

*Marcin Szymański¹, Marta Kolendowicz¹, Arkadiusz Szymański²

Badania wyciągów z owocników grzyba *Laetiporus sulphureus* (Bull.)

Research on extracts from the fruiting bodies of the fungus *Laetiporus sulphureus* (Bull.)

¹Centrum Zaawansowanych Technologii, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu
Dyrektor Centrum: prof. dr hab. n. chem. Bronisław Marciniak

²Wydział Chemii, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu
Dziekan Wydziału: prof. dr hab. n. chem. Maciej Kubicki

SUMMARY

Introduction. *Laetiporus sulphureus* is a species of fungus that decomposes both living trees and wooden structures. The fruiting bodies grow from May to September. They most often attack deciduous trees, most often oaks, poplars, robins and willows, apple trees, plum trees, less often maples and alders, very rarely they attack conifers. They are annuals; initially bulbous, then semicircular, fan-shaped and corrugated, color from sulfur-yellow to golden-orange or orange. Only the young and juicy fruiting bodies are suitable for consumption; they have a delicate "mushroom" taste and goes well with vegetables. It can be made in breadcrumbs, marinated in honey and spice, added to soups or stewed. The mushroom can be made in breadcrumbs, marinated in honey and spice, added to soups and stewed.

Aim. Determination of the content of polyphenolic compounds and antioxidant activity in water, methanol and methanol-water extracts and examination of the composition of the chloroform extract from *Laetiporus sulphureus* fruiting bodies collected from three natural areas.

Material and methods. The tests were carried out on three samples of *Laetiporus sulphureus* (A, B and C) dried in the air. Water, methanol and methanol-water extracts were prepared for the tests. The colorimetric method with the use of the Folin-Ciocalteu (FC) reagent was used to determine the total sum of polyphenols in the tested extracts. The antioxidant activity was determined by methods with the DPPH radical and the reduction of iron (III) ions (FRAP). The qualitative analysis of the chloroform extract using the GC-MS method was performed.

Results. Total polyphenols (expressed as caffeic acid) in analyzed samples ranged from 0.07% to 0.88%, with the highest content of polyphenol was present in the aqueous extracts, followed by a methanol-water and methanol. Antioxidant properties of the extracts were as follows: parameter IC_{50} (for the DPPH radical method) ranged from 238 to 69.1 (mg/ml), and the parameter $I_{0.5}$ (for the FRAP method) ranged from 106.6 to 24.6 (mg/ml).

A total of 42 from 49 chemical compounds were identified through GC-MS analysis of chloroform extracts from the three sets of fruiting bodies *Laetiporus sulphureus*: A, B and C. Among the identified compounds were the substances with a proven health benefit as thymol, niacin, unsaturated fatty acids: oleic and linoleic acids, and squalene.

Conclusions. All tested extracts prepared from the fruiting bodies of *Laetiporus sulphureus* show antioxidant activity, however, they differ in strength depending on the type of extract and the place of harvesting the fruiting bodies. The analysis of the chloroform extract using the GC-MS method allowed for the identification of compounds such as thymol, niacin, oleic acid, linoleic acid and squalene with proven pro-health properties.

Keywords: *Laetiporus sulphureus*, polyphenols, antioxidant activity, GC-MS

STRESZCZENIE

Wstęp. *Laetiporus sulphureus* jest gatunkiem grzyba, który powoduje rozkład zarówno żyjących drzew, jak i drewnianych konstrukcji. Owocniki wyrastają od maja do września. Atakują najczęściej drzewa liściaste, przeważnie dęby, topole, robinie i wierzby, jabłonie, śliwy rzadziej klony i olsze, bardzo rzadko porażają drzewa iglaste. Są jednoroczne; w początkowym okresie bulwiaste, następnie półkoliste, wachlarzowate oraz pofałdowane, barwy od siarkowożółtej do złoto-pomarańczowej lub pomarańczowej. Do spożycia nadają się jedynie młode i soczyste owocniki; mają one delikatny „grzybowy” smak, bardzo dobrze komponują się z warzywami. Grzyb można przyrządzać w panierce, marynować w zalewie miodowo-korzennej, dodawać do zup i dusić.

Cel pracy. Oznaczenie zawartości związków polifenolowych i aktywności antyoksydacyjnej w wyciągach wodnych, metanolowych i metanolowo-wodnych oraz zbadanie składu wyciągu chloroformowego z owocników *Laetiporus sulphureus*, zebranych z trzech naturalnych stanowisk.

Materiał i metody. Badania przeprowadzono dla trzech próbek *Laetiporus sulphureus* (A, B i C) wysuszonych na powietrzu. Do badań sporządzono wyciągi wodne, metanolowe oraz metanolowo-wodne. Do oznaczenia całkowitej sumy polifenoli w badanych

wyciągach wykorzystano metodę kolorymetryczną z użyciem odczynnika Folin-Ciocalteu (FC). Wyznaczono aktywność antyoksydacyjną metodami z rodnikiem DPPH oraz redukcji jonów żelaza (III) (FRAP). Przeprowadzono analizę jakościową wyciągu chloroformowego metodą GC-MS.

Wyniki. Suma polifenoli, w przeliczeniu na kwas kawowy w badanych próbkach, wyniosła od 0,07 do 0,88%, największą zawartością charakteryzowały się wyciągi wodne, następnie metanolowo-wodne, najniższą metanolowe. Właściwości antyoksydacyjne badanych wyciągów kształtowały się następująco: parametr IC_{50} (dla metody z rodnikiem DPPH) wyniósł od 238 do 69,1 (mg/ml), a parametr $I_{0,5}$ (dla metody FRAP) od 106,6 do 24,6 (mg/ml). Badanie GC-MS wyciągów chloroformowych przygotowanych ze zbiorów owocników A, B oraz C umożliwiło identyfikację 42 z 49 związków, w tym o udowodnionych właściwościach prozdrowotnych (tymol, niacyna, nienasycone kwasy tłuszczowe: kwas oleinowy i linolowy oraz skwalen).

Wnioski. Badane wyciągi z owocników *Laetiporus sulphureus* wykazują działanie antyoksydacyjne, różniące się siłą w zależności od rodzaju wyciągu oraz miejsca zbioru owocników. Analiza wyciągu chloroformowego metodą GC-MS pozwoliła na identyfikację takich związków jak tymol, niacyna, kwas oleinowy, kwas linolowy oraz skwalen o udowodnionych właściwościach prozdrowotnych.

Słowa kluczowe: *Laetiporus sulphureus*, polifenole, aktywność antyoksydacyjna, GC-MS

Wstęp

Grzyby nadrzewne i nadrewnowe, potocznie określane jako huby, to saprofityczne lub pasożytnicze gatunki (1). Niektóre z grzybów bardzo szybko rozwijają się w zasiedlonym drzewie, doprowadzając do jego śmierci, i dalej funkcjonują już jako saprofity, tworząc owocniki i rozkładając martwe drewno. Są to tzw. pasożyty fakultatywne (przypadkowe). Jednym z ważniejszych grzybów należących do tej grupy jest żółciak siarkowy – *Laetiporus sulphureus* (2).

Owocniki żółciaka siarkowego są jednoroczne; w początkowym okresie są bulwiaste, następnie półkolisty, wachlarzowate oraz pofałdowane, grubość nie przekracza 5 cm, a szerokość wynosi od 5 do 30 cm. Owocniki mają barwę od siarkowożółtej do złoto-pomarańczowej lub pomarańczowej, a ich powierzchnia jest matowo-zamszowa i zawsze kremowo-żółtawooszlona. Brzeg grzyba jest zazwyczaj falisty, podwinięty, głęboko popękany, zaokrąglony lub ostry. Owocniki przyrastają bokiem do drzewa, narastając na siebie dachówkowo, lub też tworzą rozety. Hymenofor żółciaka siarkowego jest zbudowany z rurek zwartych z mięszem o bardzo małych rozmiarach, ich długość nie przekracza 4 mm. Pory, tak jak i rurki, są barwy siarkowożółtej i mają kształt okrągławy, od 3 do 5 na 1 mm². Mięsz grzyba jest koloru żółtego, kremowego lub białawego. Młode owocniki są soczyste, miękkie i mięsiste, starsze stają się kruche, łamliwe i lekkie. Zapach mięszu jest nieprzyjemny, a smak kwaskowaty, który potem staje się gorzkawy. Zarodniki żółciaka są jajowate lub eliptyczno-okrągławe o gładkiej powierzchni. W wysypie mają barwę słomkowożółtą, jednak szybko bledną do białej barwy. Ich wymiary wynoszą 5-7,5 x 3,5-4,5 μm (3, 4).

Zarodniki osiadają i kiełkują zarówno w mechanicznie uszkodzonych miejscach, jak i w spękaniach powstałych w sposób naturalny. Owocniki żółciaka siarkowego wyrastają od maja do września i atakują

zazwyczaj drzewa liściaste, najczęściej dęby, topole, robinie i wierzby, rzadziej klony i olsze. Można go spotkać również w sadach, gdzie wyrasta na jabłoniach, śliwach, orzechach i czereśniach, bardzo rzadko poraża drzewa iglaste (5). *Laetiporus sulphureus* jest jednym z kilku gatunków grzybów, które powodują rozkład zarówno żyjących drzew, jak i drewnianych konstrukcji, spotykano go na łodziach, statkach, a także słupach ogrodzeniowych. W tych przypadkach można przypuszczać, że do infekcji doszło jeszcze za życia drzewa, a grzyb przetrwał w formie chlamydosporów, czyli grubościennych zarodników powstających ze strzępek grzybni. Grzyb ten powoduje intensywne, brązowe gnicie drewna w korzeniach, podstawie i pniu zainfekowanego drzewa, a na skutek działania tyrozynazy neutralizacji ulegają zawarte w nim związki fenolowe. Na wczesnym etapie rozkładu drewno ulega przebarwieniu z żółtego do czerwonego, następnie osiąga barwę czerwono-brązową i rozpada się na kruche, sześcienne kawałki. Pęknięcia pojawiające się w trakcie gnicia są wypełnione przez skórzaste, żółte bądź białe skórki grzybni. Pęknięcia pojawiają się również wzdłuż promieni drzewa i są związane z tworzącymi się w nich chlamydosporami. W naturalnie zainfekowanym drewnie robinii chlamydospory tworzą się w jego zdrowej części, w znacznej odległości od fragmentów ulegających rozpadowi. Strzępki rozrastają się promieniowo od środka pnia poprzez promienie drzewa, na skutek czego pojedyncze chlamydospory występują w każdej poziomej komórce promienia. Pod wpływem korzystnych warunków mogą one zacząć kiełkować i w krótkim okresie tworzyć skórki grzybni, mechanicznie indukujące pęknięcia. W późnym etapie rozpadu drewno składa się w większości z lekko zmodyfikowanej ligniny i może być roztarte w palcach na proszek (6).

W celach kulinarnych mogą być wykorzystywane tylko młode owocniki, gdyż starsze mają twardą

i korkową strukturę. Grzyb ten jest potocznie nazywany w Stanach Zjednoczonych „kurczakiem leśnym” (*chicken of the woods*) lub „kurczakową hubą” (*chicken polypore*) ze względu na podobny smak oraz konsystencję do mięsa drobiowego. Właściwości te czynią go atrakcyjnym produktem zastępczym dla mięsa w diecie wegetariańskiej, a w niektórych rejonach Niemiec i Ameryki Północnej jest on traktowany jako przysmak (7).

W celach spożywczych młode i soczyste owocniki należy opłukać w celu pozbycia się resztek kory, a także insektów zamieszkujących grzybnię, i wstępnie obgotować. Żółciak siarkowy ma delikatny „grzybowy” smak oraz bardzo dobrze komponuje się z czerwonymi oraz zielonymi warzywami. Można go przyrządzać w panierce, marynować w zalewie miodowo-korzennej, dodawać do zup czy dusić. W internecie można znaleźć przepisy na rozmaite potrawy z żółciaka, jak flaczki, paprykarz, pasztet, a także sznycle.

Należy jednak pamiętać, że grzyb ten może wywoływać działania niepożądane po spożyciu. Evans przedstawiła w swoim artykule około 20 zgłoszeń zatrucia, które wystąpiły u osób spożywających żółciaka. Najczęściej były to zawroty głowy, nudności oraz wymioty występujące bardzo szybko po spożyciu. Opisano również przypadki, kiedy niektóre osoby przez lata jadły ten gatunek grzyba, nie doświadczając żadnych efektów ubocznych, ale zatrucia wystąpiły u przyjaciół lub krewnych, którzy próbowali go po raz pierwszy. Często objawy te wynikały ze zjedzenia surowego lub niedogotowanego żółciaka, niektóre przypadki zatrucia mogły mieć także związek z gatunkiem drzewa, które było gospodarzem grzyba, np. grzyby rosnące na eukaliptusie mogą być toksyczne (9).

Badania Petrovića wykazały, że w żółciaku siarkowym dominują węglowodany oraz białka, mała jest zawartość tłuszczów. Dzięki małej wartości kalorycznej (375 kcal w 100 g) grzyb ten z powodzeniem może być stosowany w dietach niskokalorycznych. Dominującymi cukrami w *L. sulphureus* są trehaloza oraz mannitol, ponadto obecne są tokoferole: α -, γ - i δ -tokoferol oraz kwas cytrynowy i *p*-hydroksybenzoesowy (8). Polisacharydy to głównie β -glukany, które posiadają właściwości immunoregulacyjne, przeciwnowotworowe, przeciwzapalne, przeciwwirusowe, hipoglikemiczne i antyoksydacyjne (7, 10); lektyny LSL – L (*sulphureus lectin*) działające hemaglutynująco i hemolitycznie (11, 12), kwasy tłuszczowe (palmitynowy, oleinowy, linolowy), korzystne w chorobach sercowo-naczyniowych (13), triterpeny, głównie typu lanostanu (kwasy: eburikowy,

sulfurenowy, acetyloeburikowy, acetylotrametenolowy, 15α -hydroksytriametenolowy, 3-oksosulfurenowy) (7, 14, 15) wykazujące działanie przeciwnowotworowe i cytotoksyczne (7); ponadto związki fenolowe (kwas *p*-kumarowy, kwercetyna, kemferol, kwas kawowy, (+)-katechina, kwas galusowy oraz kwas 5-kawoilochinowy) (16).

Wodne wyciągi z żółciaka siarkowego wykazały silne działanie przeciwdrobnoustrojowe wobec licznych patogenów powodujących psucie się żywności (17). Etanolowy wyciąg działał słabo przeciwbakteryjnie wobec bakterii Gram-ujemnych, ale silnie hamował wzrost bakterii Gram-dodatnich i drożdżaka *Candida albicans*, jednocześnie działał antyoksydacyjnie porównywalnie z BHA oraz α -tokoferolem (18).

Cel pracy

Celem pracy było oznaczenie sumy związków polifenolowych i aktywności antyoksydacyjnej w wyciągach wodnych, metanolowych i metanolowo-wodnych oraz zbadanie składu wyciągu chloroformowego z owocników żółciaka siarkowego, zebranych z trzech naturalnych stanowisk.

Materiał i metody badań

Materiał do badań

W badaniach wykorzystano trzy owocniki *Laetiporus sulphureus* oznaczone literami A, B i C zebrane w lesie Witnickim oraz w Puszczy Zielonce, które następnie zostały wysuszone na powietrzu. Gatunek został oznaczony na podstawie cech morfologicznych (przekrój owocnika, wielkość porów, zapach) i anatomicznych (zarodniki), charakterystycznych do żółciaka siarkowego. Opis miejsc zbioru owocników przedstawiono w tabeli 1.

Z poszczególnych próbek sporządzono trzy rodzaje wyciągów: wodny (AW, BW, CW), metanolowy (AM, BM, CM) oraz metanolowo-wodny (AMW, BMW, CMW).

Na wadze analitycznej odważono do trzech kolb okrągłodennych po 2,500 g rozdrobnionego wysuszonego owocnika *Laetiporus sulphureus*, zalano równolegle 30 ml metanolu, wody lub 50% metanolu w wodzie, a następnie utrzymywano w stanie wrzenia przez 15 min na łaźni wodnej pod chłodnicą zwrotną. Otrzymane wyciągi poddano filtracji przez wate do probówek miarowych o pojemności 50 ml. Następnie wate z surowcem zawrócono do kolby, zalano 10 ml odpowiedniego rozpuszczalnika i ponownie wstawiono do wrzącej łaźni wodnej na 5 min i poddano filtracji przez wate.

Tab. 1. Opis miejsc zbioru owocników *Laetiporus sulphureus*

Symbol próbki	Stanowisko		
	Opis sąsiedztwa	Żywiciel/stan drzewa	Lokalizacja
A	Las liściasty, przy jeziorze Długim, Witnica (woj. lubuskie)	Topola/martwe	Las – Witnica
B	Las liściasty, przy leśnej drodze do Dąbrówki Kościelnej (woj. wielkopolskie)	Topola/częściowo żywe	Puszcza Zielonka
C	Las liściasty, przy jeziorze Wielkim, Witnica (woj. lubuskie)	Topola/martwe	Las – Witnica

Metody badawcze

Zawartość wilgoci

Oznaczono procentową zawartość wilgoci w rozdrobnionych owocnikach *Laetiporus sulphureus*, korzystając z wagosuszarki (Radwag WPE 30S).

Oznaczenie sumy polifenoli

Sumę polifenoli w badanych wyciągach oznaczono metodą kolorymetryczną z użyciem odczynnika Folin-Ciocalteu (FC). Pod wpływem związków fenolowych w środowisku alkalicznym (20% roztworu węglanu sodu) następuje odwracalna reakcja redukcji molibdenu w VI stopniu utlenienia, obecnego w odczynniku Folina-Ciocalteu, do molibdenu na V stopień utlenienia. W efekcie uzyskuje się anion ($\text{PMoW}_{11}\text{O}_4$)⁺, który powoduje zmianę barwy roztworu na fioletowo-niebieski (19). Wzrost natężenia barwy roztworu jest proporcjonalny do zawartości związków fenolowych reagujących z odczynnikiem FC. Pomiaru dokonano przy długości fali $\lambda = 760 \text{ nm}$ (20) (Lambda 35 Elmer Perkin).

W celu obliczenia sumy polifenoli wyznaczono krzywą wzorcową dla kwasu kawowego (zakres 0,01-0,125 mg/ml), a następnie na podstawie równania $A = a * C + b$ obliczono zawartość sumy polifenoli w przeliczeniu na kwas kawowy. W obliczeniach została uwzględniona masa naważki, a także wilgotność surowca.

Oznaczenie aktywności antyoksydacyjnej, współczynnika IC_{50} dla metody z rodnikiem DPPH

Oznaczono aktywność antyoksydacyjną za pomocą rodnika DPPH. Pomiar wykonano za pomocą spektrofotometru (Lambda 35 Elmer Perkin), przy długości fali $\lambda = 515 \text{ nm}$. Wyznaczono parametr IC_{50} – czyli stężenie przeciwutleniacza, które powoduje obniżenie o 50% wyjściowego stężenia rodnika DPPH (19).

Oznaczenie aktywności antyoksydacyjnej, współczynnika $\text{I}_{0,5}$ dla metody FRAP

Oznaczono aktywność antyoksydacyjną metodą redukcji jonów żelaza (III) (FRAP). Zasada oznaczenia aktywności oksydacyjnej metodą FRAP (ang. *ferric ion reducing antioxidant parameter*) polega na ocenie zdolności badanego roztworu do redukcji jonów Fe^{3+} do jonów Fe^{2+} , które następnie są kompleksowane przez TPTZ (2,4,6-tris(2-pirydylo)-1,3,5-triazynę) z jednoczesnym pojawieniem się niebieskiego zabarwienia o maksimum absorbancji przy długości fali $\lambda = 593 \text{ nm}$ (21).

Z badanych wyciągów przygotowano rozcieńczenia o stężeniach: 10, 25, 40 i 50%. Następnie do próbek typu Eppendorf odpipetowano 0,1 ml analizowanego roztworu oraz 1,5 ml mieszaniny FRAP i całość inkubowano przez 30 min w temperaturze 37°C na ciepłarko-wytrząsarce, a następnie dokonano pomiaru absorbancji przy długości fali $\lambda = 593 \text{ nm}$. Na podstawie otrzymanego równania $A = aC + b$ obliczono stężenie dla absorbancji $A = 0,500$.

Analiza GC-MS

W celu przeprowadzenia analizy GC-MS próbki A, B, C sproszkowano, przesiano przez sito o średnicy oczek 0,5 mm, a następnie po 1 g surowca ekstrahowano chloroformem na łaźni wodnej w temperaturze wrzenia pod chłodnicą zwrotną. Otrzymany ekstrakt przefiltrowano przez filtr 0,45 μm , zateżono i przeniesiono do trzech fiolek. Zastosowano następujące warunki chromatograficzne:

- chromatograf gazowy Varian 4000 GC z detekcją mas, energia elektronów 70 eV, źródło jonów w temp. 220°C,
- kolumna kapilarna typu VF-5MS o długości 30 m, średnicy wewnętrznej 0,25 mm i grubości fazy stacjonarnej 0,25 μm ,
- jako gaz nośny został użyty hel,
- szybkość przepływu wynosiła 1 ml/min,

- temperatura pieca 60°C (przez 5 min), a następnie stopniowo zwiększano do 280°C z szybkością 15°C/min.

Identyfikację związków przeprowadzono przez porównanie ich czasu retencji i widm masowych z normami NIST. Przedstawiono związki, które występowały w ilościach powyżej 0,1%.

Wyniki i dyskusja

Suma polifenoli

W celu dokładniejszego określenia sumy polifenoli oznaczono zawartość wilgoci w analizowanych próbkach żółciaka, dla próbki A wyznaczono 8,61%, próbki B – 6,74%, a próbki C – 11,4%. Wartości te uwzględniono w dalszych obliczeniach.

Oznaczono sumę polifenoli w przygotowanych wyciągach, wykorzystując w badaniu odczynnik Folin-Ciocalteu oraz mierząc absorbancję otrzymanych roztworów przy długości fali $\lambda = 760$ nm. W tabeli 2 przedstawiono oznaczoną sumę polifenoli w przeliczeniu na kwas kawowy w badanych próbkach stanowiącą średnią z trzech niezależnych oznaczeń.

Wyciągi wodne zawierały najwięcej polifenoli, mniej metanolowo-wodne, najmniej metanolowe. Wyciągi z próbek A oraz B zawierały zbliżoną sumę polifenoli, w próbce C była ona znacznie niższa. Największą zawartość polifenoli (0,88%) oznaczono w wyciągu wodnym z owocników ze zbioru A, niższą w wyciągu wodnym z owocników ze zbioru B (0,73%), a najniższą w wyciągach metanolowych ze wszystkich trzech zbiorów, z czego najmniej (0,07%) w owocnikach ze zbioru C.

Aktywność antyoksydacyjna

Badanie właściwości antyoksydacyjnych wyciągów z próbek A, B i C oraz wyznaczenie ich parametru IC_{50} z użyciem odczynnika DPPH wykonano za pomocą spektrofotometru i pomiarów absorbancji przy długości fali $\lambda = 515$ nm. Jako substancję porównawczą (wzorcową) użyto kwasu galusowego. Wykorzystując równania krzywych, wyznaczonych dla każdego z badanych wyciągów, obliczono parametr IC_{50} , opisujący jego zdolność do zmiatania wolnych rodników (im jest niższy, tym działanie antyoksydacyjne silniejsze). Otrzymane wyniki zostały przedstawione w tabeli 3.

Najniższą wartość IC_{50} (najsilniejsze działanie antyoksydacyjne) wykazują wyciągi metanolowo-wodne, następnie wodne, a najwyższą metanolowe. Najsilniejsze działanie przeciwrodnikowe wykazał wyciąg metanolowo-wodny z próbki A ($IC_{50} = 69,1$ mg/ml) i wyciąg wodny również z próbki A ($IC_{50} = 85,4$ mg/ml). Najsłabsze działanie antyoksydacyjne wykazywał wyciąg metanolowy ze zbioru C ($IC_{50} = 238$ mg/ml). Żaden z powyższych wyciągów nie działał silniej niż wzorzec – kwas galusowy ($IC_{50} = 0,033$ mg/ml).

Współczynnik $I_{0,5}$ został wyznaczony z wykorzystaniem metody FRAP, która umożliwia oznaczenie całkowitej zdolności badanego wyciągu do redukcji jonów żelaza (III). Najsilniejszą zdolność do redukcji wykazały wyciągi wodne oraz metanolowo-wodne, a najmniej metanolowe. Najniższą wartość współczynnika $I_{0,5}$, a zatem najsilniejsze działanie antyoksydacyjne wykazuje wyciąg wodny otrzymany z próbki A (24,6 mg/ml), zbliżone zdolności antyoksydacyjne

Tab. 2. Suma polifenoli w badanych wyciągach

A (% w przeliczeniu na kwas kawowy)			B (% w przeliczeniu na kwas kawowy)			C (% w przeliczeniu na kwas kawowy)		
AW1	AW2	AW3	BW1	BW2	BW3	CW1	CW2	CW3
0,8098	0,9752	0,8574	0,8310	0,7304	0,6379	0,3284	0,5695	0,5638
Średnia ± SD			Średnia ± SD			Średnia ± SD		
0,88 ± 0,09			0,73 ± 0,10			0,49 ± 0,14		
AM1	AM2	AM3	BM1	BM2	BM3	CM1	CM2	CM3
0,1527	0,1661	0,1606	0,2369	0,2190	0,2052	0,0740	0,0623	0,0607
Średnia ± SD			Średnia ± SD			Średnia ± SD		
0,16 ± 0,01			0,22 ± 0,02			0,07 ± 0,01		
AMW1	AMW2	AMW3	BMW1	BMW2	BMW3	CMW1	CMW2	CMW3
0,6148	0,6222	0,6283	0,6208	0,6320	0,6480	0,4675	0,4382	0,4749
Średnia ± SD			Średnia ± SD			Średnia ± SD		
0,62 ± 0,01			0,63 ± 0,01			0,46 ± 0,02		

mają również wyciągi metanolowo-wodne przygotowane z próbek A oraz B, odpowiednio 25,3 i 26,5 mg/ml. Najslabsze działanie antyoksydacyjne wykazują wyciągi metanolowe, z czego najwyższą wartość $I_{0,5}$ posiada wyciąg przygotowany z próbki C (106,6 mg/ml). Wyniki zostały przedstawione w tabeli 3.

Wyznaczone parametry IC_{50} i $I_{0,5}$ w znacznym stopniu są ze sobą skorelowane, odchylenia niektórych parametrów mogą być powodowane błędami pomiarowymi lub aparaturowymi.

Tab. 3. Parametry IC_{50} (metoda DPPH) i $I_{0,5}$ (metoda FRAP)

Symbol próbki	DPPH IC_{50} [mg/ml]	FRAP $I_{0,5}$ [mg/ml]
AW	85,4	24,6
AM	107	44,8
AMW	69,1	25,3
BW	121	34,8
BM	90,5	58,7
BMW	90,2	26,5
CW	124	26,0
CM	238	107
CMW	116	32,2

Turkoglu i wsp. badali antyoksydacyjne właściwości etanolowego ekstraktu z żółciaka siarkowego, stwierdzając, że wraz ze wzrostem ilości użytego ekstraktu rosła jego zdolność do wygaszania wolnego rodnika DPPH. Eliminacja wolnego rodnika przy stężeniach 100, 200, 400 oraz 800 $\mu\text{g/ml}$ wynosiła odpowiednio 14, 26, 55 i 86% (18).

Analiza GC-MS

Wyniki analizy jakościowej chloroformowego wyciągu z owocników żółciaka metodą GC-MS przedstawiono w tabeli 4.

Pierwszy raz w wyciągach z owocników żółciaka siarkowego zebranego z polskich lasów dokonano analizy GC-MS. Łącznie z 49 oznaczonych związków udało się zidentyfikować 42. We wszystkich trzech próbkach wykryto następujące związki: etylobenzen, tymol, 2,2,4,15,17,17-heksametylo-7,12-bis(3,5,5-trimetyloheksylo)oktadekan, kwas pentadekanowy, 7,9-di-tert-butylo-1-oksypiro(4,5)deka-6,9-dien-2,8-dion, kwas oleinowy, kwas 9,12-oktadekadienowy, skwalen, 3 α ,5-cyklo-5 α -ergosta-6,8(14),22-trien, benzoesan 9(11)-dehydroergosterolu, anthiaergostan-5,7,9,16,22-penten oraz ergosterol. Związki, które zostały zidentyfikowane tylko w owocnikach ze zbioru A, to kwas fenylloctowy, estry etylowe, 4-etoksy kwasu benzoosowego, kwas linolowy oraz jego ester etylowy. W owocnikach ze zbioru B zidentyfikowano: kwas

Tab. 4. Wyniki analizy GC-MS

Lp.	Związek chemiczny	Wzór sumaryczny	Czas retencji (t_R)		
			A	B	C
1	3-etylo-Heksan	C_8H_{18}			4,797
2	Heksanal	$C_6H_{12}O$			4,862
3	Etylobenzen	C_8H_{10}	5,838	5,836	5,827
4	Nie zidentyfikowano			8,660	
5	4-acetylo-3-hydroksy-5-fenyl-1-[2-(piperazin-1-yl)etyl]-Pirolid-2-on	$C_{18}H_{22}N_4O_5$		9,365	
6	Nie zidentyfikowano		9,43		
7	Kwas benzoosowy	$C_7H_6O_2$		9,682	
8	Mentol	$C_{10}H_{20}O$		9,850	9,847
9	Nie zidentyfikowano			9,956	
10	Niacyna	$C_6H_5NO_2$		10,353	
11	Nie zidentyfikowano		10,606	10,477	
12	Kwas fenylloctowy	$C_8H_8O_2$	10,525		
13	Kwas pelargonowy	$C_9H_{16}O_2$			10,620

Tab. 4. cd.

14	Tymol	$C_{10}H_{14}O$	10,932	10,922	10,930
15	2,2,4,15,17,17-heksametylo-7,12-bis(3,5,5-trimetyloheksylo) Oktadekan	$C_{42}H_{86}$	11,18	11,179	11,180
16	Triacetyna	$C_9H_{14}O_6$			11,274
17	3-etylo-2-metylo-Heptan	$C_{10}H_{22}$			11,657
18	Niacynamid	$C_6H_6N_2O$	12,072	12,050	
19	Etylenopregna-5,9(11)-dien-20-ol-3-on	$C_{23}H_{34}O_3$	12,768		12,758
20	2,5-bis(1,1-dimetyloetylo)-Fenol	$C_{14}H_{22}O$			12,807
21	Ester etylofenylowy kwasu octowego	$C_{10}H_{12}O_2$	12,932	12,920	
22	Ester etylowy kwasu 4-etoksybenzoesowego	$C_{12}H_{14}O_3$	13,001		
23	Kwas dodekanowy	$C_{12}H_{24}O_2$			13,182
24	Ester etylofenylowy kwasu fumarowego	$C_{12}H_{12}O_4$			13,323
25	Kwas 3-pirolidon-2-ylo-propanowy	$C_7H_{13}NO_2$		14,561	
26	Kwas tetradekanowy	$C_{14}H_{28}O_2$		14,687	
27	Kwas pentadekanowy	$C_{15}H_{30}O_2$	15,401	15,394	15,387
28	7,9-di-tert-butylo-1-oksaspiro(4,5)Deka-6,9-dien-2,8-dion	$C_{17}H_{24}O_3$	15,823	15,815	15,819
29	Kwas 9-heksadekenowy	$C_{16}H_{30}O_2$	15,935		15,953
30	Kwas 11-heksadekenowy	$C_{16}H_{30}O_2$		15,949	16,007
31	Kwas <i>n</i> -heksadekanowy	$C_{16}H_{32}O_2$	16,087		16,094
32	Kwas oleinowy	$C_{18}H_{34}O_2$	16,710	16,588	16,589
33	Ester etylowy kwasu linolowego	$C_{20}H_{36}O_2$	16,933		
34	Kwas 9,12-oktadekadienowy	$C_{18}H_{32}O_2$	12,226	17,237	17,229
35	3,13-okta-Dekadien-1-ol	$C_{18}H_{34}O$			17,261
36	dehydro-Abietan metylu	$C_{21}H_{30}O_2$			18,528
37	Nie zidentyfikowano				19,327
38	Nie zidentyfikowano		19,459	19,459	19,446
39	Skwalen	$C_{30}H_{50}$	21,464	21,472	21,462
40	3 α ,5-cyklo-5 α -Ergosta-6,8(14),22-trien	$C_{28}H_{42}$	22,229	22,242	22,232
41	Benzoesan 9(11)-dehydroergosterolu	$C_{35}H_{46}O_2$	23,427	23,442	23,430
42	3,5-dinitrobenzoesan dehydro-Ergosterolu	$C_{35}H_{44}N_2O_6$		23,648	
43	(22E)-ergosta-5,7,9(11),22-tetraen-3-yl 3,5-dinitro-Benzoesan	$C_{35}H_{44}N_2O_6$		23,680	
44	Antiaergostan-5,7,9,16,22-penten	$C_{28}H_{40}$	23,782	23,799	23,788
45	Nie zidentyfikowano			23,995	
46	Ergosterol	$C_{28}H_{44}O$	27,363	27,440	27,390
47	gamma-Ergosterol	$C_{28}H_{48}O$	29,310		29,344
48	Ergost-7-en-3 β -ol	$C_{28}H_{48}O$		29,418	
49	5-Ergost-7-en-3- β -ol	$C_{28}H_{48}O$		29,590	

benzoesowy, niacynę, kwas 3-pirolidon-2-ylo-propanowy, kwas tetradekanowy, 3,5-dinitrobenzoesan dehydroergosterolu, ergost-7-en-3 β -ol, 5 α -ergost-7-en-3 β -ol. Związki, które wyodrębniono tylko z owocników ze zbioru C, to: 3-etyloheksanu, heksanal, kwas pelargonowy, trioctan glicerolu, 3-etylo-2-metyloheptan, 2,5-bis-(1,1-dimetyloetylo)-fenol, kwas dodekanowy, kwas fumarowy, 3,13-oktadekadien-1-ol oraz dehydrooctan metylu. Ze zidentyfikowanych związków na szczególną uwagę zasługują związki o znanej aktywności biologicznej (tymol, niacyna, kwas oleinowy i linolowy, skwalen). Tymol działa przeciwko bakteriom patogennym (w tym szczepom antybiotykoopornym), grzybom oraz wirusom. Po podaniu doustnym wydziela się w oskrzelach i działa drażniąco na błonę śluzową oskrzeli, dzięki czemu upłynnia zalegającą wydzielinę i ułatwia odkrztuszanie (22).

Niacyna (witamina B₃) wykorzystywana jest w terapii hipercholesterolemii, gdyż powoduje spadek frakcji LDL cholesterolu we krwi, jednocześnie powodując wzrost frakcji HDL.

Ważne funkcje biologiczne pełnią również zidentyfikowane nienasycone kwasy tłuszczowe: oleinowy oraz linolowy. Kwas oleinowy jest jednonienasyconym kwasem tłuszczowym typu omega-9, któremu przypisuje się wiele działań farmakologicznych: obniża ciśnienie krwi (23), chroni komórki przed działaniem wolnych rodników (24), przyspiesza spalanie tkanki tłuszczowej, ułatwiając tym samym redukcję masy (25), może też hamować rozwój cukrzycy typu 2 (26). Z kolei kwas linolowy, należący do kwasów tłuszczowych omega-6, stanowi ważny składnik strukturalny błon komórkowych, może pełnić funkcję prekursora dla bioaktywnych mediatorów lipidowych oraz stanowi źródło energii. Ponadto, biorąc pod uwagę wyniki randomizowanych oraz obserwacyjnych badań kohortowych, doradcy naukowcy z American Heart Association stwierdzili, iż spożycie co najmniej 5-10% całkowitego zapotrzebowania kalorycznego w postaci kwasów

tłuszczowych omega-6 wiąże się ze zmniejszonym ryzykiem choroby wieńcowej (27).

Innym znaczącym związkiem zidentyfikowanym w owocnikach *Laetiporus sulphureus* jest skwalen – naturalny lipid należący do grupy triterpenów, stanowiący prekursor w biosyntezie cholesterolu. Działa on chemoprewencyjnie i zmniejsza efekty uboczne, wywoływane chemioterapią (28).

Rapior i wsp. zbadali 20 młodych oraz starych owocników *Laetiporus sulphureus* na obecność lotnych związków, wykorzystując ekstrakcję dichlorometanem oraz analizę GC-MS. Zidentyfikowano 26 związków, dominowały: (Z)-3-metylo-cynamoaldehyd (27,5%), 2-fenylmetanol (6,4%), benzaldehyd (4,0%) oraz N-fenylmetylformamid (3,8%) (29).

Wnioski

We wszystkich analizowanych wyciągach przygotowanych z owocników *Laetiporus sulphureus* wykazano obecność polifenoli. Najwyższą zawartość oznaczono w wyciągach wodnych, następnie metanolowo-wodnych, najniższą w metanолоwych.

Wszystkie badane wyciągi wykazywały działanie antyoksydacyjne z siłą działania w zależności od rodzaju wyciągu oraz stanowiska zbioru owocników. Aktywność antyoksydacyjna oznaczona metodą z wykorzystaniem odczynnika DPPH była najsilniejsza dla wyciągów metanolowo-wodnych. Natomiast analiza zdolności redukcji jonów żelaza (III) wykazała, że wyciągi wodne i metanolowo-wodne wykazują podobną aktywność, a metanolowe działają słabiej.

Analiza GC-MS wyciągów chloroformowych, przygotowanych w temperaturze wrzenia pozwoliła zidentyfikować 42 z 49 związków, m.in.: tymol, niacynę, kwas oleinowy, kwas linolowy oraz skwalen o udowodnionych właściwościach biologicznych. Skład frakcji lotnej przedstawiony przez Rapiora różni się, co może być spowodowane pochodzeniem surowca i innym sposobem przygotowania wyciągu.

Piśmiennictwo

- Musiaticz K. Huby – grzyby na wysokościach. Przyroda Polska 2010; 10:34-5.
- Kujawa A. Grzybowa wspinaczka na drzewa. Matecznik Białowski 2008; 1/2008:5-7.
- <https://nagrzyby.pl/atlas?id=147> (dostęp z dnia: 26.02.2021).
- Hagara L. Ottova Encyklopédia Húb. Ottovo Nakladatelstvi s.r.o. Praga 2014.
- Szczepkowski A. Grzyby nadrzewne w innym świetle – użytkowanie owocników. Studia i Materiały CEPL w Rogowie 2012; Zeszyt 32/3:172-89.
- Schwarze FWMR, Engels J, Mattheck C. Fungal strategies of wood decay in trees. Springer-Verlag, Germany, Berlin 2000.
- Grienke U, Zöll M, Peintner U i wsp. European medicinal polypores – A modern view on traditional uses. J Ethnopharmacol 2014; 154(3):564-83.
- Petrović J, Stojković D, Reis FS i wsp. Study on chemical, bioactive and food preserving properties of *Laetiporus sulphureus* (Bull.: Fr.) Murr. Food Function 2014; 5(7):1441-51.
- Evans S. Reaction to *Laetiporus sulphureus*. J Mycol 1996; 10(2):87.

10. Alquini G, Carbonero ER, Rosado FR i wsp. Polysaccharides from the fruit bodies of the basidiomycete *Laetiporus sulphureus* (Bull.: Fr.) Murr. FEMS Microbiol Lett 2004; 230:47-52.
11. Kanska G, Guillot J, Dusser M i wsp. Isolation and characterization of an N-acetylglucosamine-binding lectin from the mushroom *Laetiporus sulphureus*. J Biochem 1994; 116:519-23.
12. Tateno H, Goldstein IJ. Molecular cloning, expression and characterization of novel hemolytic lectins from the mushroom *Laetiporus sulphureus*, which show homology to bacterial toxins. J Biol Chem 2003; 278(42):40455-63.
13. Sinanoglou VJ, Zoumpoulakis P, Heropoulos G i wsp. Lipid and fatty acid profile of the edible fungus *Laetiporus sulphureus*. Antifungal and antibacterial properties. J Food Sci Technol 2015; 52(6):3264-72.
14. Leon F, Quintana J, Rivera A i wsp. Lanostanoid triterpenes from *Laetiporus sulphureus* and apoptosis induction on HL-60 human myeloid leukemia cells. J Nat Prod 2004; 67:2008-11.
15. Radic N, Injac R, Strukelj B. Sulphur tuft culinary-medicinal mushroom, *Laetiporus sulphureus* (Bull.: Fr.) Murrill (*Aphyllophoromycetidae*): bioactive compounds and pharmaceutical effects (review). Int J Med Mushrooms 2009; 11:103-16.
16. Olennikov DN, Tankhaeva LM, Agafonova SV. Antioxidant components of *Laetiporus sulphureus* (Bull.: Fr.) Murr. fruit bodies. Appl Biochem Microbiol 2011; 47:419-25.
17. Siljegovic JD, Stojkovic DS, Nikolic MM i wsp. Antimicrobial activity of aqueous extract of *Laetiporus sulphureus* (Bull.: fr.) Murrill. Matica Srpska Novi Sad 2011; 120:297-303.
18. Turkoglu A, Duru ME, Mercan N i wsp. Antioxidant and antimicrobial activities of *Laetiporus sulphureus* (Bull.) Murrill. Food Chem 2007; 101:267-73.
19. Cybul M, Nowak R. Przegląd metod stosowanych w analizie właściwości antyoksydacyjnych wyciągów roślinnych. Herba Pol 2008; 54(1):68-78.
20. Farmakopea Polska Wydanie VI, Pol Tow Farm; Warszawa 2002; 896-7.
21. Wilczyńska A. Metody oznaczania aktywności antyoksydacyjnej miodów pszczelich. Bromat Chem Toksykol 2009; XLII 3:870-4.
22. Matławska I. Farmakognozja, podręcznik dla studentów farmacji. Uniwersytet Medyczny w Poznaniu 2008.
23. Ruiz-Gutiérrez V, Muriana FJ, Guerrero A i wsp. Plasma lipids, erythrocyte membrane lipids, and blood pressure of hypertensive women after ingestion of dietary oleic acid from two different sources. J Hypertens 1996; 14:1483-90.
24. Haug A, Høstmark AT, Harstad OM. Bovine milk in human nutrition – a review. Lipids Health Dis 2007; 6:25.
25. Lim JH, Gerhart-Hines Z, Dominy JE i wsp. Oleic acid stimulates complete oxidation of fatty acids through protein kinase A-dependent activation of SIRT1-PGC1 α complex. J Biol Chem 2013; 288:7117-26.
26. Vassiliou EK, Gonzalez A, Garcia C i wsp. Oleic acid and peanut oil high in oleic acid reverse the inhibitory effect of insulin production of the inflammatory cytokine TNF- α both *in vitro* and *in vivo* systems. Lipids Health Dis. 2009; 8:25.
27. Linus Pauling Institute sl <http://lpi.oregonstate.edu/>, <http://lpi.oregonstate.edu/mic/other-nutrients/essential-fatty-acids> (data dostępu: 02.2021).
28. Reddy LH, Couvreur P. Squalene: A natural triterpene for use in disease management and therapy. Adv Drug Deliv Rev 2009; 61(15):1412-26.
29. Rapior S, Kanska G, Guillot J i wsp. Volatile composition of *Laetiporus sulphureus*. Cryptog Mycol 2000; 21(1):67-72.

Konflikt interesów

Conflict of interest

Brak konfliktu interesów

None

otrzymano/received: 15.02.2021

zaakceptowano/accepted: 02.03.2021

Adres/address:

*dr n. rol. Marcin Szymański

Centrum Zaawansowanych Technologii

Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu

ul. Uniwersytetu Poznańskiego 10, 61-614 Poznań

e-mail: marcin.szymanski@amu.edu.pl