

Jolanta Florczak, Aleksandra Karmańska, Bolesław Karwowski

BADANIE ZAWARTOŚCI ZWIĄZKÓW POLIFENOLOWYCH ORAZ AKTYWNOŚCI PRZECIWUTLENIAJĄCEJ NIEKTÓRYCH JADALNYCH GATUNKÓW GRZYBÓW WIELKOOWOCNIKOWYCH*

Zakład Bromatologii

Katedry Bromatologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

Kierownik: dr hab. prof. nadzw. B. Karwowski

*Oznaczono zawartość związków polifenolowych oraz aktywność przeciwutleniającą pięciu gatunków grzybów dziko rosnących: bocznik ostrygowaty (*Pleurotus ostreatus*), uszak bżowy (*Hirneola auricula – judae*), zimówka aksamitnotrzonowa (*Flammulina velutipes*), żagiew luskowata (*Polyporus squamosus*) i żółciak siarkowy (*Laetiporus sulphureus*). Związki polifenolowe oznaczono z odczynnikiem Folina-Ciocalteu'a w przeliczeniu na kwas galusowy, a aktywność antyoksydacyjną grzybów za pomocą odczynnika DPPH.*

Hasła kluczowe: grzyby jadalne, polifenole, aktywność przeciwutleniająca – DPPH.
Key words: edible mushrooms, polyphenols, antioxidant activity – DPPH.

Grzyby wielkoowocnikowe ceniono dawniej za walory smakowo-zapachowe i aromatyczne. Obecnie coraz większą uwagę zwraca się na właściwości lecznicze i obecność cennych metabolitów wtórnych. Znaczenie w lecznictwie gromady *Basidiomycota* jest doceniane w państwach azjatyckich, w których tradycja stosowania w terapii różnych chorób preparatów pochodzenia grzybowego liczy kilka tysięcy lat. Spośród podstawczaków, do których należą tzw. grzyby wyższe ok. 700 biosyntetyzuje metabolity o działaniu immunomodulacyjnym, przeciwnowotworowym, przeciwwirusowym, przeciwgrzybiczym, przeciwbakteryjnym, przeciwzapalnym, przeciwutleniającym, przeciwcukrzycowym, nerwotonicznym, hepatoprotekcyjnym, obniżającym poziom triglicerydów i cholesterolu we krwi oraz obniżających ciśnienie krwi (1–4).

Wśród poznanych i opisanych grzybów leczniczych do najważniejszych należy ok. 30 gatunków w tym: żółciak siarkowy, bocznik ostrygowaty czy zimówka aksamitnotrzonowa. Grzyby jadalne mogą być cennym źródłem związków biologicznie czynnych wykorzystywanych zarówno w zapobieganiu, jak i leczeniu wielu jednostek chorobowych, co pozwala uznać je za żywność funkcjonalną i surowiec do produkcji nutraceutyków. Grzyby jadalne zarówno uprawiane, jak i pozyskiwane ze stanowisk naturalnych są źródłem przeciwutleniaczy. Największą grupę przeciwutleniaczy stanowią polifenole, a jedną z najważniejszych ich klas są flawonoidy.

* Praca finansowana z działalności statutowej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi (Nr 503/3-045-02/503-01)

Mają zdolność wychwytywania rodników hydroksylowych i lipidowych, anionów nadtlenkowych, a także chronią enzymy, które uczestniczą w mechanizmie antyoksydacyjnym organizmu (5–6). Wykazują szeroki zakres działania. Ograniczają lub hamują utlenianie frakcji LDL, zwiększają zawartość cholesterolu HDL, hamują proces tworzenia blaszek miażdżycowych. Ponadto, grupa związków należąca do flawonoli ma aktywność przeciwmutageną. Zmniejszają one ryzyko powstawania oraz rozwoju guzów nowotworowych. Kolejną grupą związków o działaniu przeciwutleniającym obecną w grzybach są kwasy fenolowe, stwierdzono obecność: kwasu p-kumarowego, p-hydroksybenzoesowego, protokatechowego, cynamonowego i dwa izomery kwasu wanilinowego (3). W otaczającym środowisku nie brak czynników, które mają wpływ na wzrost poziomu wolnych rodników w organizmie człowieka. Dlatego podejmowane są badania zmierzające do wykrycia nowych źródeł substancji o właściwościach przeciwutleniających. Grzyby wielkoowocnikowe również zawierają te substancje, o czym donoszą inni autorzy (7–10).

Celem pracy było oznaczenie w pięciu gatunkach grzybów wielkoowocnikowych pochodzących ze środowiska naturalnego całkowitej zawartości polifenoli z odczynnikiem *Folina-Ciocalteu'a* w przeliczeniu na kwas galusowy oraz aktywności antyoksydacyjnej grzybów za pomocą odczynnika DPPH.

MATERIAŁ I METODY

Owocniki grzybów zebrano jesienią 2015 r. w miejskim parku łódzkiego osiedla Retkinia. Należą do nich: bocznik ostrygowaty – *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm, uszak bżowy – *Hirneola auricula – judae* (Bull.) Quel., zimówka aksamitnotrzonowa – *Flammulina velutipes* (Curtis) Singer, żagiew łuskowata *Polyporus squamosus* (Huds.) Fr., żółciak siarkowy – *Laetiporus sulphureus* (Bull.) Murrill (11). W badaniach wykorzystano z suszu grzybowego (odważono 10 g suszu), z którego przygotowano ekstrakty wodne i etanolowe wg *Gan* i współpr. (12). Przed przystąpieniem do oznaczania polifenoli i aktywności przeciwutleniającej osady wodne rozpuszczono w 25 cm³ wody, a etanolowe w 25 cm³ etanolu.

Całkowitą zawartość polifenoli oznaczono za pomocą metody spektrofotometrycznej z użyciem odczynnika *Folina-Ciocalteu'a* wg *Singleton* i współpr. (13). Zawartość związków fenolowych ogółem obliczano z krzywej kalibracyjnej wykonanej z użyciem kwasu galusowego jako wzorca. Oznaczenia wykonano w 6 powtórzeniach. Wyniki wyrażono jako mg równoważnika kwasu galusowego w przeliczeniu na 100 g/suszu.

Obliczenia statystyczne wykonano za pomocą programu STATISTICAS 9,0, stosując test Studenta. Różnice istotne pomiędzy ekstraktami wodnymi i etanolowymi w obrębie jednego gatunku weryfikowano przy poziomie istotności $p \leq 0,001$. Dla wykazania różnic pomiędzy poszczególnymi gatunkami wykonano test Anova przy poziomie istotności $p < 0,01$. Odmiennie litery występujące w tabeli wskazują na różnice pomiędzy ekstraktami (w – wodne, e – etanolowe) w obrębie jednego gatunku (a,b) oraz pomiędzy poszczególnymi gatunkami (A, B, C, D).

Aktywność antyoksydacyjną oznaczano wg zmodyfikowanej metody *Brandana-Wiliamsa* i współpr. z użyciem syntetycznego rodnika DPPH[•] (1,1-difenylo-2-pikrylohydrazyl, Sigma) (14, 15, 16).

Całkowitą zdolność redukowania rodnika DPPH• obliczono korzystając ze wzoru:

$$I = 100 (A_0 - A_t) / A_0$$

gdzie:

I – % inhibicji, zdolność do „zmiatania wolnych rodników”;

A₀ – początkowa absorbanca rodnika DPPH•;

A_t – absorbanca rodnika DPPH• po reakcji z wyciągiem grzybowym.

WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

Całkowita zawartość związków polifenolowych w badanych grzybach (oznaczona z odczynnikiem *Folina-Ciocalteu'a* w przeliczeniu na kwas galusowy) jest różna i zależy od gatunku (tab. I). Badane gatunki odznaczały się zróżnicowaną zawartością związków fenolowych ogółem, co można tłumaczyć naturalną zmiennością gatunkową wynikającą np. z różnych warunków wzrostu grzybów. Zaobserwowano, że rodzaj użytego rozpuszczalnika ma wpływ na właściwości przeciwutleniające i ogólną zawartość związków polifenolowych w ekstraktach. Większą ilość polifenoli oznaczono w wodnych ekstraktach niż w ekstraktach etanolowych. Najwięcej polifenoli oznaczono zarówno w ekstrakcie wodnym (166,43 mg/ 100 g suszu), jak i etanolowym (77,25 mg/100 g suszu) żagwi łuskowatej, ekstrakcie wodnym boczniaka ostrygowatego (43,43 mg/100 g suszu) i żółciaka siarkowego (43,88 mg/100 g suszu). Najmniejszą zawartość polifenoli w ekstraktach wodnych oznaczono w: uchu bżowym (30,38 mg/100 g suszu) i zimówce aksamitnotrzonowej (30,19 mg/100 g s. m.). Najmniej związków polifenolowych oznaczono w ekstraktach etanolowych zimówki aksamitnotrzonowej (8,93 mg /100 g suszu) i żółciaka siarkowego (9,84 mg/100 g suszu). Między badanymi gatunkami grzybów występują różnice istotne statystycznie (przy poziomie istotności $p \leq 0,001$).

Tab e l a I. Zawartość polifenoli w wyciągach etanolowych i wodnych badanych grzybów

Table I. Contents of total phenols of ethanolic and water extracts of mushroom species

Gatunek grzyba	Zawartość polifenoli mg GAE*/100 g suszu	
	roztwory wodne	roztwory etanolowe
Bocznik ostrygowaty	43,43 ± 1,46 ^{Aa}	20,96 ± 0,55 ^{Ab}
Uszak bżowy	30,38 ± 0,52 ^{Ba}	18,63 ± 0,35 ^{Ab}
Zimówka aksamitnotrzonowa	30,19 ± 1,15 ^{Ba}	8,93 ± 0,53 ^{Bb}
Żagiew łuskowata	166,43 ± 2,44 ^{Ca}	77,25 ± 0,89 ^{Cb}
Żółciak siarkowy	43,88 ± 1,64 ^{Da}	9,84 ± 0,13 ^{Bb}

GAE* – kwas galusowy; (a,b) – różnice statystycznie istotne w obrębie jednego gatunku; (A,B,C,D) – różnice statystycznie istotne pomiędzy poszczególnymi gatunkami.

Właściwości przeciwutleniające określono na podstawie zdolności do wygaszania rodnika DPPH•. Zdolność do neutralizacji wolnych rodników określa też parametr EC₅₀ (ang. efficient concentration), oznaczający stężenie przeciwutleniacza niezbędne do neutralizacji 50% wolnych rodników w środowisku reakcji. Im wyższa jest

wartość EC, tym mniej efektywny jest dany przeciwutleniacz (należy pamiętać, że parametr ten jest właściwością charakterystyczną dla danego antyutleniacza tylko w określonych warunkach).

Wyniki oznaczonej aktywności antyoksydacyjnej z użyciem syntetycznego rodnika DPPH• wyrażono jako liczbę mg suszu grzybowego w 0,1 cm³ wyciągu wodnego lub etanolowego, który redukuje 50% rodnika DPPH•. Najsilniejsze właściwości antyoksydacyjne stwierdzono w wyciągu wodnym i etanolowym żagwi łuskowatej, najslabsze w wyciągu etanolowym uszaka bzowego. W przypadku zimówki aksamitnotrzonowej zarówno w wyciągu wodnym jak i etanolowym 50% inhibicji rodnika DPPH• zaobserwowano w zbliżonych stężeniach (ok. 8 mg/0,1 cm³). Wyciągi wodne bocznika i żółciaka wykazują podobną aktywność przeciwutleniającą. Pomimo mniejszej zawartości polifenoli w ekstraktach etanolowych tych grzybów, aktywność przeciwutleniająca jest zachowana (50% inhibicja rodnika DPPH• występuje w zbliżonych stężeniach wyciągów (ok. 8 mg/0,1 cm³) (tab. II i III).

Tab e l a II. Procent inhibicji rodnika DPPH• przez etanolowe ekstrakty badanych grzybów

Tab l e II. Scavenging effect (%) of the mushroom species on DPPH• ethanol extracts

Gatunek grzyba	PROCENT INHIBICJI				
	stężenie wyciągu grzybowego w próbce mg/0,1 cm ³				
	2	4	8	12	16
Bocznik ostrygowaty	8,27±0,79	16,50±0,38	38,83±0,87	51,86±1,27	64,64±1,76
Uszak bzowy	6,25±0,48	13,70±0,23	31,61±0,65	34,98±0,87	39,48±0,99
Zimówka aksamitnotrzonowa	26,05±0,42	33,39±0,86	55,42±1,09	70,87±1,92	94,50±2,96
Żagiew łuskowata	14,73±0,78	25,36±0,65	61,70±1,34	92,55±2,28	nie oznaczono
Żółciak siarkowy	12,12±0,38	30,15±0,53	55,00±1,01	60,00±1,98	80,43±2,13

Tab e l a III. Procent inhibicji rodnika DPPH• przez ekstrakty wodne badanych grzybów

Tab l e III. Scavenging effect (%) of the mushroom species on DPPH• water extracts

Gatunek grzyba	PROCENT INHIBICJI				
	stężenie wyciągu grzybowego w próbce mg/0,1 cm ³				
	2	4	8	12	16
Bocznik ostrygowaty	25,98±0,81	45,59±0,36	55,02±0,90	65,32±1,86	72,43±2,16
Uszak bzowy	19,77±0,48	39,53±0,23	31,61±0,65	60,73±0,87	69,31±0,99
Zimówka aksamitnotrzonowa	26,96±0,42	28,70±0,86	55,42±1,09	58,79±1,92	78,40±3,12
Żagiew łuskowata	37,93±0,78	44,27±0,65	50,37±1,34	75,56±2,28	98,70±2,72
Żółciak siarkowy	29,46±0,38	38,17±0,53	45,92±1,01	65,97±1,98	89,54±1,95

Podsumowując należy stwierdzić, że badane gatunki grzybów (szczególnie żagiew łuskowata i żółciak siarkowy) mogą być źródłem związków polifenolowych. Na przykładzie żagwi widać wyraźną zależność pomiędzy poziomem polifenoli a aktywnością przeciwutleniającą. Zaobserwowano korelację pomiędzy zawartością polifenoli, a aktywnością przeciwutleniającą ekstraktów wodnych i etanolowych.

WNIOSKI

1. Wykazano, że badane gatunki grzybów odznaczają się zróżnicowaną zawartością związków fenolowych ogółem oraz różnymi właściwościami przeciwutleniającymi.
2. Oznaczono większą zawartość związków polifenolowych w ekstraktach wodnych niż etanolowych.
3. Stwierdzono zależność pomiędzy całkowitą zawartością związków polifenolowych, a zdolnością badanych grzybów do inaktywacji rodnika DPPH[•].
4. Badane grzyby mogą być źródłem polifenoli w diecie.

J. Florczak, A. Karmańska, B. Karwowski

A STUDY OF THE CONTENTS OF POLYPHENOLIC COMPOUNDS AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF SOME SPECIES OF EDIBLE MACROFUNGI

Summary

The antioxidant activity of five species of wild-growing mushrooms was investigated in this study. The mushrooms to be tested were collected in autumn 2015, in the city park of Lodz-Retkinia housing estate. These were: oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*), wood ear (*Hirneola auricula-judae*), enokitake (*Flammulina velutipes*) Dryad's saddle (*Polyporus squamosus*), sulphur shelf (*Laetiporus sulphureus*). The authors determined total polyphenol content in terms of gallic acid using Folin-Ciocalteu reagent, and the antioxidant activity of the fungi using DPPH reagent. Aqueous and ethanol extracts were prepared. All steps were repeated for all six fungal extracts. The content of polyphenolic compounds in the aqueous extracts was higher than in the ethanol extracts. The highest quantities of the polyphenolic compounds were determined in aqueous extract of *Polyporus squamosus*, and the lowest in the ethanol extract of *Flammulina velutipes*. The highest antioxidant activity was found in the water extract of *Polyporus squamosus*, while the lowest in the ethanol extract of *Hirneola auricula-judae*. A relationship has been found to occur between the total polyphenol compounds and the ability of the tested fungi to inactivate the DPPH radicals. The higher was the content of polyphenolic compounds, the better were the antioxidant properties.

PIŚMIENNICTWO

1. Turło J.: Grzyby wielkoowocnikowe – niedocenione źródło substancji leczniczych, Studia i Materiały CEPL w Rogowie 2015; 44(3): 138-151. – 2. Turło J.: Biotechnologia grzybów. Zastosowanie w farmacji i suplementacji. Biuletyn Wydziału Farmaceutycznego WUM, 2013; 3: 18-26. – 3. Sulkowska-Ziaja K., Muszyńska B., Ekiert H.: Związki bezazotowe w owocnikach grzybów z gromady *Basidiomycota*. Postępy Fitoterapii, 2013; 3: 182-190. – 4. Kalbarczyk J., Radzki W.: Uprawiane grzyby wyższe jako cenny składnik diety oraz źródło substancji aktywnych. Herba Polonica, 2009; 55(4): 224-232. – 5. Szajdek A., Borowska J.: Właściwości przeciwutleniające żywności pochodzenia roślinnego, ŻYWNOSĆ. Nauka. Technologia. Jakość, 2004; 4(41): 5-28. – 6. Grajek W.: Naturalne przeciwutleniacze: od surowca do organizmu, Konferencja naukowa, Poznań, 2007. – 7. Sławińska A., Radzki, Kalbarczyk J.: Antioxidant activities and polyphenolics content of *Flammulina velutipes* mushroom extracts. Herba Polonica, 2013; 59(3): 26-35. – 8. Radzki W., Sławińska A., Jabłońska-Ryś E. and Michalak-Majewska M.: Effect of blanching and cooking on antioxidant capacity of cultivated edible mushrooms: A comparative study. International Food Research Journal, 2016; 23(2): 599-605. – 9. Popescu M.-L., Costea T., Nencu I., Dutu L. E., Gird C. E.: Polyphenols contents and antioxidant activity of some Romanian wild edible mushrooms, FARMACIA, 2016; 64(2): 231-236. – 10. Robaszkiewicz A., Bartosz G., Lawrynówic M., Soszyński M.: The Role of Polyphenols, β -Carotene, and Lycopene in the Antioxidative Action of the Extracts of Dried, Edible Mushrooms. J. Nutr. Metab. 2010; 173-274.

11. Index Fungorum data base [Internet] 2015 [cited 2015 december] Available from: <http://www.indexfungorum.com>. – 12. *Gan, C. H., Nurul Amira, B. and Asmah, R.* Antioxidant analysis of different types of edible mushrooms (*Agaricus bisporous* and *Agaricus brasiliensis*). International Food Research Journal 2013; 20(3): 1095-1102. – 13. *Singleton V.L., Rossi J.A.*: Colorimetry of total phenolics with phospho-molybdciphosphotungstic acid reagents. Am. J. Enol. Viticult. 1965; 16: 144-158. – 14. *Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C.*: Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. Lebensm Wiss Technology 1995; 28: 25-30. – 15. *Polak J., Bartoszek M., Stanimirova I.* : A study of the antioxidant properties of beers using electron paramagnetic resonance. Food Chemistry 2013; 141(3): 3042-3049. – 16. *Molyneux P.*: The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. J. Scitechnol, 2004; 26(2): 211-19.

Adres: 90-151 Łódź, ul. Muszyńskiego