

ANTIOXIDAČNÁ A ANTIMIKROBIÁLNA AKTIVITA EXTRAKTOV *Ophiocordyceps sinensis* A *Paecilomyces hepiali*

LUCIA UNGVARSKÁ MAEUČKÁ^a,
ANNA UHRINOVÁ^a, JARMILA HARVANOVÁ^a,
ĽUDMILA TKÁČIKOVÁ^b a MARTIN PAVLÍK^c

^a Katedra chémie, biochémie a biofyziky, ^b Katedra mikrobiológie a imunológie, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Komenského 73, 041 81 Košice,

^c Katedra integrovanej ochrany lesa a krajiny, Lesnícka fakulta, Technická univerzita vo Zvolene, T.G. Masaryka 20, 960 53 Zvolen

lucia.ungvarska.malucka@uvlf.sk

Došlo 7.7.20, prepracované 3.3.21, prijaté 27.4.21.

Kľúčové slová: *Ophiocordyceps sinensis*, *Paecilomyces hepiali*, antioxidačná a antimikrobiálna aktivita

Úvod

Rod *Ophiocordyceps* pozostáva z približne 140 druhov húb, z ktorých všetky parazitujú na rôznych druhoch hmyzu¹. Najznámejší je *Ophiocordyceps sinensis* (Berk.), ktorý rastie v nadmorských výškach od 3000 do 5000 metrov nad morom, najmä v provincii Yunnan v Číne, ako aj v Tibete, Bhutáne a Nepále. *Ophiocordyceps sinensis* (Berk.) je hlavnou liečivou hubou v tradičnej čínskej medicíne od 15. storočia, keď ju prvýkrát opísal tibetský lekár Nyamnyi Dorje². Životný cyklus *O. sinensis* pozostáva z pohlavného (teleomorfa) a nepohlavného štádia (anamorfa). Hostiteľské larvy motýľa z čeľade *Hepialidae*, najmä druhu *Thitarodes armoricanus*, sú infikované spórmi huby. Vzniká hubové mycélium, ktoré následne infikuje larvu prečkávajúcu tibetskú zimu pod povrchom zeme. *O. sinensis* sa postupne začne rozrastať na úkor vnútorného tkaniva larvy, ktoré je následne kompletne nahradené hubovým tkanivom – mycéliom. Začiatkom leta je možné pozorovať plodnicu (strómu) vyrastajúcu z hlavy larvy, ktorá produkuje spóry do okolia a tie môžu infikovať ďalšie larvy a cyklus sa opakuje³. Tradičná čínska medicína používa *Ophiocordyceps sinensis* na liečbu problémov s pľúcami a respiračným systémom, hyposexualitou, hypolipidémiou, obličkami, pečeňou, srdcom a imunitným systémom. Okrem toho sa používa na liečbu rôznych foriem rakoviny, ako aj doplnok pri chemoterapii a rádioterapii. V Tibete sa používa na opätovné získanie životnej sily po rôznych chorobách^{4,6}. Zvýšený dopyt po plodniciach *O. sinensis* spolu s ich vysokou hodnotou vedie k nadmernému zberu a devastácii ich prirodzeného biotopu s negatívnymi dôsledkami pre miestnu

ekológiu. Z tohto dôvodu sa začali vyvíjať nové metódy, ktoré by uspokojili dopyt po týchto hubách. Jednou z možností sa ukázal produkčný kmeň Cs-4 (jeden z prvých izolovaných kmeňov *O. sinensis* používaných na kultiváciu), ktorý bol následne vybraný pre komerčnú výrobu. Jeho medicínsky potenciál bol testovaný a na základe zistených účinnosti a bezpečnosti bol v Číne schválený v roku 1988 ako liek pod názvom *Jin Shui Bao*⁶⁻⁸. Tento izolovaný kmeň bol spočiatku považovaný za rovnaký ako prírodné kordycepsy. V roku 1982 bol však identifikovaný ako samostatný druh *Paecilomyces hepiali*. Výskum, ktorý porovnával chemické zlúčeniny a farmakologickú aktivitu húb *O. sinensis* a *P. hepiali*, preukázal, že *P. hepiali* má väčšie množstvo siedmich esenciálnych aminokyselín, ako sa nachádza v *O. sinensis*. Náš súčasný výskum sa zameriava na testovanie kultivácie dvoch kmeňov *O. sinensis* a jedného kmeňa *P. hepiali* fermentáciou v tuhom skupenstve na dvoch poddruhoch ryže. Hlavným cieľom tohto výskumu je stanovenie antioxidačnej a antimikrobiálnej aktivity metabolitov izolovaných z liečivých húb druhov *O. sinensis* a *P. hepiali*.

Experimentálna časť

Huby

Použitý produkčný kmeň huby *Paecilomyces hepiali*, známy aj ako Cs-4, pochádza od firmy Aloha Medicinals Inc. (Carson City, Nevada) a uchovávaný je na sladovom kvasnicovom agare (MYA) pri 4 °C firmou Mykoforest Velčice (Slovensko) pod katalógovým číslom MFTCCB023/0216. Boli použité aj dva produkčné kmene *Ophiocordyceps sinensis* (MFTCCB026/0216 a MFTCCB025/0216), taktiež poskytnuté firmou Mykoforest Velčice. Všetky kultúry boli v rámci aktuálneho výskumu pestované v Petriho miskách na MYA agare (20 g sladového extraktu, 2 g kvasnicového extraktu a 20 g agaru na liter destilovanej vody) pri 22 °C, v tme po dobu 14 dní.

Príprava substrátu

Ryža *Oryza sativa* L. je základnou potravinou pre väčšinu obyvateľstva na Zemi a obsahuje dva hlavné poddruhy: lepkavý, guľatý *Oryza sativa* L. var. *japonica* (pestovaný v suchších oblastiach najmä v Japonsku, ale aj v iných častiach Ázie) a nelepkavý, dlhozrnný *Oryza sativa* L. var. *indica* (rozšírený v nížinných, tropických oblastiach Ázie)^{9,10}. Tieto sa bežne vyskytujú aj na slovenskom trhu. 100 g ryže bolo prevarené v čistej vode a po odstredení bolo získané 180 g substrátu, ktorý bol potom sterilizovaný pri 121 °C počas 2 hodín.

Kultivácia

Po vychladnutí na izbovú teplotu bol substrát inokulovaný inokulačným roztokom, ktorý bol pripravený z 3 g glukózy, 3 g sacharózy (Merck, Bratislava, Sloven-

sko), 1 g sójového peptónu, 2,5 g kvasinkového extraktu (Biolife, Taliansko), 1 g fosforečnanu draselného, 0,5 g soli Epsom, 0,5 g dihydrátu chloridu vápenatého, 0,01 g heptahydrátu síranu železnatého, 1 mg pentahydrátu síranu meďnatého (Merck, Slovensko), 0,1 g tiamín hydrochloridu (Sigma-Aldrich Co., Louis, MO) a 3 kúskov (4 × 4 mm) *Ophiocordyceps sinensis* alebo *Paecilomyces hepiali* kultúry z Petriho misky. Substrát bol inokulovaný 3 mililitrami inokulačného roztoku a potom pretrepávaný pri 120 ot./min pri 22 °C v 500ml Erlenmeyerovej banke obsahujúcej 200 ml živného roztoku po dobu 7 dní. Živný roztok bol pripravený z kvasnicového extraktu (8 g l⁻¹), dihydrogénfosforečnanu draselného (1 g l⁻¹), hydrogénfosforečnanu draselného (2 g l⁻¹), glukózy (8 g l⁻¹) a síranu horečnatého (1 g l⁻¹).

Následne prerastal v inkubátore 30 dní pri 22 °C, pri striedaní režimu 12 hodín svetlo a 12 hodín tma. Vzorky boli vysušené pri 40 °C v sušičke APT Line (Binder GmbH, Tuttlingen, Nemecko) a rozomleté v SM-100 mlyne (Retch Co., Haan, Nemecko).

Metódy kultivácie sú založené na klasických postupoch publikovaných v odbornej literatúre^{11,12}, ako aj na skúsenostiach pestovateľov najmä z firmy Mykoforest Velčice.

Chemikálie

Chemikálie boli použité v komerčne dostupnom stave bez ďalšieho čistenia: DPPH-2,2-difenyl-1-pikryl-hydrazylový radikál (Sigma Aldrich, Bratislava, Slovensko), metanol 99,9%, (Sigma Aldrich, Bratislava, Slovensko), DMSO – dimetylsulfoxid (Sigma Aldrich, Bratislava, Slovensko), DMSO-*d*₆ – deuterovaný dimetylsulfoxid (Merck Millipore, Darmstadt, Nemecko).

Extrakcia

10 g každej vzorky 1J–6I v 50 ml 99,9% metanolu bolo vystavené mikrovlnnému žiareniu o výkone 600 W po dobu 2 min. Použilo sa mikrovlnné zariadenie Monowave 300 (Anton Paar, GmbH, Rakúsko) s nastaviteľným mikrovlnným výkonom (od 100 do 900 W). Vzorky boli následne prefiltrované (filtračný papier, KA 1, Papirna Perštejn s.r.o., Česká republika) a filtráty boli odparené dosucha na rotačnej vákuovej odparke VWR IKA-RV 10 (VWR International GmbH, Rakúsko).

Antioxidačná aktivita

Na meranie antioxidačnej aktivity bol použitý čerstvo pripravený zásobný roztok stabilného DPPH radikálu o koncentrácii 0,2 mmol l⁻¹. Meraním celého spektra (A = 200–900 nm) bola najvyššia hodnota absorpcie roztoku DPPH zistená pri vlnovej dĺžke 517 nm. UV/Vis spektrá boli merané na spektrofotometri Libra S12 (Biochrom Ltd., EVISA) v 1cm kvetách pri teplote miestnosti, v 99,9% metanole. Pri príprave vzoriek pre stanovenie antioxidačnej aktivity boli všetky extrakty rozpustené v čistom 99,9% metanole (1 ml). Absorbancia zásobného

roztoku DPPH bola meraná po zmiešaní 1 ml zásobného roztoku o koncentrácii 0,2 mmol l⁻¹ s 1 ml 99,9% metanolu pri vlnovej dĺžke 517 nm oproti zodpovedajúcemu slepému roztoku, ktorým bol čistý 99,9% metanol. Percentuálna inhibícia voľných DPPH radikálov bola vypočítaná na základe nasledujúcej rovnice:

$$I = (AB - AS / AB) \times 100 \quad (1)$$

kde *I* je antioxidačná aktivita v %, AB je absorbancia zásobného roztoku DPPH o koncentrácii 0,2 mmol l⁻¹ zriedeného 1 ml 99,9% metanolu, AS je absorbancia vzorky po 30 minútach inkubácie v tme pri teplote 25 °C. Výsledky antioxidačnej aktivity vzoriek 1J–6I sa uvádzajú ako hodnoty IC₅₀ (koncentrácia extraktu, ktorá spôsobuje 50% stratu aktivity DPPH radikálu). Všetky merania vychytávania stabilného DPPH radikálu boli uskutočnené v rôznych koncentráciách extraktov: 10,0; 5,0; 2,5; 1,25; 0,625; 0,312 a 0,156 mg ml⁻¹.

Antimikrobiálna aktivita

Na testovanie antimikrobiálnej aktivity bol použitý agarový difúzny test¹³. Baktérie *Staphylococcus aureus* (CCM 4223, ATCC 29213) a *Escherichia coli* (CCM 3988, ATCC 10536) boli získané z Českej zbierky mikroorganizmov, Brno. Baktérie boli kultivované v BHI bujóne (Brain Heart Infusion broth, Oxoid) pri 37 °C po dobu 20 hodín. Po kultivácii boli baktérie nariedené vo fosfátovom fyziologickom roztoku na 0,5–1,0 stupeň McFarlandovej zákalovej stupnice. Z tejto suspenzie bol odoberatý 1 ml a prenesený do 100 ml vytemperovaného tekutého agaru (Standard plate count agar, Oxoid). Do Petriho misiek s priemerom 9 cm bolo vyliate 20 ml tohto agaru. Po stuhnutí boli do agaru vyrezané jamky s priemerom 0,5 cm, do ktorých sa aplikovalo 50 μl vzorky 1J–6I (35 mg z každého extraktu sa rozpustilo v 200 μl DMSO), 50 μl gentamicinu o koncentrácii 50 μg ml⁻¹ (pozitívna kontrola) a 50 μl DMSO (negatívna kontrola). Po 24 hodinách inkubácie pri 35 ± 2 °C boli zmerané priemery inhibičných zón (mm, IZD – priemer inhibičných zón). Na výpočet relatívneho priemeru inhibičnej zóny v percentách bol použitý vzorec:

$$RIZD = (IZD_{VZORKA} - IZD_{DMSO}) / IZD_{GENMTAMICIN} \times 100 \quad (2)$$

Výsledky a diskusia

Tabuľka I obsahuje označenie vzoriek, kmeň, použitý substrát a hodnoty výťažnosti pre jednotlivé extrakty húb pripravené mikrovlnnou extrakciou. Výťažnosť extraktov bola stanovená z podielu odparenej hmotnosti extraktu k hmotnosti práškovej formy vzoriek *O. sinensis* resp. *P. hepiali*.

Ako vyplýva z tab. I, substrát pripravený z *Oryza sativa* L. var. *indica* vykazoval pre všetky kmene vyššiu percentuálnu výťažnosť v porovnaní so substrátom *Oryza sativa* L. var. *japonica*. Môžeme predpokladať, že za pozorované rozdiely vo výťažnostiach môžu byť zodpovedné podmienky prípravy ryžových substrátov, resp. rozdielne

Tabuľka I

Základné údaje o vzorkách húb, kmeni, použitom substráte a výťažnosti pripravených extraktov (%)

Vzorka	Kmeň	Substrát	Výťažnosť [%] ^a
1J	<i>O. sinensis</i> MFTCCB026/0216	<i>Oryza sativa</i> L. var. <i>japonica</i>	0,67 ± 0,02
2I	<i>O. sinensis</i> MFTCCB026/0216	<i>Oryza sativa</i> L. var. <i>indica</i>	0,94 ± 0,05
3J	<i>O. sinensis</i> MFTCCB025/0216	<i>Oryza sativa</i> L. var. <i>japonica</i>	2,92 ± 0,07
4I	<i>O. sinensis</i> MFTCCB025/0216	<i>Oryza sativa</i> L. var. <i>indica</i>	3,76 ± 0,05
5J	<i>P. hepiali</i> MFTCCB023/0216	<i>Oryza sativa</i> L. var. <i>japonica</i>	2,19 ± 0,06
6I	<i>P. hepiali</i> MFTCCB023/0216	<i>Oryza sativa</i> L. var. <i>indica</i>	4,28 ± 0,05

^a Výťažnosť extraktov je stanovená ako priemerná hodnota z troch opakovaných extrakcií

varianty ryže. Rozdielne zastúpenie chemických látok, ako sú napríklad aminokyseliny, sacharidy, lipidy, sterolové zlúčeniny¹⁴ medzi týmito dvoma variantami ryže, môže vplývať na výslednú rozdielnú výťažnosť extraktov v prospech indického substrátu. Je však ťažké špecifikovať, ktoré konkrétne chemické zlúčeniny sú za takéto pozorované rozdiely zodpovedné. Rozdiely vo výťažnostiach boli zistené aj v rámci jednotlivých kmeňov. U kmeňa *O. sinensis* MFTCCB025/0216 v porovnaní s kmeňom *O. sinensis* MFTCCB026/0216 bola zaznamenaná v priemere 4krát vyššia výťažnosť. Taktiež aj u kmeňa *P. hepiali* boli zistené vyššie hodnoty výťažnosti, porovnateľné s kmeňom *O. sinensis* MFTCCB025/0216.

Tabuľka II sumarizuje výsledky antioxidačnej aktivity vzoriek 1J–6I pripravených pomocou mikrovlnnej extrakcie.

Ako vyplýva z tab. II, metanolový extrakt vzorky 5J (*P. hepiali*, *Oryza sativa* L. var. *japonica*) vykazuje najvyššiu antioxidačnú aktivitu $IC_{50} = 5,16 \pm 0,01 \text{ mg ml}^{-1}$. Naopak, najmenej aktívnu vo vychytávaní DPPH radikálu sa ukázala vzorka 4I $IC_{50} = 9,49 \pm 0,01 \text{ mg ml}^{-1}$, kmeň

O. sinensis, *Oryza sativa* L. var. *indica*. Za tento výrazný rozdiel v antioxidačnej aktivite je zodpovedný rozdielny kmeň húb, ako aj použitý substrát. Ak vzájomne porovnáme rovnaké kmene húb, tak pozitívny vplyv na antioxidačnú aktivitu bol výraznejší pri použití substrátu *Oryza sativa* L. var. *japonica*. Z porovnaní hodnôt IC_{50} jednotlivých typov substrátov jasne vyplýva, že antioxidačná aktivita sa u všetkých troch kmeňov líši v priemere o 1,74–3,31 mg ml^{-1} .

NMR analýza

¹H, ¹³C NMR spektrá (ppm) sa merali na NMR spektrometri Varian VNMRS (600 MHz, Palo Alto, Kalifornia, USA) pri laboratórnej teplote v DMSO-*d*₆, 0,6 ml. Priradenie signálov protónov a uhlíkov sa uskutočnilo z ¹H, ¹³C, COSY, HSQC, HMBC a DEPT spektier. NMR analýzou bolo identifikovaných šesť majoritných chemických zlúčenín (kyselina olejová, kyselina linolová, kyselina octová, kyselina jantárová, močovina, D-manitol). Integráciu odlišených protónových signálov sa stanovil pomer hlavných chemických zlúčenín v zmesných spektrách extrak-

Tabuľka II

Hodnoty antioxidačnej aktivity a hodnoty IC_{50} extraktov *O. sinensis* a *P. hepiali* 1J–6I pripravených mikrovlnnou extrakciou po 30minútovej inkubácii v tme pri 25 °C

Vzorka/koncentrácia [mg ml ⁻¹]	Antioxidačná aktivita [%] ^a					
	1J	2I	3J	4I	5J	6I
10,000	50,81	62,40	74,35	55,14	85,70	58,34
5,000	29,70	39,20	48,36	20,90	72,10	30,00
2,500	21,60	20,22	25,20	11,33	43,10	17,50
1,250	7,41	8,00	10,60	6,10	22,00	3,91
0,625	0,00	2,43	0,00	0,10	10,20	0,00
0,312	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
0,156	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
IC_{50} [mg ml ⁻¹] ^b	9,30 ± 0,01	7,56 ± 0,01	6,28 ± 0,01	9,49 ± 0,01	5,16 ± 0,01	8,47 ± 0,01

^a Je priemerná antioxidačná aktivita, získaná ako priemer z troch opakovaných meraní absorbancie pri vlnovej dĺžke 517 nm pre DPPH radikál, ^b sa určuje z nameraných údajov ako lineárna funkcia $I (\%) = f(\text{koncentrácia})$ pomocou programu Microsoft Excel

Tabuľka III

Pomer majoritných chemických zlúčenín stanovený z ^1H NMR spektier extraktov 1J–6I

Vzorka	Integrovaná intenzita odlišených signálov					
	kyselina olejová	kyselina linolová	kyselina octová	kyselina jantárová	močovina	D-manitol
1J	1,00	0,99	0	0	0	0
2I	1,00	0,77	0,16	0	0	0,62
3J	1,00	0,64	0	0	0,22	0
4I	1,00	0,78	0	0	0,98	0
5J	1,00	1,04	0	0	2,02	0
6I	1,00	0,60	0	0,10	0,30	0

tov 1J–6I (tab. III). Integrovali sa nasledujúce protónové signály: kyselina olejová (2,15 ppm, triplet, 2H); kyselina linolová (2,73 ppm, triplet, 2H); kyselina octová (1,90 ppm, singlet, 3H); kyselina jantárová (2,25 ppm, singlet, 4H); močovina (5,50 ppm, široký singlet, 4H); D-manitol (3,61 ppm, dublet dubletu, 2H).

Ako je uvedené v tab. III, hlavnými zlúčeninami v extraktoch 1J–6I boli kyselina olejová, kyselina linolová a močovina. Z literatúry je známe, že konjugované izoméry kyseliny linolovej vykazujú antioxidačné vlastnosti^{15,16}, pričom jedným zo spôsobov zvýšenia koncentrácie ω -3 polynenasýtených mastných kyselín je tvorba komplexu s močovinou¹⁶. Podľa Luisa Vázqueza¹⁸ močovina tvorí inklúzivne komplexy s lineárnymi uhlíkovými reťazcami, ktoré majú viac ako 6 atómov uhlíka. Močovina kryštalizuje v hexagonálnej sústave. Vnútri kryštálovej sústavy sa vytvára sieť kanálov s priemerom 8 až 12 Å. Priestor je dostatočne veľký pre molekuly s dlhými reťazcami¹⁹. Najlepšiu schopnosť deaktivovať DPPH radikál mala vzorka 5J (*P. hepiali* MFTCCB023/0216, *Oryza sativa* L. var. *japonica*), ktorá tiež obsahovala najvyššie množstvo močoviny, čo potvrdzuje uvedený výskum. Treba však zohľadniť, že v extraktoch 1J–6I bola chemická štruktúra stanovená len u majoritných chemických zlúčenín. V extraktoch boli prítomné aj iné látky, ktoré sa nám žiaľ pre ich minimálne množstvo nepodarilo identifikovať.

Nevylučujeme, že aj iné chemické zlúčeniny môžu prispievať k antioxidačnej aktivite jednotlivých extraktov 1J–6I, a u takýchto zmesí chemických látok sa môže uplatniť aj synergický efekt, ktorý môže ovplyvniť výslednú antioxidačnú a antimikrobiálnu aktivitu.

Antimikrobiálna aktivita

Štyri extrakty zo šiestich testovaných vzoriek boli biologicky aktívne, potláčali rast baktérií *Escherichia coli* a *Staphylococcus aureus*. Výsledky ukazujú, že antimikrobiálna aktivita alkoholových extraktov vzoriek 1J, 2I, 3J a 6I na kmeň baktérií *Staphylococcus aureus* sa pohybovala v rozmedzí 50–183 % RIZD. Tie isté extrakty vykazovali antimikrobiálnu aktivitu aj na kmeň baktérií *Escherichia coli*, kde sa hodnoty RIZD pohybovali od 83 do 250 % (tab. IV).

V priemere bola lepšia inhibícia extraktmi pozorovaná na kmeni baktérií *Escherichia coli* v porovnaní s baktériami kmeňa *Staphylococcus aureus*. Literatúra uvádza antimikrobiálnu aktivitu vodných alebo metanolových extraktov kmeňa *Cordyceps*^{20–23}. Zhang²⁰ opisuje antibakteriálny mechanizmus účinku polysacharidov izolovaných z kmeňa *Cordyceps* na baktérie kmeňa *E. coli* a *S. aureus*. Polysacharidy patria medzi bioaktívne látky a v hubách *O. sinensis* a *P. hepiali* hrajú dôležitú úlohu

Tabuľka IV

Antimikrobiálna aktivita extraktov 1J–6I testovaných na kmeňoch baktérií *S. aureus* a *E. coli*

Vzorka	Priemer inhibičnej zóny IZD ^b [mm]		[% RIZD ^c]	
	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
1J	10	9	166	150
2I	11	5	183	83
3J	3	15	50	250
4I	0	0	0	0
5J	0	0	0	0
6I	9	9	150	150
Gentamicin ^a	6	6	100	100

^a Koncentrácia gentamicínu (50 $\mu\text{g ml}^{-1}$), ^b IZD – priemer inhibičných zón, ^c RIZD – relatívny priemer inhibičnej zóny

z hľadiska ich farmakologických vlastností^{20,24}. Na základe uvedenej literatúry a skutočnosti, že polysacharidy boli potvrdené aj v našich vzorkách 1J–6I pomocou ¹H NMR (oblasť 3,5–4,5 ppm), môžeme dospieť k záveru, že polysacharidy sú pravdepodobne zodpovedné za antimikrobiálnu aktivitu extraktov pripravených z *O. sinensis* a *P. hepiali*. Nemôžeme jednoznačne vyvodit' záver, že v závislosti od kvantity polysacharidov je závislá aj antimikrobiálna aktivita testovaných extraktov. Tá závisí hlavne od chemickej štruktúry daného polysacharidu a jeho mechanizmu účinku na inhibíciu rastu baktérií kmeňa *S. aureus* a *E. coli*. Samotné stanovenie chemickej štruktúry polysacharidov prostredníctvom NMR analýzy je veľmi komplikované a bude predmetom ďalšieho výskumu. Ak by sme porovnali extrakty, ktoré vykazovali najvyššiu antioxidantnú aktivitu s ich antimikrobiálnym účinkom, tak môžeme pozorovať protichodný trend (čím vyššia schopnosť extraktu vychytávať DPPH radikál, tým nižšia antibakteriálna aktivita). Samozrejme, za antioxidantný účinok sú po chemickej stránke zodpovedné iné chemické zlúčeniny, ako za antimikrobiálnu aktivitu. Rovnako, ako pri antioxidantnej aktivite sa môže uplatniť na výslednej aktivite aj synergický efekt jednotlivých látok v extraktoch⁸, tak predpokladáme, že tento efekt zohráva dôležitú úlohu aj pri antimikrobiálnej aktivite. V zmesných spektrách extraktov 1J–6I sa nachádzali aj iné chemické zlúčeniny, no stanovenie ich chemickej štruktúry pomocou NMR nebolo možné vzhľadom na ich minimálne množstvo. Môžeme však predpokladať, že aj iné chemické látky môžu prispievať rôznou mierou k antimikrobiálnemu účinku testovaných extraktov.

Záver

Práca sa zaoberá štúdiom dvoch kmeňov liečivých húb druhu *Ophiocordyceps sinensis* a druhu *Paecilomyces hepiali*, ktoré boli kultivované na dvoch ryžových substrátoch – *Oryza sativa* L. var. *indica* a *Oryza sativa* L. var. *japonica*. U pripravených metanolových extraktov bola stanovená ich antioxidantná aktivita DPPH metódou. Extrakt 5J (*P. hepiali*, *Oryza sativa* L. var. *japonica*) s hodnotou IC₅₀ = 5,16 ± 0,01 mg ml⁻¹ sa ukázal ako najúčinnjší extrakt pri vychytávaní stabilného radikálu. Testovaním antibakteriálnej aktivity s použitím kmeňov baktérií *S. aureus* a *E. coli* bolo zistené, že extrakt 3J (*O. sinensis*, *Oryza sativa* L. var. *indica*) je najúčinnším extraktom pre inhibíciu rastu baktérií *E. coli* (250 % RIZD). Na stanovenie chemických zlúčenín v extraktoch 1J–6I bola použitá 1D a 2D NMR spektroskopia, ktorá potvrdila prítomnosť kyseliny olejovej, kyseliny linolovej a močoviny, ako majoritných látok v rôznych pomeroch. V izolovaných extraktoch boli prítomné aj minoritné chemické zlúčeniny a polysacharidy, ktorých chemickú štruktúru sa nám nepodarilo stanoviť. Ako sa ukazuje, práve tieto látky môžu zohrávať dôležitú úlohu pri výslednej antibakteriálnej aktivite extraktov a ich identifikácia môže viesť k objasneniu kvalitatívnych vzťahov medzi štruktúrou a predpokladaným biologickým účinkom.

*Naša vďaka patrí RNDr. Márii Vílkovej, Ph.D. z Laboratória jadrovej magnetickej rezonancie Univerzity Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach za nameranie NMR spektier a Ing. Anne Furmanikovej z Ústavu farmaceutickej chémie, Katedry chémie, biochémie a biofyziky, Univerzity veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach za prípravu extraktov. Podakovanie patrí aj pánovi Martinovi Rajtarovi za poskytnutie vzoriek húb *O. sinensis* a *P. hepiali*. Výskum bol realizovaný aj v súvislosti s riešením projektu VEGA 1/0535/20 a projektu APVV-17-0644.*

Zoznam skratiek

COSY	homonukleárna korelačná spektroskopia (homonuclear correlation spectroscopy)
DEPT	prenos polarizácie z citlivejšieho jadra (¹ H) na menej citlivé (¹³ C) (distortionless enhancement by polarization transfer)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
HMBC	heteronukleárna viacväzbová korelácia (heteronuclear multiple bond correlation)
HSQC	heteronukleárna jednokvantová spektroskopia (heteronuclear single quantum coherence spectroscopy)
I	Indica (<i>Oryza sativa</i> L. var. <i>indica</i>)
IC ₅₀	inhibičná koncentrácia
IZD	priemer inhibičných zón
J	Japonica (<i>Oryza sativa</i> L. var. <i>japonica</i>)
<i>O. sinensis</i>	<i>Ophiocordyceps sinensis</i>
<i>P. hepiali</i>	<i>Paecilomyces hepiali</i>
RIZD	relatívny priemer inhibičnej zóny
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>

LITERATÚRA

- Lumbsch T. H., Huhndorf S. M.: Outline of Ascomycota – 2007. Myconet 13, 1 (2007).
- Winkler D., Yartsa G.: Econ. Bot. 62, 291 (2008).
- Winkler D.: Field Mycol. 11, 60 (2010).
- Chioza A., Ohga S. A.: Adv. Microbiol. 4, 839 (2014).
- Holliday J., Cleaver P., Loomis-Powers M., Patel D.: Int. J. Med. Mushrooms 6, 47 (2004).
- Barseghyan G. S., Holliday J. C., Price T. C., Madison L. M., Wasser S. P.: Int. J. Med. Mushrooms 13, 565 (2011).
- Holliday J., Cleaver M.: Int. J. Med. Mushrooms 10, 219 (2008).
- Ungvarská Maľučká L., Harvanová J., Pavlík M., Rajtar M., Jaroščiak L.: Int. J. Med. Mushrooms 18, 895 (2016).
- Chen P. X., Wang S. N., Nie S. P., Marcone M.: J. Funct. Foods 5, 550 (2013).
- Zhu J. S., Halpern G. M., Jones K.: J. Altern. Complement. Med. 4, 289 (1998).
- Stamets P., Chilton J.: *The Mushroom Cultivator: A Practical Guide to Growing Mushrooms at Home*. Agaricon Press, Olympia, Washington 1983.
- Stamets P.: *Growing Gourmet and Medicinal Mushrooms*.

- oms. Ten Speed Press, Berkeley 2000.
13. Rojas J. J., Ochoa V. J., Ocampo S., Muñoz J. F.: *BMC Complement. Altern. Med.* 6, 2 (2006).
 14. Hu C., Shi J., Quan S., Cui B., Kleessen S., Nikoloski Z., Tohge T., Alexander D., Guo L., Lin H., Wang J., Cui X., Rao J., Luo Q., Zhao X., Fernie A. R., Zhang D.: *Sci. Rep.* 4, 5067 (2014).
 15. Liangli Y.: *J. Agric. Food Chem.* 49, 3452 (2001).
 16. Fagali N., Catalá A.: *Biophys. Chem.* 137, 56 (2008).
 17. Senanayake S. P. J. N., Shahidi F.: *J. Food Lipids* 7, 51 (2000).
 18. Vázquez L., Prados I. M., Reglero G., Carlos F.: *Food Chem.* 229, 28 (2017).
 19. Smith A.: *Acta Crystallogr.* 5, 224 (1952).
 20. Zhang Y., Wu Y. T., Zheng W., Han X. X., Jiang Y. H., Hu P. L., Tang Z. X., Shi L. E.: *J. Funct. Foods* 38, 273 (2017).
 21. Wang L., Liu C. C., Wang Y., Xu H., Su H., Cheng X.: *Curr. Appl. Phys.* 16, 969 (2016).
 22. Olatunji O. J., Tang J., Tola A., Auberon F., Oluwaniyi O., Ouyang Z.: *Fitoterapia* 129, 293 (2018).
 23. Mamta Mehrotra S., Amitabh Kirar V., Vats P., Nandi S. P., Negi P. S. Misra K.: *Indian J. Exp. Biol.* 53, 36 (2015).
 24. Zeng Y., Zhang Y., Zhang L., Cui S., Sun Y.: *Food Sci. Biotechnol.* 24, 1591 (2015).

L. Ungvarská Maľučká^a, A. Uhrinová^a, J. Harvanová^a, E. Tkáčiková^b, and M. Pavlík^c (^a *Department of Chemistry, Biochemistry and Biophysics, University of Veterinary Medicine and Pharmacy in Košice, Slovak Republic*, ^b *Department of Microbiology and Immunology, University of Veterinary Medicine and Pharmacy in Košice, Slovak Republic*, ^c *Department of Integrated Forest and Landscape Protection, Faculty of Forestry, Technical University of Zvolen, Slovak Republic*): **Antioxidant and Antimicrobial Activity of *Ophiocordyceps sinensis* and *Paecilomyces hepiali* Extracts**

The paper deals with the study of two strains of medicinal fungi of the genus *Ophiocordyceps sinensis* and *Paecilomyces hepiali*, which were cultivated on two rice substrates – *Oryza sativa* L. var. *indica* and *Oryza sativa* L. var. *japonica*. For the methanol extracts prepared, the antioxidant activity was determined by the 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl free radical method. Extract (*P. hepiali*, *Oryza sativa* L. var. *japonica*) with $IC_{50} = 5.16 \pm 0.01$ mg ml⁻¹ was the most effective one in scavenging a stable radical. Testing the antibacterial activity against *S. aureus* and *E. coli*, the extract (*O. sinensis*, *Oryza sativa* L. var. *indica*) was found as the most effective to inhibit the growth of *E. coli* bacteria (250 % relative inhibition zone diameter). 1D and 2D NMR spectroscopy was used to identify chemical compounds in the six extracts prepared from two strains of *O. sinensis* and one strain of *P. hepiali*, which confirmed the presence of oleic acid, linoleic acid and urea in various ratios.

Keywords: *Ophiocordyceps sinensis*, *Paecilomyces hepiali*, antioxidant and antimicrobial activity