast Flow.

Kompozitní analýza frakce F31, stejně jako analýza *Inonotus obliquus*, zahrnovala stanovení obsahu neutrálních cukrů metodou fenol-kyselina sírová. Stanovení obsahu uronové kyseliny prováděly pomocí karbazolového testu a celkový obsah bílkovin byl stanoven metodou Lowry. Výsledky ukázaly, že neutrální polysacharidy, obsah uronové kyseliny a bílkovin ve F31 byly 65,5 %, 18,7 % a 15,1 %.

Homogenita a molekulová hmotnost F31 byla stanovena na systému Agilent HPLC. Bylo zjištěna střední molekulová hmotnost - 15,9 kD.

Strukturní charakteristiky F31 byly zkoumány spektroskopií GPC, FTIR NMR a GC-MS. Na základě získaných údajů bylo zjištěno, že F31 je β -heteropolysacharid složený z glukózy, manózy, xylózy, arabinózy a galaktózy (Xiao et al., 2017).

V dalším článku autoři, Yatao Wang, Yanfang Liu, Huazheng Yu et al., 2017, extrahovaly polysacharidy z *Ganoderma lucidum* podobně jako autoři Chun Xiao, Qingping Wu, Jumei Zhang et al., 2017, ale používaly vroucí vodu a extrakce prováděly desetkrát.

Následující izolace a čištění polysacharidů autoři prováděly na chromatografické koloně DEAE Sepharose Fast Flow.

Homogenita a průměrná molekulová hmotnost polysacharidových frakce byla stanovena použitím vysoce výkonné vylučovací chromatografie (HPSEC). Celkový obsah sacharidů byl stanoven na 95,94 %.

Analýza monosacharidové kompozice pomocí HPAEC a ukázala, že frakce GLSWA-I byla složena pouze z glukózy, což naznačuje, že jde o glukán (Wang et al., 2017).

Podle dalšího výzkumu autoři Shichao Huang, Jianxin Mao, Kan Ding et al., 2017, extrahovaly stejně jako předchozí autoři. Pro frakcionace extraktu používaly kolonu diethylaminoethylcelulózy a pro purifikace kolonu Sephacryl S-300. Relativní molekulová hmotnost frakce GLP byla analyzována pomocí metody HPGPC na hodnotu 15,0 kDa (Huang, 2017).

Ve výzkumu Yingjuan Liu, Chunyun Zhang, Jinliang Du et al., 2017, extrahovaly polysacharidy z *Ganoderma lucidum* taky vroucí vodou a třikrát vysrážely ethanolem. Celkový obsah sacharidů ve frakci byl stanoven na 93,21 % (Liu et al., 2017).

V dalším výzkumu autorů Qing Cai, Yuanyuan Li, Gang Pei, 2017, pro extrakce byla použita destilovaná voda a 95% ethanol. Extrakce opakovaly šestkrát. Stejně jako v předchozích výzkumech, polysacharidy dále izolovaly na koloně DEAE-Sephacryl S-300. Celkový obsah cukrů byl 95,94 %.

Homogenita a hmotnostní průměrná molekulová hmotnost polysacharidu byla stanovena pomocí HPGPC. Výsledky ukázaly, že relativní molekulová hmotnost frakce GLP byla přibližně 15 kDa. Metodou Lowry a m-hydroxydifenyllovou metodou bylo potvrzeno, že polysacharidy neobsahovaly bílkoviny a uronovou kyselinu (Cai et al., 2017).

4 Praktická část

4.1 Seznam vzorků a přehled analýz

Byly analyzovány houby rodu *Ganoderma* a *Inonotus*. Podrobný seznam analyzovaných vzorků a rozpis provedených analýz je uveden v tab. I a II. Na obr. 5-8 jsou snímky analyzovaných hub.

Tabulka I: Seznam vzorků k analýze účinných látek hub.

	Vzorek	Původ
1	<i>Ganoderma lucidum</i>	Česká republika (Bučovice), poskytla firma Rudolf Ryzner
2	<i>Ganoderma lucidum</i> GA2	Thajsko, dodal Ing. Jablonský, ČZU Praha
3	<i>Inonotus obliquus</i>	Ruská federace (Sibiř), dodal Evgenij Razumov
4	<i>Inonotus obliquus</i>	Ruská federace, dodal Evgenij Razumov
5	<i>Inonotus obliquus</i>	Ruská federace, dodal JUDr. Aleš Vít (česká společnost Tulipa Praha)
6	<i>Inonotus obliquus</i>	Česká republika (Berounská oblast), dodal JUDr. Aleš Vít (česká společnost Tulipa Praha)

Tabulka II: Přehled usušených vzorků plodnic a jejich analýz

Seznam hub	Zkrácený název houby	Původ houby	Extrakce polysacharidů	FT-IR vzorku	FT-IR promytého vzorku	FT-IR izolovaných frakcí	GC- MS
<i>Ganoderma lucidum</i>	GL-CZ	Česko	Ano	Ano	Ano	Ano	Ano
<i>Ganoderma lucidum</i> GA2	GL-TH	Tajsko	Ano	Ano	Ano	Ano	Ano
<i>Inonotus obliquus</i>	IO-RU1	Rusko	Ano	Ano	Ano	Ano	Ano
<i>Inonotus obliquus</i>	IO-RU2	Rusko	Ne	Ne	Ne	Ne	Ano

<i>Inonotus obliquus</i>	IO-RU3	Rusko	Ne	Ne	Ne	Ne	Ano
<i>Inonotus obliquus</i>	IO-CZ	Česko	Ne	Ne	Ne	Ne	Ano



Obr. 5: *Ganoderma lucidum*, původ Česká republika



Obr. 6: *Ganoderma lucidum* GA2, původ Tajsko



Obr. 7: *Inonotus obliquus*, původ Ruská federace



Obr. 8: *Inonotus obliquus*, původ Česká republika

4.1.1 Použité chemikálie, materiály a přístrojové vybavení

Použité chemikálie: pro analýzu zkoumaných vzorků hub byly použité běžné chemikálie dostupné v laboratoři ČZU.

Použité materiály: zahrnuje všechny potřebné materiály co byly k dispozici v laboratoři ČZU.

Použité přístroje: pro přípravu vzorků a samotnou analýzu byly použité následující přístroje:

- Analytický mlýnek – IKA A11 basic (IKA, Germany)
- Magnetická míchačka
- FT-IR spektrometr Nicolet 6700 (Nicolet USA)
- GCMS-QTOF chromatograf (Agilent, Santa Clara, FL, USA).

4.1.2 Extrakce polysacharidů

Z vzorků hub byly připraveny horkovodní extrakty. Extrakce polysacharidů vodou je založena na vaření hub v destilované vodě pod zpětným chladičem po dobu 6 hodin.

Naváží se 10 g vzorku s přesností 0,0001 g, přidá se 200 ml 80 % ethanolu pro odstranění balastních látek a nově vzniklá směs se míchá na magnetické míchačce 10 minut. Ta se potom zfiltruje za pomoci složeného filtračního papíru. Propláchnutá ethanolem surovina se shromáždí na filtračním papíru a vysuší na vzduchu. Vzorek po vysušení se zvaží. Kapalný zbytek se vyhodí.

Vysušený vzorek houby se umístí do varné baňky (250 ml), přidá se 200 ml destilované vody a varné kamínky. Baňka se nasadí na zpětný chladič, otevře se ventil od přívodu vody do zpětného chladiče a zapne topné hnízdo na 100 °C. Extrakce horkou vodou se provádí po dobu 6 hodin.

Po ukončení extrakce sejmeme baňku z chladiče a pak pomocí studené vody chladíme. Směs po extrakci se filtruje a vzniklý pevný podíl se akumuluje na filtračním papíře, posléze suší na vzduchu při pokojové teplotě a schová pro další analýzu.

Do získaného vodního extraktu se přidá čtyřnásobné množství 96 % ethanolu a nechá v ledničce přes noc, aby se sraženina obsahující polysacharidy nechala usadit. Pak následuje filtrace pro rozdělení sraženiny a kapalného zbytku. Sraženina zůstane na filtračním papíře a vysuší se na vzduchu při pokojové teplotě.

4.1.3 Stanovení izolovaných polysacharidů v houbách pomocí FT-IR spektroskopie

Ke stanovení polysacharidů v *Ganoderma lucidum* a *Inonotus obliquus* byly použity usušené frakce hub (izolované polysacharidy a pevné zbytky hub). Analýza byla provedena pomocí instrumentální metody infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací v MIR oblasti spektra. K analýze byl použit spektrometr Nicolet 6700 (Nicolet USA). FT-IR spektra byla měřena v KBr tabletě v rozsahu vlnočtů 4000 – 400 cm⁻¹ s rozlišením 2 cm⁻¹; počet skenů byl 64.

4.1.4 Stanovení aromatických látek pomocí GCMS – QTOF 7890B

Pro stanovení aromatických látek byly použity surové mléte vzorky hub. Analýza byla provedena pomocí plynového chromatografu GCMS 7890B s 7200 Q-TOF hmotnostním spektrometrem (Agilent, Santa Clara, FL, USA). GC přístroj byl vybaven headspace

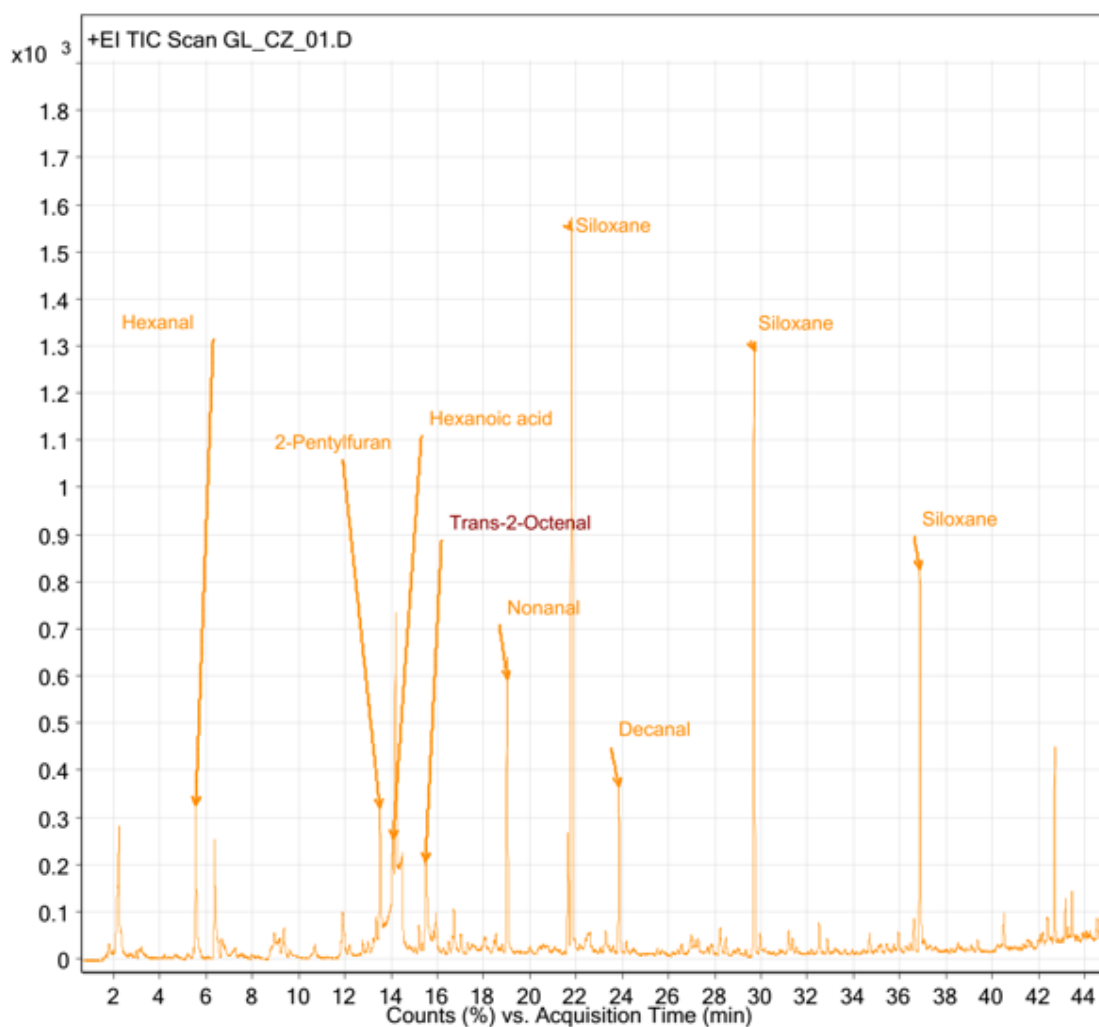
autosamplerem PAL RSI 85 (CTC Analytics, Zwingen, CH) s HP-5MS analytickou kolonou (30 m x 250 μ m x 0.25 μ m) (Agilent, Santa Clara, FL, USA). Dva (2) gramy předem jemně namletých zkoumaných vzorků plodnic hub byly vloženy do 20 ml headspace vialek a sorbovány na vlákne SPME (50/30 μ m DVB/CAR/PDMS) (Supelco, Bellefonte, PA, USA). Prvním krokem bylo inkubovat vialky při 60 °C na dobu 15 min. a potom byly těkavé látky sorbované na vlákne na 45 min. při stejné teplotě. Vlákna byla potom vstříknutá do vstupu přístroje (Bezúhonová, jednobodová, ultra inertní vložka), zahřátého na 250 °C a desorbována na 20 min. Počáteční teplotní program byl 40 °C na dobu 3 min a pak byla teplota zvýšena na 231 °C při poměru 3 °C/min, a udržena na konstantní hodnotě na dobu 13,3 min. Jako nosný plyn bylo použito Helium s poměrem průtoku 1ml/min. Celková doba analýzy byla 80 min. Elektronová ionizační energie byla stavěna na 70 eV a ionty byly monitorovány v režimu “full-scale”. Identifikace těkavých látek byla prováděna na základě srovnávání hmotnostních spekter (případně chromatogramů) s relativními retenčními indexy pomocí knihovny dat Národní instituce standard a technologie (NIST, USA).

5 Výsledky

5.1 Chromatografická analýza

Pomocí plynové chromatografie GCMS-QTOF bylo provedeno stanovení aromatických látek v surových, čerstvě jemně namletých vzorcích hub, a to konkrétně, *Ganoderma lucidum* GA2 tajského původu (GL-TH), *Ganoderma lucidum* českého původu (GL-CZ) a *Inonotus obliquus* jak českého (IO-CZ) tak i ruského původu ze třech různých oblastí (IO-RU1, IO-RU2 a IO-RU3).

Na chromatogramu vzorku GL-CZ uvedenému na obr. 9 byl nalezen aldehyd hexanal, který byl eluován mezi prvními látkami po retenčním čase (RT) zhruba 5 a půl minut. Stejná látka byla také nalezena u vzorku GL-TH a IO-RU1.



Obr. 9: Chromatogram surového vzorku *Ganoderma lucidum* českého původu (GL-CZ)

Další stanovenou látkou byla 2-pentylfuran v RT 13,5, který byl také přítomen ve vzorkách GL-CZ, GL-TH a IO-RU1. Další pík (RT 14 min.) ukazuje na přítomnost kyseliny hexanové patřící mezi nasycené monokarboxylové kyseliny, která se používá v průmyslu na výrobu umělých vůní. Tato látka byla nalezena ve vzorkách GL-CZ a GL-TH. U ostatních vzorků IO-RU1, IO-RU2 a IO-RU3 intenzita tohoto píku byla mnohem méně.

Následující pík (RT 15,4 min.) u vzorků GL-CZ a GL-TH ukazuje na přítomnost trans-2-oktenal. Další pík v RT 19 ukazuje na aldehyd nonanal. V retenčních časech okolo 22, 30 a 37 minutách na obr. 9 byl pozorován siloxan, který v analýze byl použit jako standard.

Obr. 16 ukazuje na přítomnost látek, jako jsou například, 6-methyl-5-hepten-2-on, 2-undekanon a 2-methyl-5-(1-methylethyl)-fenol. Kromě toho byl v tom také nalezen karvakrol.

Na chromatogramu vzorku IO-RU1 (obr. 17) je vidět píky popisující 1,3-dimethylbenzen a 1,2-dimethylbenzen. Další látkou nalezenou ve vzorku IO-RU1 byl D-limonen, který je

cyklický monoterpen a hlavní komponent oleje citrusových kůr. Kromě D-limonenu byl též nalezen β -selinen.

Ve vzorku IO-RU2 (obr. 18) byl také zjištěn další látky, jako jsou α -santalen a α -himachalen.

5.2. Extrakce polysacharidů

Dále následovala extrakce polysacharidů a dalších makromolekulárních látek vzorků *Ganoderma lucidum* českého původu (GL-CZ), *Ganoderma lucidum* tajského původu (GL-TH) a *Inonotus obliquus* ruského původu (IO-RU1). Výsledkem bylo získání vodorozpustné polysacharidové frakce (F1) a ve vodě nerozpustný pevný podíl po horkovodní extrakci, frakce (F2), ze všech třech sledovaných vzorků GL-CZ, GL-TH a IO-RU1. Všechny tyto frakce byly připraveny pro následující analýzu pomocí infracervené spektrometrie. Z výsledků, uvedených v tab. III lze pozorovat, že výtěžky extraktů byly v rozmezí od 0,86 do 5,12 %.

Tabulka III: Výsledné hmotnosti surových vzorků, promytých vzorků, pevného podílů, extraktů, objem vodních extraktů a výtěžků extraktů.

Vzorek	Hmotnost surového vzorku (g)	Hmotnost promytého vzorku (g)	Hmotnost pevného podílu (g)	Objem vodního extraktu (mL)	Hmotnost extraktu (g)	Výtěžek extraktu (%)
GL-CZ	10,0001	9,1316	9,0240	146	0,0783	0,86 %
GL-TH	13,8114	12,4203	11,9544	140	0,2026	1,63 %
IO-RU1	10,0003	8,9883	6,7595	170	0,4598	5,12 %

5.3 Spektroskopické analýzy

5.3.1 Interpretace FT-IR spekter

Pak následovalo analytické stanovení chemických látek v získaných frakcích GL-CZ-F1, GL-CZ-F2, GL-TH-F1, GL-TH-F2, IO-RU1-F1 a IO-RU1-F2 pomocí FT-IR spektrometrie.

Úkolem bylo stanovit chemické složení celého spektra účinných látek zkoumaných hub. V tabulce IV je uvedeno zařazení charakteristických pásů v MIR oblasti. Na základě získaných spekter uvedených na obr. 10-15 bylo zjištěno, že všechna frakce měly pásy typické pro uhlovodíky.

Dále bylo pozorováno, že všechny frakce obsahují β -glukany, jelikož v každém spektru byl pík blízky 1078 cm^{-1} , který je charakteristický pouze pro β -glukany. Všechny dvě frakce měly spektrum s píkem 1314 cm^{-1} odpovídajícím celulóze. V druhé frakce *Ganoderma lucidum* (GL-CZ-F2) byl nalezen pík blízky 1640 cm^{-1} , což odpovídá přítomnosti amidů I.

V oblasti $3405\text{--}3395\text{ cm}^{-1}$ je vidět široký pás, který je společný pro všechny vzorky. Tento pás byl přiřazen valenčním vibračním OH vazeb. Okolo pásu $2924\text{--}2939\text{ cm}^{-1}$ je vidět valenční vibrace skupin CH_2 . K podobným výsledkům dospěla studie Ma Y. et al., 2017. Oblast kolem píků $1697\text{--}1594\text{ cm}^{-1}$ ukazují na vibrace amid I vazby, kterou můžeme připisovat k bílkovinám. Jediný rozdíl je vidět u vzorku IO-RU1-F2, kde je rameno 1697 cm^{-1} ukazující na amid II, což je také bílkovina. Vibrace C-O-C glykosidické vazby jsou pozorovány v oblasti 1156 cm^{-1} . Pásky v oblasti $1362\text{--}1452\text{ cm}^{-1}$ ukazují na přítomnost CH_2 skupin v polysacharidech, zatímco v oblasti $1325\text{--}1416\text{ cm}^{-1}$ je vidět valenční vibrace CH skupin v ligninu a uhlovodíku, ale pás $1374\text{--}1372\text{ cm}^{-1}$ ukazuje na deformační vibrace v rovine. Zajímavé je také valenční symetrická vibrace v CH_2 celulóze. Je zajímavá oblast $1200\text{--}888\text{ cm}^{-1}$, kde jsou vidět překrývající se pásy C-C a C-O valenční vibrace, která ukazuje na přítomnost polysacharidů. Z toho oblast $1081\text{--}1076\text{ cm}^{-1}$ je připisována β -glukanu. V oblasti $774\text{--}778\text{ cm}^{-1}$ je vidět valenční vibrace.

Tabulka IV: Přiřazení charakteristických středních infračervených pásů ve střední oblasti.

Vlnová délka (cm^{-1})	Funkční skupina
3414-3395	Valenční vibrace – OH skupiny
2939-2924	Vibrace asimetrické CH_2
1643	Amid I
1420-1416	C-H deformace v ligninu a uhlovodíku
1377-1373	C-H deformační vibrace v rovine
1314	Symetrické CH_2 vibrace v celulóze
1156-1154	C-O-C asymetrická vibrace glykosidické vazby
1081-1076	C-O vibrace β -glukanů
1045-1040	Vibrace C-O-C skupiny
779-773	COO^- deformace
578-574	Deformační vibrace polysacharidů

6 Diskuze

Cílem diplomové práce bylo prokázat pomocí dostupných chemických metod, jaké účinné látky obsahují dřevokazné houby a porovnat získané výsledky s údaji odborných zdrojů. Byly analyzovány vzorky dřevokazných hub *Ganoderma lucidum* a *Inonotus obliquus* různého původu. Nejprve bylo provedeno stanovení aromatických látek v surových vzorcích hub (GL-CZ, GL-TH, IO-RU1, IO-RU2, IO-RU3) pomocí plynové chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií.

Chromatogram vzorku GL-CZ (obr. 9) ukázal na přítomnost aldehydu hexanal, který byl eluován mezi prvními látkami po 5,5 minutách. Na chromatogramech vzorků GL-TH a IO-RU1 byly pozorovány stejné látky. Hexanal je aldehyd, kterému je připisované antimikrobiální účinky, pak má význam v potravinářském průmyslu, kde se používá na výrobu ovocných vůní a jako látka, která zpomaluje kažení ovoce.

V dalších vzorcích GL-CZ, GL-TH a IO-RU1 byla stanovena látka 2-pentylfuran v retenčním čase 13,5 min. 2-pentylfuran se vyskytuje ve mnoha potravinách, včetně alkoholických nápojů, brambor, rajčat, sojových bobů. Je také součástí aromatických látek nalezených v těchto potravinách.

Pík v čase 14 ukazoval na přítomnost kyseliny hexanové patřící mezi nasycené monokarboxylové kyseliny, která se používá v průmyslu na výrobu umělých vůní. Tato látka byla nalezena ve vzorcích GL-CZ a GL-TH. Na chromatogramech ostatních vzorků IO-RU1, IO-RU2 a IO-RU3 intenzita tohoto píku byla mnohem nižší.

Další pík v čase 15,4 u vzorků GL-CZ a GL-TH ukazoval na přítomnost trans-2-oktenalu. Pík v čase 19 ukazoval na aldehyd nonanal, který, jak je obecně známo, má význam v parfumerii a potravinářství kvůli jejímu intenzivní vůni. Chromatogram vzorku GL-CZ obsahoval ještě další píky, které patřily k látce siloxan, použity v analýze jako standard.

Chromatogram vzorku GL-TH také obsahoval píky, odpovídající látkám 6-methyl-5-hepten-2-on, 2-undekanon a 2-methyl-5-(1-methylethyl)-fenol. Navíc byl pozorován pík ukazující na karvakrol, který má antimikrobiální účinky a používá se jako potravinové aditivum.

Chromatogram vzorku IO-RU1 obsahoval píky látek 1,3-dimethylbenzen a 1,2-dimethylbenzen. Přítomnost těchto látek může být následkem schopnosti hub akumulovat toxické látky z prostředí. Kromě toho na chromatogramu vzorku IO-RU1 byl pozorován pík odpovídající látce D-limonen, která je cyklický monoterpen a hlavní komponent oleje citrusových kůr. Podle některých výzkumů, D-limonen pomáhá při léčbě a prevenci rakoviny

(Crowell et al., 1994). Navíc, D-limonen podporuje hubnutí, pomáhá při bronchitidě, pálení žáhy a má protizánětlivé účinky. Používá se také jako chuťová přísada při výrobě potravin. Kromě D-limonenu byl nalezen β -selenin. Ve vzorku IO-RU2 také vyskytovaly další látky, jako α -santalen a α -himachalen.

Vodorozpustné polysacharidové frakce (F1) a ve vodě nerozpustný pevný podíl po horkovodní extrakci, frakce (F2), ze všech tří sledovaných vzorku GL-CZ-, GL-TH a IO-RU1 byly podrobeny analýze pomocí infračervené spektrometrie. Úkolem bylo stanovit chemické složení celého spektra účinných látek zkoumaných hub. V tabulce IV je uvedeno zařazení charakteristických pásů v MIR oblasti.

Vzhledem k tomu, že všechna spektra (obr. 10 - 15) jsou si dost podobná spektra vzorku IO-RU1 (obr. 10), co se týče vlnové délky zjištěných funkčních skupin, byl díky tomu popsán jenom tento spektra pro ilustraci. Na základě získaných spekter uvedených na obr. 10-15, bylo zjištěno, že všechny frakce měly pásy typické pro uhlovodíky. Oblast kolem 3414 cm^{-1} je typická pro valenční vibrace hydroxylu a vody (Ng, 1998). Této oblasti také může být přisuzována jak symetrická, tak i antisymetrická -NH valenční vibrace v aminových skupinách. Rameno 2939 cm^{-1} může ukázat na přítomnost symetrické a antisymetrické valenční vibrace CH_2 skupin. Pásy kolem 1694 a 1501 cm^{-1} jsou důkazem existence amid I a amid II vibrace u bílkovin. U pásu 1462 cm^{-1} je patrná rovinná deformační vibrace CH_2 , zatímco pás 1415 cm^{-1} je připisován symetrické valenční vibraci COO^- a 1382 cm^{-1} může být důsledkem symetrické deformační vibrace CH_3 skupin. Okolo 1328 cm^{-1} je pás, který může být příčinou silné barevnosti, typické pro houby rodu *Inonotus*. Je pravděpodobné, že důsledkem je CO valenční vibrace u polymeru nenasycených sloučenin obsahující konjugované $\text{C}=\text{C}$ a $\text{C}=\text{O}$ vazby. Je všeobecně známé, že oblast od $1200 - 950\text{ cm}^{-1}$ je považována za oblast polysacharidů, obsahující vysoký výskyt překrývajících CO a CC spektrum valenční vibrace u polysacharidů (Synytsya et al., 2009). Queiroz et al., (2010) naopak tvrdí, že nikoli $1200 - 950\text{ cm}^{-1}$ ale, že různé formy β - glykanu se vyskytují v oblasti $1500\text{ cm}^{-1} - 750\text{ cm}^{-1}$. Kozarski et al., (2012) přisuzoval pás 1080 cm^{-1} k β -glukanům izolovaným z polysacharidů vyskytujících se v houbě *Lentinus edodes*.

Drobné rameno v oblasti okolo 900 cm^{-1} v Obr. 10 je připisováno β -D-glukan. Synytsya et al., (2009) to zjistil v oblasti kolem 894 cm^{-1} , ale Qian et al., (2009) označil pásy okolo celé oblasti od 930 do 900 cm^{-1} jako β -D-glukan. Na druhé straně, pásy u 773 cm^{-1} ukazují na pravděpodobnou přítomnost β -glykosidické vazby. Tento výsledek je v souladu se studií Mohacek-Grosov a Puppels, 2001, kteří tvrdí, že v oblasti od $950 - 750\text{ cm}^{-1}$ se vyskytují α - a β - anomery $\text{C}_1\text{-H}$ deformační vibrace polysacharidů. Jejich studie navíc připisuje

α -(1,3)-glukan k piku 822 cm^{-1} a α -(1,6)- je přiřazená k pásům 929 a 850 cm^{-1} . Podle nich β -(1,3)-D-glukan je možno vidět u piku 890 cm^{-1} .

7 Závěr

Úkolem diplomové práce bylo prokázat pomocí dostupných chemických metod, jaké účinné látky obsahují dřevokazné houby a porovnat získané výsledky s údaji odborných zdrojů.

Diplomová práce byla rozdělena na část teoretickou a část praktickou. V rámci teoretické části práce bylo cílem charakterizovat podle odborných zdrojů biologicky aktivné látky hub, jejich léčivé účinky a také popsat vybrané analytické metody pro jejich stanovení.

Praktická část zahrnuje přehled analyzovaných vzorků hub rodů *Ganoderma lucidum* a *Inonotus obliquus* a metod, které byly použity k stanovení účinných látek, obsažených v těchto houbách. Dále praktická část obsahuje výsledky a diskuzi.

K analýze byly vybrány vzorky dřevokazných hub *Ganoderma lucidum* původu z Česka a Tajska, a také hub *Inonotus obliquus* původu z Česka a různých oblastí Ruska.

U všech surových vzorků hub byly stanoveny aromatické látky pomocí plynové chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií. Bylo zjištěno, že zkoumané houby obsahovaly aromatické látky jak s prospěšnými účinky (karvakrol, D-limonen aj), tak i případně toxické sloučeniny (benzen, toluen, furan aj). Zastoupení těchto látek se lišil v různých vzorcích hub. Příčinou tomu může být vliv prostředí a půdy kde rostla jednotlivá houba. Výskyt toxických látek v houbách může být ovlivněn schopnosti hub akumulovat tyto látky z prostředí. Proto je třeba dávat pozor místu kde sbíráme houby.

Dále byla provedena horkovodní extrakce s následujícím vysražením ethanolem. Úkolem bylo izolovat polysacharidy a další makromolekulární látky hub *Ganoderma lucidum* českého a tajského původu, a hub *Inonotus obliquus* ruského původu. Jako výsledek bylo získáno šest frakce (GL-CZ-F1, GL-CZ-F2, GL-TH-F1, GL-TH-F2, IO-RU1-F1 a IO-RU1-F2).

U všech uvedených frakcí bylo stanoveno chemické složení pomocí infračervené spektrometrie v MIR oblasti. Z výsledných absorpčních spekter bylo patrné, že všechny nalezené látky jsou uhlovodíky. Každá frakce obsahovala polysacharidy, včetně β -glukanů, a také bílkoviny.

Na základě získaných výsledků je patrné, že dřevokazné houby obsahují celou řadu účinných látek (polysacharidy, bílkoviny, aromatické látky), což odpovídá výsledkům odborných článků. Podařilo se nám dokázat, že dřevokazné houby jsou zdrojem β -glukanů, které jsou odpovědné za imunostimulační, protirakovinné, protizánětlivé a další důležité účinky.

Je známo, že dřevokazné houby se tradičně používají ve východní medicíně jako lék (Čína, Japonsko, Tajsko aj). Ale v západní medicíně se houby používají jenom jako doplněk

stravy a jejich léčivé účinky dosud neprokázány v dostatečné míře a nepotvrzeny klinickými studiemi.

Závěrem lze říci, že využití dřevokazných hub představují pro moderní západní medicínu, farmacii a potravinářství perspektivní směr pro vývoj nových léčivých přípravků proti rakovině, diabetu, kardiovaskulárních onemocnění a dalších chorob, představujících aktuální problém dnešní populaci.

8 Seznam použité literatury

Bach, F., Helm, C.V., Bellettini, M.B., Maciel, G.M., Haminiuk, C.W.I. 2017. Edible mushrooms: a potential source of essential amino acids, glucans and minerals. *International Journal of Food Science and Technology*. 52. 2382–2392.

Bilbao-Sainz, C., Chiou, B.S., Williams, T., Wood, D., Du, W.X., Sedej, I., Ban, Z., Rodov, V., Poverenov, E., Vinokur, Y., McHugh, T. 2017. Vitamin D-fortified chitosan films from mushroom waste. *Carbohydrate Polymers*. 167. 97–104.

Cai, Q., Li, Y., Pei, G. 2017. Polysaccharides from *Ganoderma lucidum* attenuate microglia-mediated neuroinflammation and modulate microglial phagocytosis and behavioural response. *Journal of Neuroinflammation* 14. 63.

Cui, Y., Kim, D.S., Park, K.C. 2005. Antioxidant effect of *Inonotus obliquus*. *Journal of Ethnopharmacology*. 96. 79–85.

Chaga a monocyty. In: *MycoMedica* medicínální houby. Dostupné z <http://www.mycomedica.cz/clanky-chaga-a-monocyty.html>

Chen, S., Yong, T., Zhang, Y., Su, J., Jiao, C., Xie, Y. 2017. Anti-tumor and anti-angiogenic ergosterols from *Ganoderma lucidum*. *Frontiers in Chemistry*. *Front Chem*. 5. 85.

Chen, Y., Huang, Y., Cui, Z., Liu J. 2015. Purification, characterization and biological activity of a novel polysaccharide from *Inonotus obliquus*. *International Journal of Biological Macromolecules* 79. 587–594.

Chou, W.T., Sheih, I.C., Fang, T.J. 2013. The Applications of polysaccharides from various mushroom wastes as prebiotics in different systems. *Journal of Food Science*. Vol. 78. Nr. 7.

Crowell, P.L., Gould, M.N. 1994. Chemoprevention and therapy of cancer by d-limonene. *Crit Rev Oncog*. 5(1). 1-22.

Du, X.J., Mu, H.M., Zhou, S., Zhang, Y., Zhu, X.L. 2013. Chemical analysis and antioxidant activity of polysaccharides extracted from *Inonotus obliquus sclerotia*. *International Journal of Biological Macromolecules* 62. 691 – 696.

Gargano, M.L., van Griensven, L. J. L. D., Isikhuemhen, O.S., Lindequist, U., Venturella, G., Wasser, S.P., Zervakis, G.I. 2017. Medicinal mushrooms: Valuable biological resources of high exploitation potential. *Plant Biosystems*. Vol. 151. No. 3. 548–565.

Gorlenko M.V., Garibova L.V., Sidorova I.I., Uspenskaya G.D. 1986. *Všechno o houbách*. M.: Lesní průmysl. 280.

Huang, S.Q., Ding, S., Fan, L. 2012. Antioxidant activities of five polysaccharides from *Inonotus obliquus*. *International Journal of Biological Macromolecules* 50. 1183–1187.

Huang, S., Mao, J., Ding, K., Zhou, Y., Zeng, X. 2017. Polysaccharides from *Ganoderma lucidum* Promote Cognitive Function and Neural Progenitor Proliferation in Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Stem Cell Reports*. Vol. 8. 84–94.

Hu, T., Huang, Q., Wong, K., Yang, H. 2017. Structure, molecular conformation, and immunomodulatory activity of four polysaccharide fractions from *Lignosus rhinocerotis sclerotia*. *International Journal of Biological Macromolecules* 94. 423–430.

Hu, Y., Sheng, Y., Yu, M., Li, K., Ren, G., Xu, X., Qu, J. 2016. Antioxidant activity of *Inonotus obliquus* polysaccharide and its amelioration for chronic pancreatitis in mice. *International Journal of Biological Macromolecules* 87. 348–356.

Jablonský, I., Šásek, V. 2006. *Jedlé a léčivé houby, pěstování a využití*. 1. Vyd. Praha. Nakladatelství Brázda, s.r.o. 264 s. ISBN: 80-209-0341-0.

Jablonský, I. 2014. *Léčivé houby a jejich využití*. Edukafarm. Farmi News. Očima mykologa. 32-33.

Pavel Kalač, 2009. Chemical composition and nutritional value of European species of wild growing mushrooms: A review. *Food Chemistry* 113: 9–16.

Klouda, P. 2003. Moderní analytické metody. 2. Vyd. Ostrava. Nakladatelství Pavel Klouda. 132 s. ISBN: 80-86369-07-2.

Lee, J.S., Lee, K.R., Lee, S., Lee, H.J., Yang, H.S., Yeo, J., Park, J.M., Choi, B.H., Hong, E.K. 2017. Polysaccharides Isolated from Liquid Culture Broth of *Inonotus obliquus* Inhibit the Invasion of Human Non-small Cell Lung Carcinoma Cells. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 22. 45-51.

Lee, S., Lee, D., Park, J.Y., Seok, S., Jang, T.S., Park, H.B., Shim, S.H., Kang, K.S., Kim, K.H. 2018. Antigastritis effects of *Armillariella tabescens* (Scop.) Sing. and the identification of its anti-inflammatory metabolites. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 70. 404–412.

Liu, Y., Zhang, C., Du, J., Jia, R., Cao, L., Jeney, G., Teraoka, H., Xu, P., Yin. 2017. Protective effect of *Ganoderma lucidum* polysaccharide against carbon tetrachloride-induced hepatic damage in precision-cut carp liver slices. *Fish Physiol Biochem* 43. 1209–1221.

Kozarski, M., Klaus, A., Nikšić, M., Vrvic M.M., Todorovic, N., Jakovljevic D., Van Griensven, L.J.L.D. 2012. Antioxidative activities and chemical characterization of polysaccharide extracts from the widely used mushrooms *Ganoderma applanatum*, *Ganoderma lucidum*, *Lentinus edodes* and *Trametes versicolor*. *J. Food Comp. Anal.* 26. 144–153.

Ma, L., Chen, H., Zhu, W., Wang, Z. 2013. Effect of different drying methods on physicochemical properties and antioxidant activities of polysaccharides extracted from mushroom *Inonotus obliquus*. *Food Research International* 50. 633–640.

Ma, Y., He, H., Wu, J., Wang, C., Chao, K., Huang, Q. 2017. Assessment of Polysaccharides from Mycelia of genus *Ganoderma* by Mid-Infrared and Near-Infrared Spectroscopy. *Scientific reports*. 8.10.

Mohaček-Grošev, V., Puppels, G.J. 2001. Vibrational spectroscopic characterization of wild growing mushrooms and toadstools. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.* 57 (14). 2815–2829.

Muszyńska, B., Grzywacz-Kisielewska, A., Kala, K., Gdula-Argasinska, J. 2018. Anti-inflammatory properties of edible mushrooms: A review. *Food Chemistry* 243. 373–381.

Ng, T.B. 1998. A review of research on the protein-bound polysaccharide (polysaccharopeptide, PSP) from the mushroom *Coriolus versicolor* (basidiomycetes: Polyporaceae). *Gen. Pharmacol.* 30 (1). 1-4.

Niedzielski, P., Mleczek, M., Budka, A., Rzymiski, P., Siwulski, M., Jasinska, A., Gasecka, M., Budzynska, S. 2017. A screening study of elemental composition in 12 marketable mushroom species accessible in Poland. *Eur Food Res Technol* 243. 1759–1771.

Qian, J.Y., Chen, W., Zhang, W.M., Zhang, H. 2009. Adulteration identification of some fungal polysaccharides with SEM, XRD, IR and optical rotation: A primary approach. *Carbohydr. Polym.* 78. 620–625.

Queiroz, L.S., Nascimento, M.S, Cruz A.K., Castro, A.J., Moura, M.F., Baseia, I.G., Araujo, R.M., Benevides, N.M., Lima, L.F., Leite, E.L. 2010. Glucans from the *Caripia montagnei* mushroom present anti-inflammatory activity. *Int Immunopharmacol.* 10. 34–42.

Reishi (*Ganoderma lucidum*-lesklokorka lesklá). In: *MycoMedica medicínální houby*. Dostupné z <http://www.mycomedica.cz/clanky-reishi-ganoderma-lucidum-lesklokorka-leskla.html>

Shikov, A.N., Pozharitskaya, O.N., Makarov, V.G., Wagner, H., Verpoorte, R., Heinrich, M. 2014. Medicinal Plants of the Russian Pharmacopoeia; their history and applications. *Journal of Ethnopharmacology.* 154. 481–536.

Socha, R. 2014. *Encyklopedie léčivých hub*. 1. vyd. Praha: Academia. 768 s. ISBN: 978-80-200-2312-4.

Sun, J.E., Ao, Z.H., Lu, Z.M., Xu, H.Y., Zhang, X.M. 2008. Antihyperglycemic and antilipidperoxidative effects of dry matter of culture broth of *Inonotus obliquus* in submerged culture on normal and alloxan-diabetes mice. *Journal of Ethnopharmacology.* 118. 7–13.

Synytsya, A., Mičková, K., Synytsya, A., Jablonský, I., Spěváček, J., Erban, V., Kovářiková, E., Čopíková, J. 2009. Glucans from fruit bodies of cultivated mushrooms *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus eryngii*: Structure and potential prebiotic activity. Carbohydr. Polymers. 76. 548–556.

Valíček, P. 2011. Houby a jejich léčivé účinky. 1. vyd. Benešov. Start. 151 s. ISBN: 978-80-86231-54-9.

Vančuríková, Z. 2012. Léčivé houby a možnosti jejich využití v prevenci a léčbě. Ženšen: Časopis Komory TČM. 26-29.

Veljovic, S., Veljovic, M., Nikicevic, N., Despotovic, S., Radulovic, S., Nikšić, M., Filipovic, L. 2017. Chemical composition, antiproliferative and antioxidant activity of differently processed *Ganoderma lucidum* ethanol extracts. J Food Sci Technol. 54(5). 1312–1320.

Vitak, T., Yurkiv, B., Wasser, S., Nevo, E., Sybirna, N. 2017. Effect of medicinal mushrooms on blood cells under conditions of diabetes mellitus. World J Diabetes. 8(5). 187-201.

Xiao, C., Wu, Q., Zhang, J., Xie, Y., Cai W., Tan, J. 2017. Antidiabetic activity of *Ganoderma lucidum* polysaccharides F31 downregulated hepatic glucose regulatory enzymes in diabetic mice. Journal of Ethnopharmacology 196. 47–57.

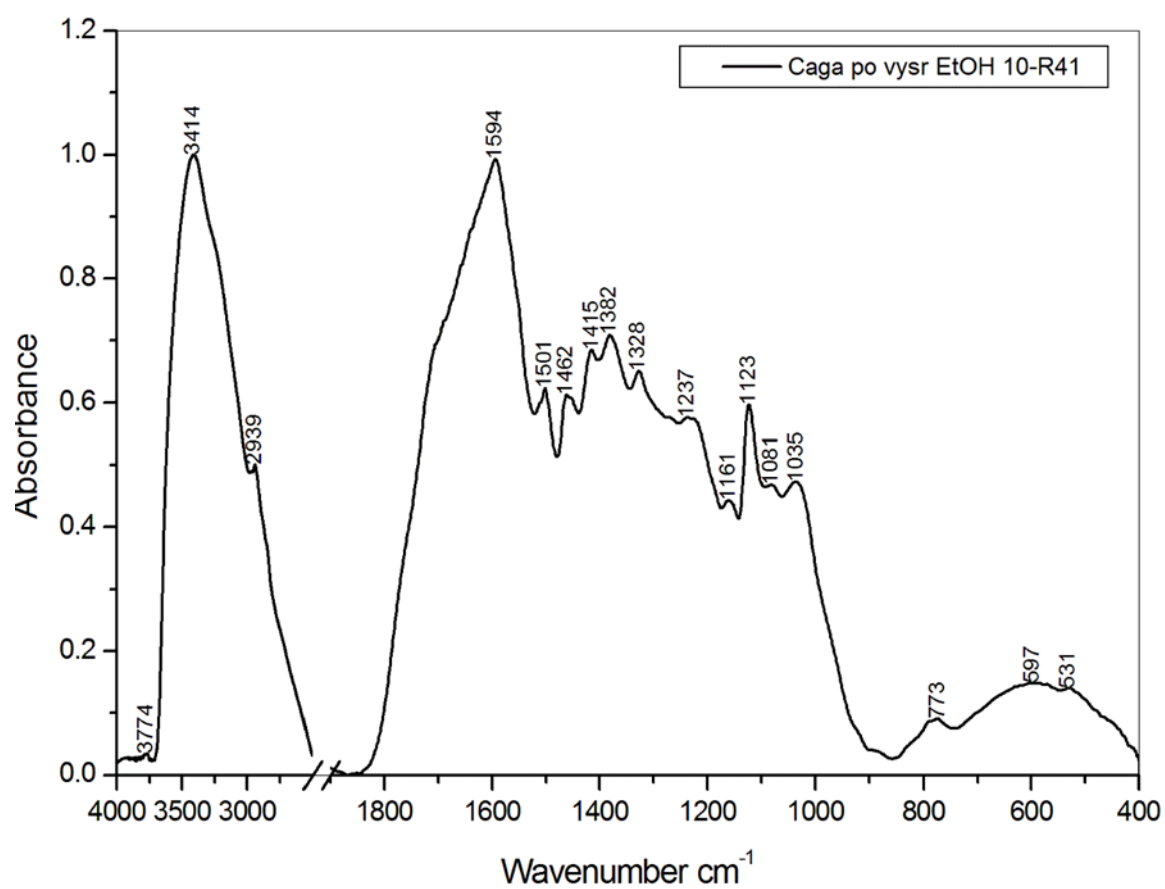
Xu, X., Hu, Y., Quan, L. 2014. Production of bioactive polysaccharides by *Inonotus obliquus* under submerged fermentation supplemented with lignocellulosic biomass and their antioxidant activity. Bioprocess Biosyst Eng. 37. 2483–2492.

Wang, C.L., Cui, H.Y., Wang, Y.R., Wang, Z.F., Li, Z.J., Chen, M.H., Li, F.J. 2013. Bidirectional immunomodulatory activities of polysaccharides purified from *pleurotus nebrodensis*. Inflammation. Vol. 37. No. 1.

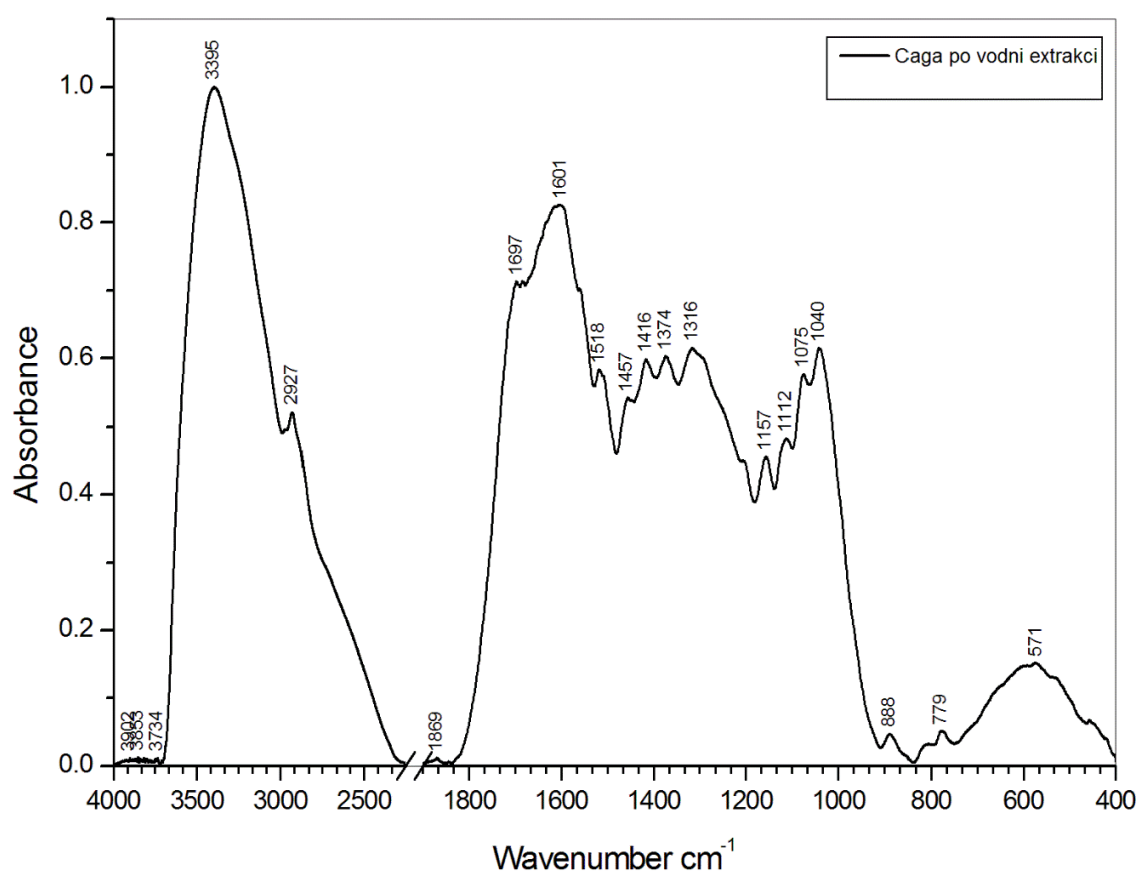
Wang, Y., Liu, Y., Yu, H., Zhou, S., Zhang, Z. 2017. Structural characterization and immunoenhancing activity of a highly branched water-soluble beta-glucan from the spores of *Ganoderma lucidum*. Carbohydrate Polymers 167. 337–344.

Zhukovich, E.N., Semenova, M.Y., Sharikova, L.A., Pribytkova, T.F. 2010. Standardization of Chaga Tincture and Befungin. Pharmaceutical Chemistry Journal. Vol. 44, No. 3.

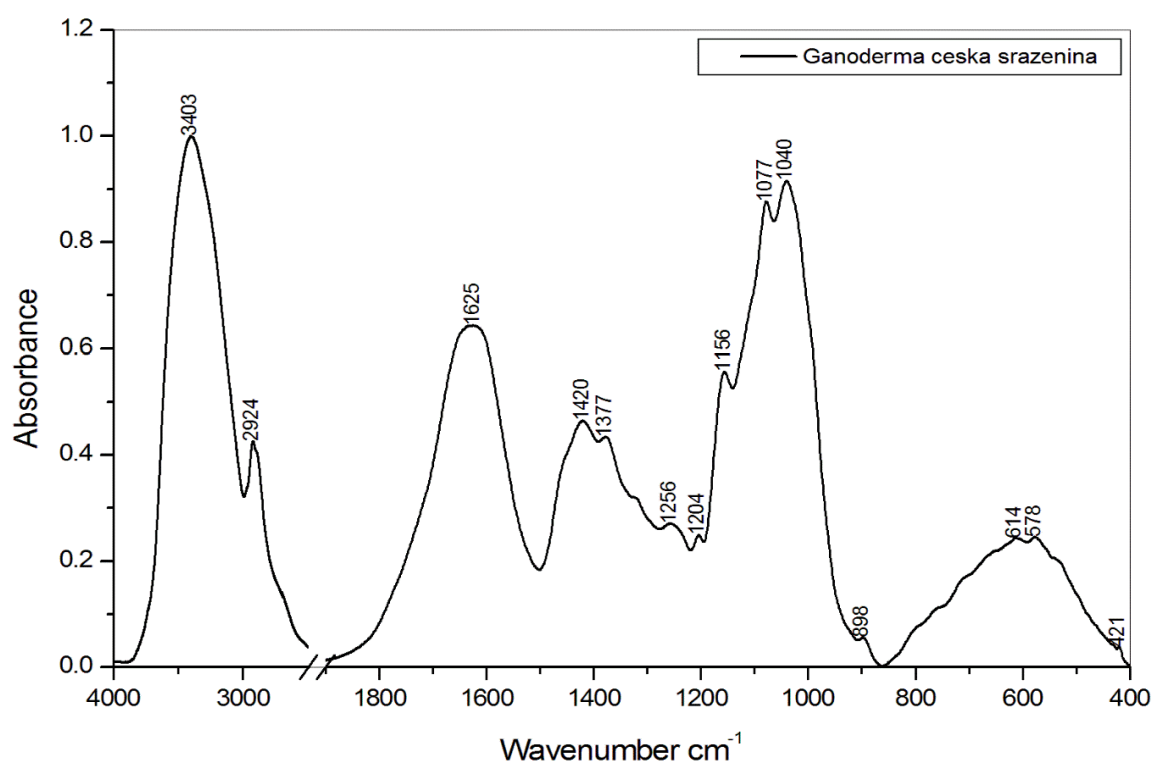
9 Samostatné přílohy



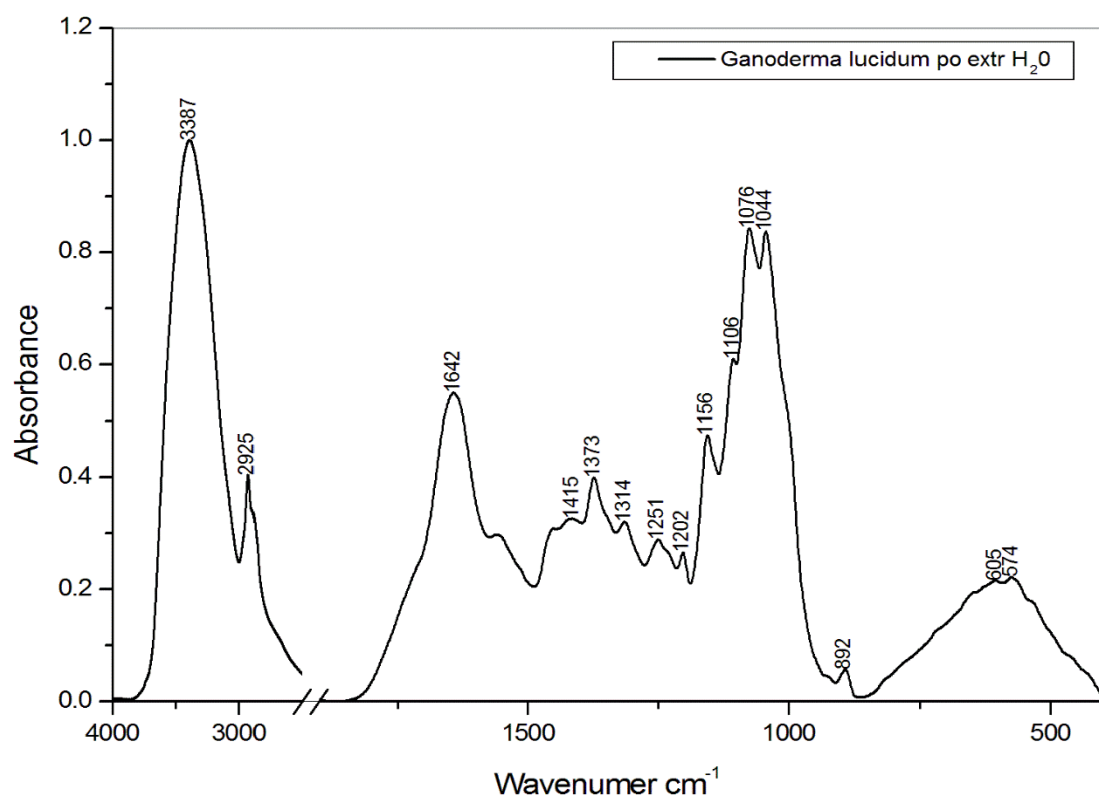
Obr. 10: Absorpční spektrum polysacharidové frakce *Inonotus obliquus* ruského původu (IO-RU-F1).



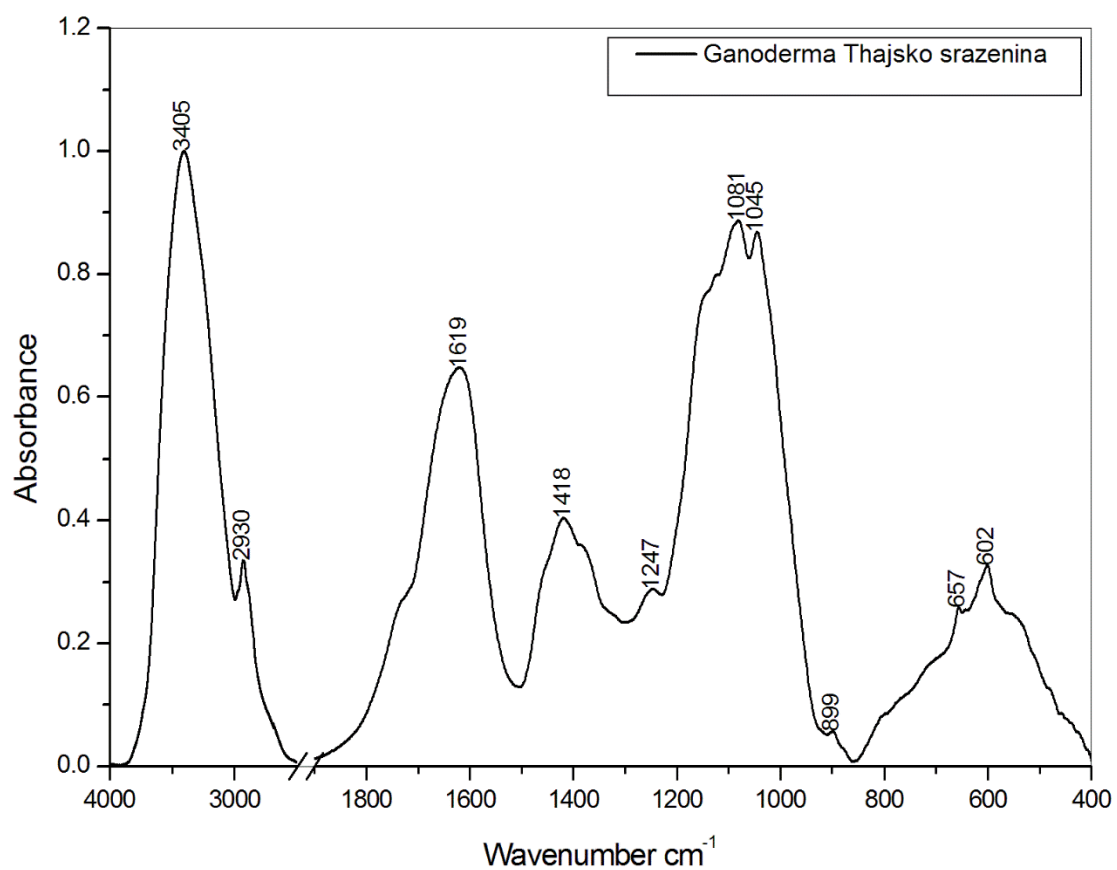
Obr. 11: Absorpční spektrum pevného zbytku *Inonotus obliquus* ruského původu (IO-RU-F2).



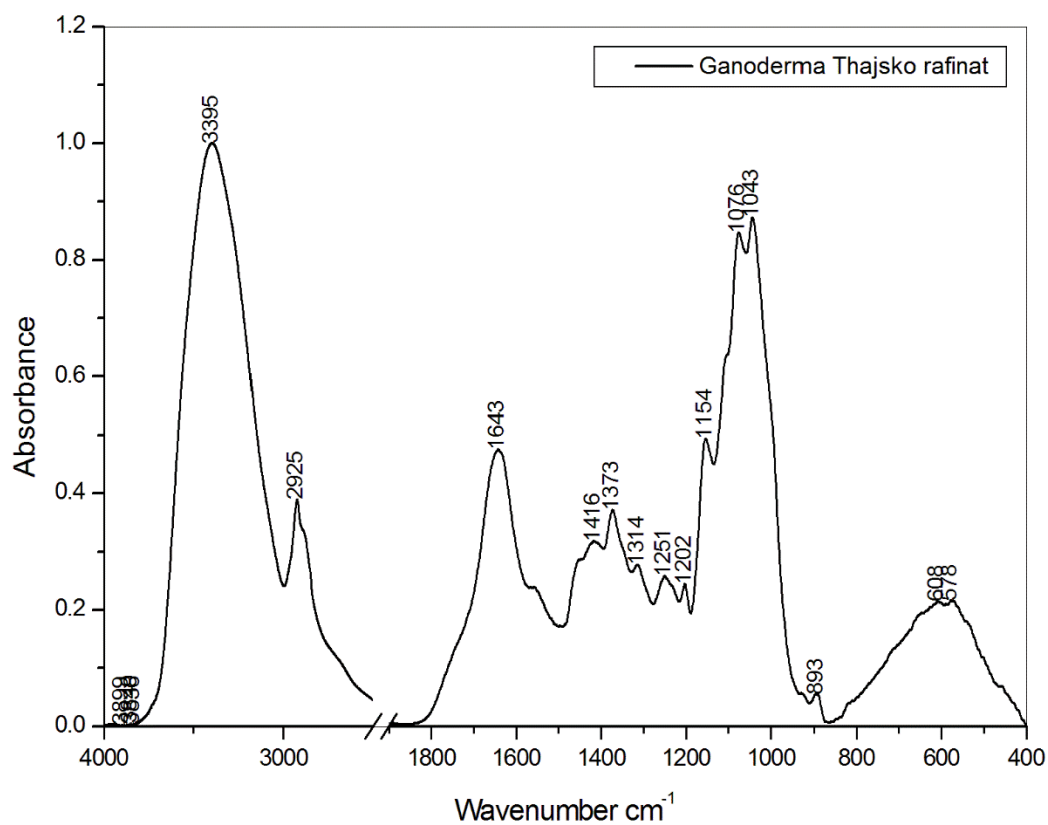
Obr. 12: Absorpční spektrum polysacharidové frakce *Ganoderma lucidum* českého původu.



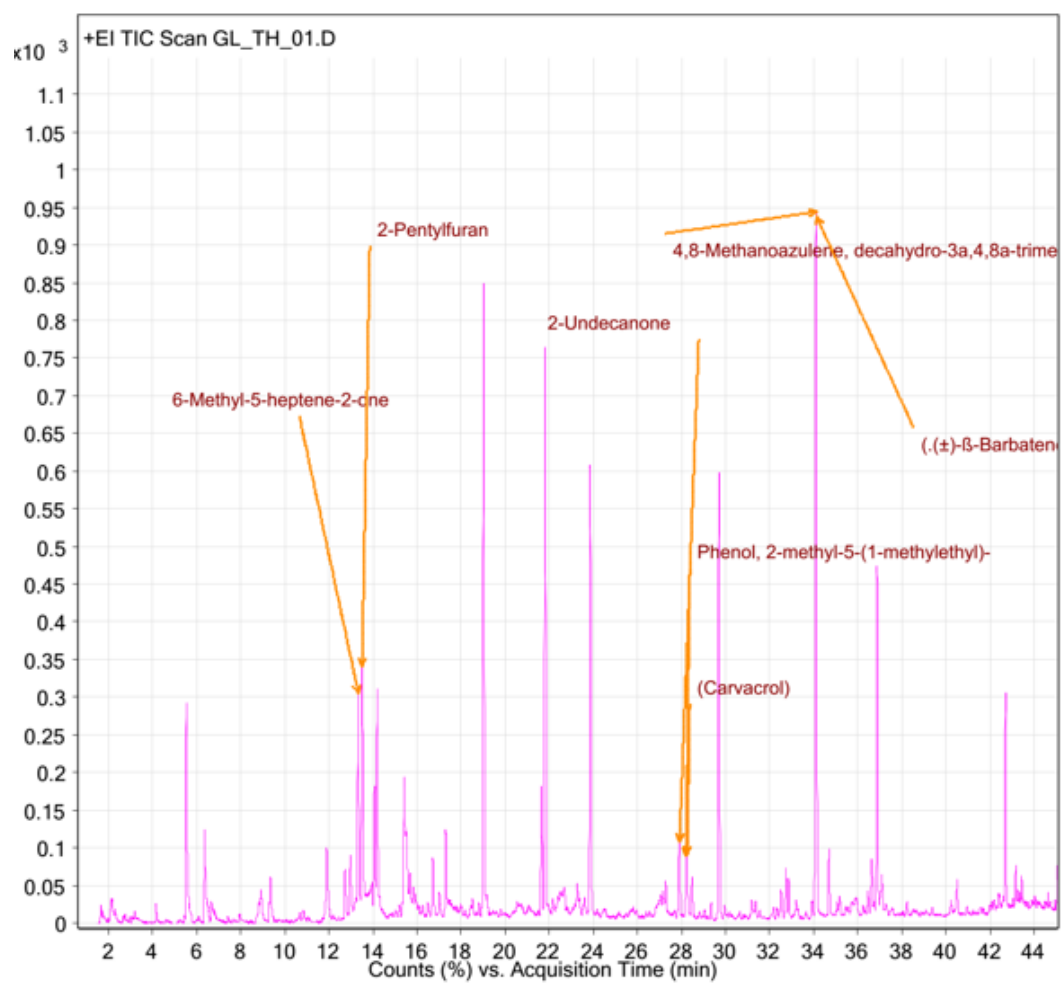
Obr. 13: Absorpční spektrum pevného zbytku *Ganoderma lucidum* českého původu.



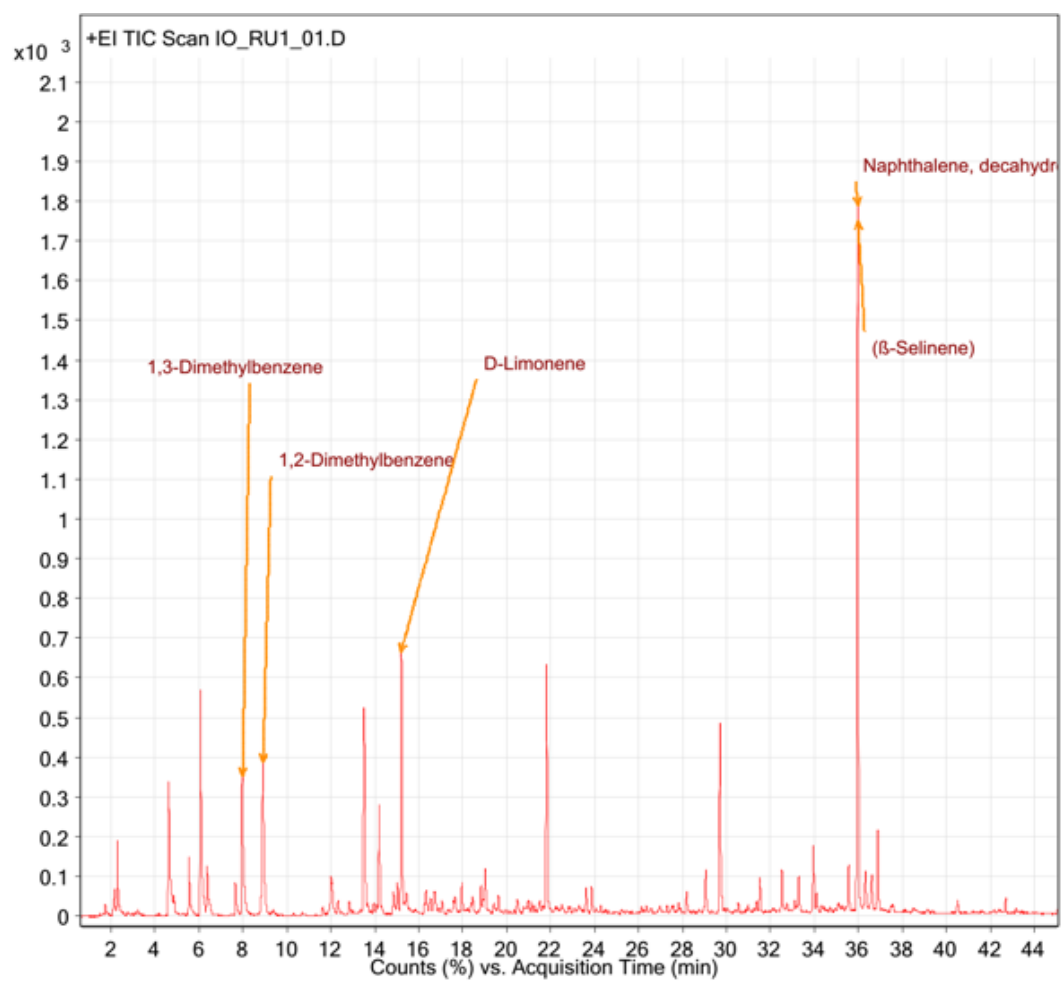
Obr. 14: Absorpční spektrum polysacharidové frakce *Ganoderma lucidum* thajského původu.



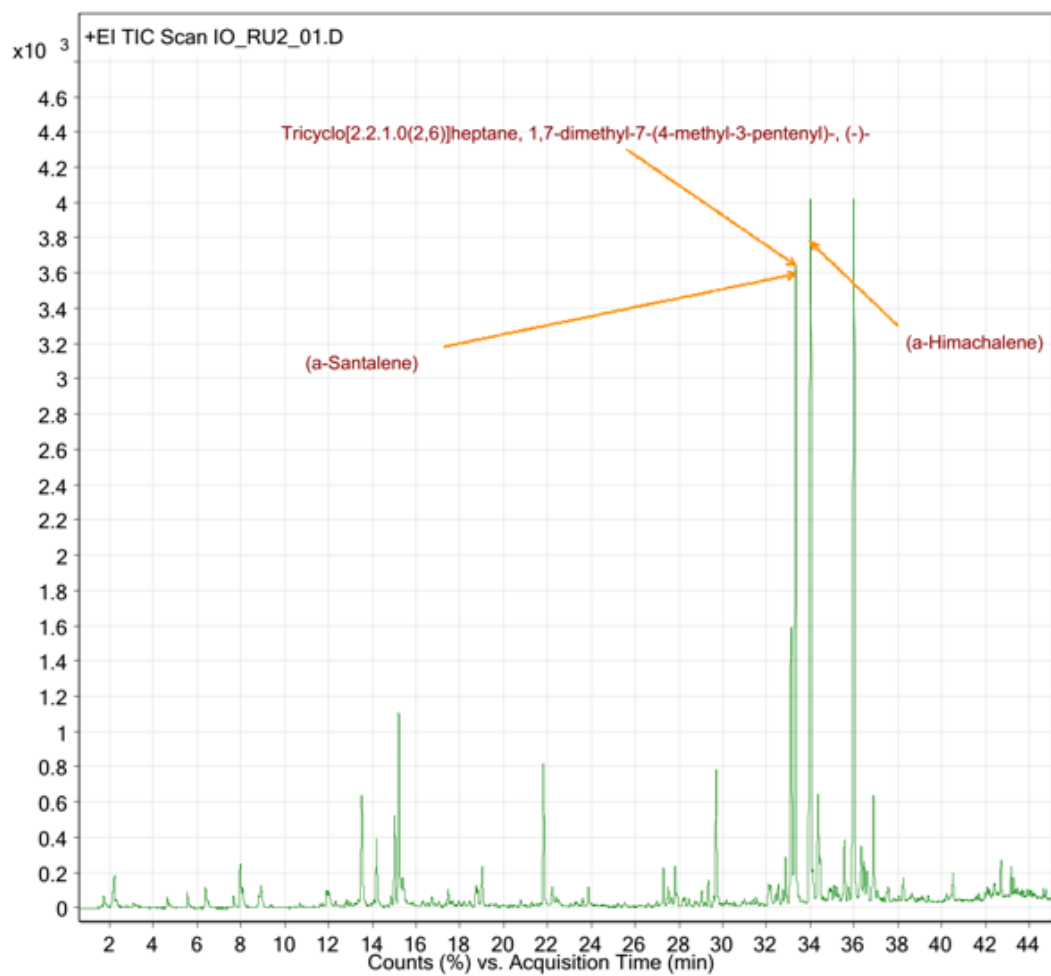
Obr. 15: Absorpční spektrum pevného zbytku *Ganoderma lucidum* tajského původu.



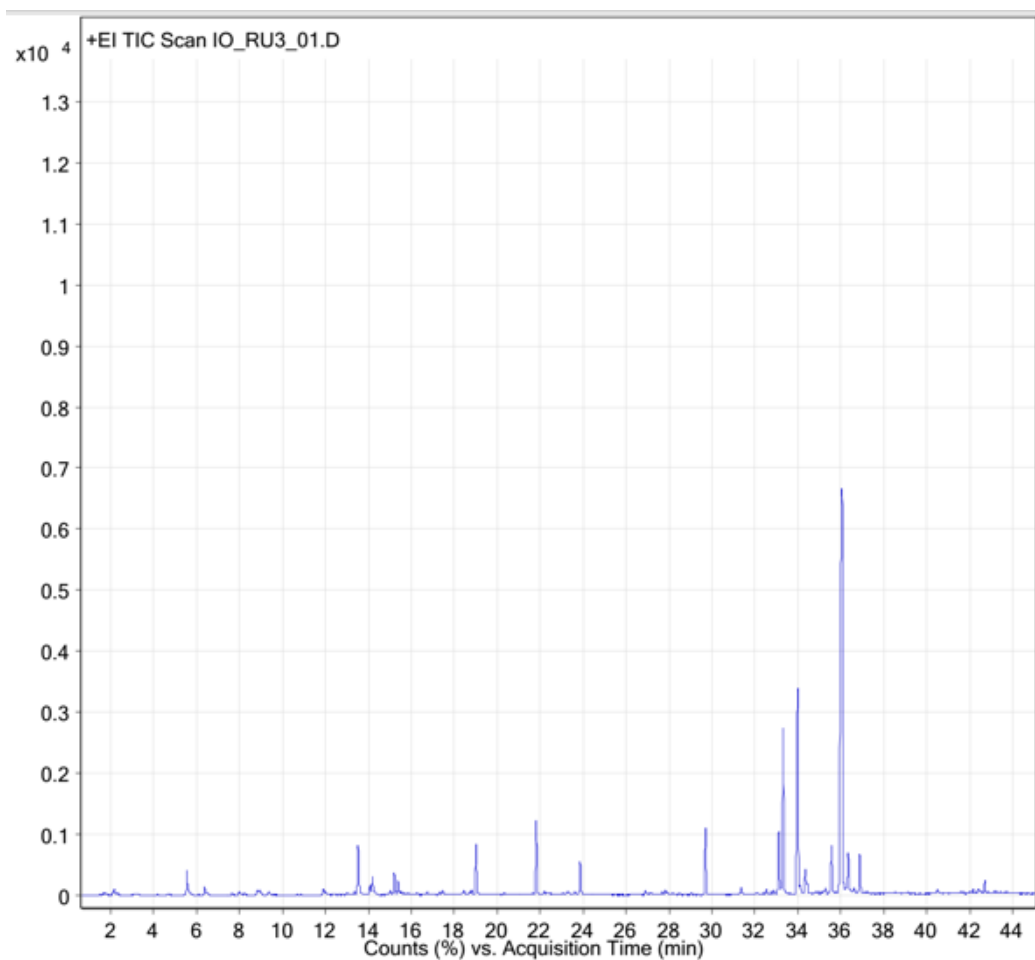
Obr. 16: Chromatogram surového vzorku *Ganoderma lucidum* tajského původu (GL-TH)



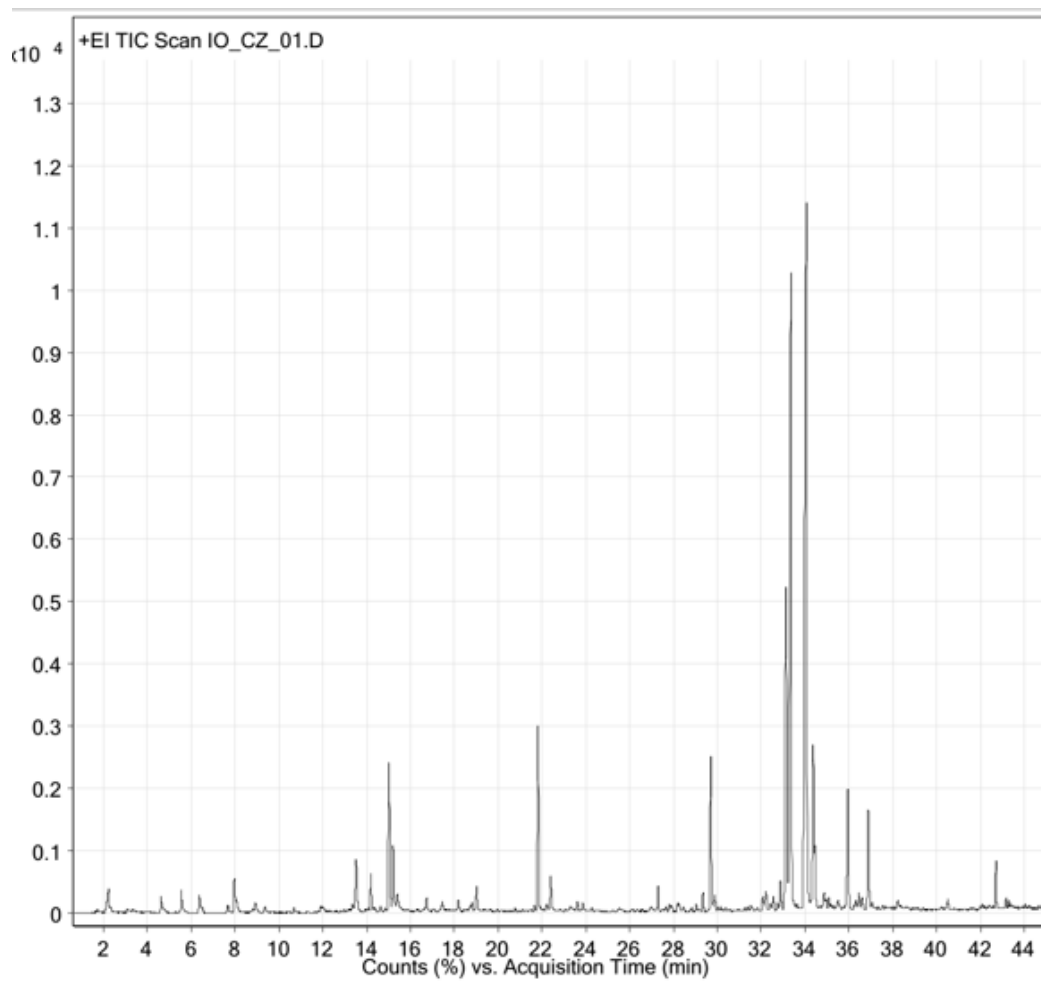
Obr. 17: Chromatogram surového vzorku *Inonotus obliquus* ruského původu (IO-RU1)



Obr. 18: Chromatogram surového vzorku *Inonotus obliquus* ruského původu (IO-RU2)



Obr. 19: Chromatogram surového vzorku *Inonotus obliquus* ruského původu (IO-RU3)



Obr. 20: Chromatogram surového vzorku *Inonotus obliquus* českého původu (IO-CZ)