



# VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

## FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

## ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

# ANALÝZA BETA-GLUKANŮ VE VYBRANÝCH DRUZÍCH HUB

ANALYSIS OF BETA-GLUCANES IN SELECTED SPECIES MUSHROOMS

## DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

## AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Huong Tra Phan

## VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.

BRNO 2018

## Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1151/2017  
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie  
Studentka: **Bc. Huong Tra Phan**  
Studijní program: Chemie pro medicínské aplikace  
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace  
Vedoucí práce: **prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.**  
Akademický rok: 2017/18

### Název diplomové práce:

Analýza beta–glukanů ve vybraných druzích hub

### Zadání diplomové práce:

V rámci práce budou řešeny následující dílčí cíle:

- 1) rešerše zaměřená na beta–glukany a jejich přírodní zdroje, zejména houby
- 2) optimalizace metod analýzy obsahu beta–glukanů v houbách
- 3) stanovení obsahu beta–glukanů ve vybraných druzích hub
- 4) testování stability extraktů s obsahem beta–glukanů v modelovém fyziologickém prostředí
- 5) testování potenciální cytotoxicity a genotoxicity extraktů s obsahem beta–glukanů

### Termín odevzdání diplomové práce: 7.5.2018

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí diplomové práce.

-----  
Bc. Huong Tra Phan  
student(ka)

-----  
prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.  
vedoucí práce

-----  
prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.  
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2018

-----  
prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.  
děkan

## **Abstrakt**

Cílem diplomové práce byla analýza obsahu  $\beta$ -glukanů ve vybraných druzích hub, kde byla rovněž stanovena celková charakterizace složení a obsažených bioaktivních látek.

V teoretické části byla vypracována stručná rešerše o říši *Fungi*, konkrétněji byla práce zaměřená na oddělení hub *Basidiomycota*. V rešerši byla popsána morfologie hub a jejich chemické složení. Poslední část teorie byla věnována analytickým metodám, které byly použity v experimentální kapitole.

V experimentální části byly připraveny extrakty z vybraných druhů hub (houževnatec jedlý, hlíva ústřičná, žampion bílý, žampion hnědý a boltcovitka bezová), které byly použity na charakterizaci vybraných metabolitů, jako jsou polyfenoly, flavonoidy a antioxidační aktivita.

Dále bylo stanoveno množství  $\beta$ -glukanů v houbách. S využitím plynové chromatografie bylo stanoveno množství mastných kyselin a pomocí emisní spektrometrie byly vzorky podrobeny analýze těžkých kovů. Dále byla u extraktů z hub testována cytotoxicita pomocí MTT testu na lidských buňkách. Závěrem byla sledována antimikrobiální aktivita extraktů, proti grampozitivní bakterii *Micrococcus luteus*, gramnegativní bakterii *Serratia marcescens* a kvasince *Candida glabrata*.

Práce poskytla přehled o složení a biologické aktivitě vybraných druhů hub.

## **Abstract**

The main goal of this thesis was to analyse the amount of beta glucans in selected mushroom species. The overall characterization of the composition and content of bioactive compounds in mushrooms was studied too.

The theoretical part was focused on description of *Fungi*, especially the *Basidiomycota* phyla. The overview of fungal morphology and chemical composition was elaborated. Further, theoretical basis of analytical methods used was introduced.

In the experimental part, extracts from selected species of mushrooms (shiitake, oyster mushroom, white champignon, brown champignon and jew's ear) were prepared. Overall group parameters such as polyphenols, flavonoids, antioxidant activity were determined by spectrophotometry. The amount of beta-glucans in the fungi was measured after enzyme hydrolysis using commercial kit. The content and composition of fatty acids was measured by gas spectrometry. Using emission spectrometry (ICP/OES) the presence of heavy metals was analysed in fungal extracts. Cytotoxicity was tested by MTT test on human cell lines. In the last part the antimicrobial activity against Gram-positive bacterium *Micrococcus luteus*, Gram-negative *Serratia marcescens* and yeast *Candida glabrata* was tested.

In the thesis, a complex characterization of composition and biological effect of some mushrooms was given.

## **Klíčová slova:**

Houby, beta-glukany, antimikrobiální aktivita, cytotoxicita, mastné kyseliny

## **Keywords:**

Fungi, beta glucans, antimicrobial activity, cytotoxicity, fatty acids

PHAN, H. T. *Analýza beta-glukanů ve vybraných druzích hub*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2018. 95 s. Vedoucí diplomové práce prof. RNDr. Ivana Márová, CSc..

## PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně citovala. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce FCH VUT.

.....  
podpis studenta

### *Poděkování:*

*Ráda bych zde poděkovala vedoucí mé diplomové práce prof. RNDr. Ivaně Márové, CSc. za cenné rady, trpělivost, vstřícnost a možnost pracovat v jejím týmu. Dále bych také chtěla poděkovat Ing. Daně Byrtusové a Ing. Marii Vysoké za odborné vedení během vypracování diplomové práce, podpory a času, které mi věnovaly. V neposlední řadě patří poděkováním mé rodině a blízkým za podporu a optimismus během celého studia.*

## OBSAH

<b>1</b>	<b>ÚVOD</b>	<b>3</b>
<b>2</b>	<b>TEORETICKÁ ČÁST</b>	<b>4</b>
2.1.	Houby	4
2.2.	Rozdělení říše Fungi	4
2.3.	Morfologie vyšších hub	6
2.3.1	Stélka (talus)	6
2.3.2	Podhoubí (mycelium)	6
2.3.3	Další morfologické části vyšších hub	7
2.4.	Chemické složení hub	7
2.4.1	Sacharidy	7
2.4.2	Bílkoviny	9
2.4.3	Tuky	9
2.4.4	Minerální látky	9
2.5.	Vybrané specifické látky obsažené ve vyšších houbách	9
2.5.1	Vitamíny	9
2.5.2	Enzymy	9
2.6.	Glukany	10
2.6.1	Stavba glukánů	10
2.6.2	Mechanismus působení glukanu v organismu	10
2.6.3	Léčivé účinky beta-glukanů –	12
2.6.4	Negativní účinky vyšších hub	14
2.7.	Vybraní zástupci hub	15
2.7.1	Hlíva ústříčná ( <i>Pleurotus ostreatus</i> )	15
2.7.2	Houževnatec jedlý ( <i>Lentinula edodes</i> , jap. shiitake)	18
2.7.3	Bolťcovitka - ucho Jidášovo (lat. <i>Auricularia auricula-judae</i> , jap. Kikurage)	21
2.7.4	Žampion dvouvýtrusý ( lat. <i>Agaricus bisporus</i> )	23
2.8.	ANALYTICKÉ METODY	25
2.8.1	Spektrofotometrie	25
2.8.2	Plynová chromatografie (GC – FID)	26
2.9.	Využití mikroorganismů k testování antimikrobiální	27

2.9.1	Kultivace mikroorganismů .....	27
2.9.2	Vybrané testovací mikroorganismy .....	28
2.9.3	Antibakteriální stanovení – Agarová difúzní metoda.....	30
2.10.	Stopové prvky v houbách .....	30
2.10.1	Přehled vybraných těžkých kovů přítomných v houbách.....	30
2.10.2	Stanovení těžkých kovů pomocí ICP- OES (emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem) .....	31
2.11	Testování toxicity a cytotoxicity .....	32
<b>3</b>	<b>CÍL PRÁCE.....</b>	<b>33</b>
<b>4</b>	<b>EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....</b>	<b>34</b>
4.1.	Chemikálie, použité přístroje a materiál .....	34
4.1.1	Chemikálie.....	34
4.1.2	Plyny.....	35
4.1.3	Standardy .....	35
4.1.4	Přístroje.....	35
4.1.5	Buněčné linie .....	35
4.1.6	Materiál.....	36
4.2.	Příprava materiálů - sušení .....	39
4.3.	Příprava vzorků .....	39
4.4.	Stanovení $\alpha$ -glukanů, $\beta$ -glukanů a celkových glukanů .....	40
4.4.1	Obsah kitu.....	41
4.4.2	Příprava pomocných roztoků a úpravy části kitu .....	42
4.4.3	Solubilizace a částečná hydrolýza celkových glukanů ( $\alpha$ -glukan, $\beta$ -glukan, D-glukózy v oligosacharidech, sacharóze a volná D-glukóza) .....	42
4.4.4	Solubilizace a hydrolýza $\alpha$ - glukanů_(D-glukózy z sacharózy a volné D-glukózy) .....	43
4.5.	Stanovení polyfenolů.....	44
4.6.	Stanovení flavonoidů.....	44
4.7.	Stanovení antioxidační aktivity .....	45
4.8.	Stanovení redukujících sacharidů podle Somogyiho – Nelsona .....	46
4.9.	Plynová chromatografie – stanovení mastných kyselin .....	46
4.9.1	Transesterifikace lipidů .....	46
4.9.2	Stanovení mastných kyselin pomocí plynové chromatografie s plamenově ionizačním detektorem (GC – FID).....	47

4.10 Stanovení proteinů dle Hartree-Lowryho.....	48
4.11 Cytotoxický test.....	48
4.11.1 Počítání buněk .....	48
4.11.2 MTT test .....	48
4.12 Stanovení těžkých kovů pomocí ICP - OES – emisní spektrometrie s vázaným indukčním plazmatem .....	51
4.12.1 Příprava vzorků .....	51
4.12.2 Stanovení těžkých prvků .....	52
4.13 Kultivace organismů.....	52
4.13.1 Příprava vzorků na stanovení antibakteriální antimikrobiální aktivity .....	53
4.13.2 Příprava média pro <i>Micrococcus luteus</i> a <i>Serratia marcescens</i> .....	53
4.13.3 Příprava média pro <i>Candida glabrata</i> .....	53
4.13.4 Agarová difúzní metoda .....	53
<b>5 VÝSLEDKY A DISKUSE .....</b>	<b>54</b>
5.1. Příprava materiálů – sušení .....	54
5.2. Stanovení $\alpha$ -glukanů, $\beta$ -glukanů a celkových glukanů .....	54
5.3. Polyfenoly .....	57
5.4. Flavanoidy .....	59
5.5. Stanovení redukujících cukrů dle Somogyi – Nelsona .....	60
5.6. Antioxidační aktivita .....	61
5.7. Stanovení mastných kyselin pomocí GC-FID (plynová chromatografie s plamenově ionizačním detektorem).....	62
5.8. Stanovení celkových proteinů .....	69
5.9. Antimikrobiální testy.....	70
5.9.1 Testy na kmeni <i>Micrococcus luteus</i> .....	70
5.9.2 Testy na kmeni <i>Serratia marcescens</i> .....	71
5.9.3 Kmen <i>Candida glabrata</i> .....	72
5.10 MTT test .....	73
5.11 ICP-OES.....	78
<b>6 ZÁVĚR .....</b>	<b>79</b>
<b>7 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ .....</b>	<b>81</b>
<b>8 SEZNAM ZKRATEK.....</b>	<b>86</b>
<b>9 PŘÍLOHY .....</b>	<b>87</b>
Příloha 1 : Kalibrační křivky .....	87

# 1 ÚVOD

Houby (*Fungi*) představují nedílnou součást naší živé přírody. Pěstování hub je v posledních desetiletích jedním z důležitých odvětví zemědělské výroby, a také i houbaření patří mezi nejoblíbenější koníčky v České republice. Díky dlouhodobým zkušenostem houbaření a novým biologickým poznatkům dokážeme rozeznat jedlé a jedovaté zástupce hub.

Lidé už od pradávna konzumovali houby nejen jako potravinu, ale dokázali je využít k léčivým účinkům. První zmínky sahají do doby starých Egyptů 3 000 př. n. l., kdy považovali tuto potravinu za „elixír života“. V jiném případě byly sušené houby nalezeny u mumie „ledového muže“ Ötziho, staré 5 000 let [2].

Houby se řadily ve starších systémech mezi nižší rostliny, v posledních desetiletích houby tvoří samostatnou říši, která stojí mezi rostlinami a živočichy. Zástupce této říše nalezneme po celé Zemi a některé druhy jsou velmi vzácné pro naši civilizaci. V současné době je známo 130 000 druhů a vědci se domnívají, že toto číslo není konečné.

Tato říše je vzácná díky svým účinkům na ekosystém. V přírodě se podílí na rozkladu organické hmoty na anorganické sloučeniny, humifikuje půdu, kde vytváří humusové látky. Pro biotechnologické využití jsou to zejména nižší houby (kvasinky – výroba piva, vína), výroba antibiotik (např. penicilin). Vyšší houby jsou součástí potravin, doplňků stravy a léčiv. Houby jsou nejstudovanějším předmětem v Asii. První poznatky o houbách pocházejí z asijských zemí. U nás v Evropě se zájem projevil v druhé polovině 20. století. Produkce hub se ročně pohybuje okolo 5 milionů tun. Na prvním místě je produkce žampionů (40%) a na druhém hlíva ústříčná (25%). Mezi největší producenty patří Čína a USA.

Houby jsou nedílnou součástí fytotherapie (léčení pomocí rostlinných extraktů a tinktur). V posledních letech začíná být více populární zdravý životní styl. Lidé jedí superpotraviny (komerční název pro potraviny, které mají vyšší koncentraci obsahových látek, které prospívají lidskému zdraví), načež i houby patří do této kategorie. V nynější době je více preferována prevence a léčba pomocí rostlinných extraktů nebo doplňky z hub než použití „chemických sloučenin“.

Houby jsou bohaté na obsahové bioaktivní látky. Obsahují jak bílkoviny, sacharidy, vlákninu, vitamíny, minerální látky a mastné kyseliny. Specifické sacharidy v houbách se nazývají glukany, které jsou složeny z glukozových jednotek. Existují několik forem glukanů:  $\beta$ -(1, 3)-D-,  $\beta$ -(1, 6)-D-,  $\alpha$ -(1, 3)-D-glukany. Nejúčinnější jsou  $\beta$ -(1, 3)-D-glukany. Tyto houbové glukany jsou modifikátory biologické reakce a dokáží pomoci lidskému zdraví adaptovat se na různé nepříznivé podmínky prostředí. Díky těmto poznatkům jsou glukany oblíbeným cílem studie imunitního systému.

Předložená práce je zaměřena na studium vybraných aktivních látek v houbách a na testování jejich biologických účinků.



## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Houby

Houby latinsky *Fungi* jsou početnou různorodou skupinou, patří mezi eukaryotické organismy. Nyní tvoří samostatnou říši, ale dříve tyto organismy spadaly pod říši nižších rostlin. V dnešní době je popsáno okolo 120 000 druhů hub, ale předpokládá se, že jejich počet může být až desetinásobně vyšší.

Jako eukaryotické organismy mají houby pravá buněčná jádra, jsou heterotrofní, to znamená, že se živí organickými látkami [1]. Organické složky se rozkládají vně stélky hydrolytickými enzymy, které jsou vylučovány do okolí a štěpí tak substrát na menší části, které jsou následně absorbovány dovnitř do houbové stélky. Pomocí různých typů výživy se pak charakterizuje tvar stélky a také závislost hub na vlhkosti vnějšího prostředí [2].

Morfologicky mají jednoduchou stavbu. Jsou tvořeny z vláken, tzv. hyf, které jsou propojené a rozvětvené, kde následně vytvoří podhoubí (mycelium).

Rozdíl mezi říši hub a říši rostlin spočívá v tom, že neobsahují chlorofyl a nejsou schopné využívat energii slunečního záření.

### 2.2 Rozdělení říše Fungi

Díky rozvoji molekulárních, biochemických a genetických metod je tato říše podrobněji rozdělena do konkrétních oddělení, např. Mikrosporidie se řadilo prvotně mezi prvoky [3]:

- oddělení: Mikrosporidie (*Microsporidiomycota*)  
jednobuněční, nemyceliální zástupci. Mikrosporidie jsou intracelulární paraziti organel živočichů a prvoků [3]. Pro člověka znamenají hlavně nebezpečí v odvětví hospodářském. Jsou např. významným původcem včelí úplavice, způsobené hmyzomorkou včelí, která způsobuje úhyn včel [4].
- oddělení: Chytridiomycety (*Chytridiomycota*) – patří sem mikroskopické primitivní houby, které se snadno adaptují ke všem životním podmínkám. Jsou to převážně mikroskopické organismy, hlavně parazité a saprotrofové. Tvoří trubicovité mycelium [5]. Stěny podhoubí a výtrusů jsou tvořeny chitinem a glukany. Chytridiomycety jsou paraziti kulturních i planých rostlin, kteří přežívají ve vodě, nebo ve vlhké půdě. Zástupcem je například lahvičkovka zelná (*Olpidium brassicae*), která parazituje v buňkách rostlin kapusty, zelí a způsobuje jejich padání. Chytridiomycety dokáží přežít v půdě až 10 let [4].
- oddělení: Houby spájkivé (*Zygomycota*) – plísně, které vytvářejí mnohojaderné, trubicovité podhoubí. Ve stáří se časem jejich podhoubí přeměňuje na nepravidelné přihrádkové mycelium. Plísně se živí saprofytický nebo i parazitický. Jsou nedílnou složkou půdní mikrobioty, kde plní funkci rozkladu organické hmoty [6]. Jedním ze zástupců je například kropidlovec černavý (*Rhizopus nigricans*), který parazituje na chlebu. Dokážou způsobovat nemoci, jako jsou mykózy a hniloby [4]. Některé druhy se mohou uplatnit i v biotechnologii. Využívají se k produkci různých

organických sloučenin, jako jsou kyselina mléčná, fumarová, citrónová. Nebo se dají také využít při testování komplexu vitamínu B [7].

- oddělení: Houby vřeckovýtrusé (*Ascomycota*) – jsou jedno- i mnohobuněčné organismy s článkovaným myceliem. Typickým znakem pro pohlavní rozmnožování je vznik vřecek (asci), které se tvoří v plodnicích. Vřečka následně vyprodukuje výtrusy (askospory) [2]. Askospory většinou vytvoří do dvojího tvaru (kulovité). Dalším typickým mikroskopickým znakem je tvorba jednoduchých pórů v přehrádkách hyf [8]. *Ascomycota* tvoří asi 60% všech známých hub, jedná se o nejpočetnější skupinu [8]. Mezi ně patří biotechnologicky významná skupina, jako jsou kvasinky *Saccharomyces*. Kvasinky jsou jednobuněčné houby, které se rozmnožují nepohlavně pučením, kde se vytvoří „řetízky“ – nepravá podhoubí (*pseudomycelia*) [9]. Významným zástupcem je kvasinka pивní (*Sacharomyces cerevisiae*), kvasinka se především používá při výrobě lihu, ke kvašení sladiny, nebo také v lékařství. Má schopnost produkovat enzymy a vitamíny skupiny B [10]. Dalším významným zástupcem je kvasinka vinná, ta je volně přítomna v přírodě, způsobuje zkvašování ovocných šťáv [9]. Důležitou skupinu, která stojí za zmínku je pododdělení *Pezizomycotina*. Sem patří rod *Penicillium* – štětičkovec. Zástupci tohoto rodu jsou nám v běžném životě známé. Patří sem *Penicillium notatum*, který produkuje antibiotika, která jsou pomocí biotechnologických metod vyizolována. V potravinářství využíváme *Penicillium camembertii*, díky níž zrají sýry [10]. Mezi vřeckovýtrusé také patří paličkovice nachová, která má významnou roli v lékařství, její *sklerocium* (námel) je zdrojem alkaloidů. Alkaloidy fungují jako látky tlumící bolest např. v porodnictví [10].
- oddělení: Houby stopkovýtrusé (*Basidiomycota*) – podle vývoje se jedná o nejvyšší třídu hub. Doposud známe okolo 30 000 druhů. Mohou být jednobuněčné (kvasinky př. *Rhodotorula*) nebo mnohobuněčné. Stopkovýtrusé vyšší houby mají makroskopické plodnice [4]. Jejich mycelium je většinou dvoujaderné. Při vhodných podmínkách vytváří kyjovité bazidie (vyvábějí se v buňkách), které charakterizuje základní společný znak stopkovýtrusých hub. Na nich následně se vytvářejí výtrusy (bazidiospory), výtrusy, které jsou navázané na koncích kyjovitě zhuštělých hyf. Do této třídy patří zejména houby s léčivým účinkem. Mezi *Basidiomycota* patří řady jako lupenotvorné (*Agaricales*) – patří sem většina pěstovaných hub, např. hlíva ústříčná, houževnatec nebo žampion. Dále sem patří řady jako hřibovité (*Boletales*), které jsou typickými se sbíranými houbami [2]. Buněčná stěna *Basidiomycota* obsahuje hlavně polyglukany a chitin [4]. *Basidiomycota* přijímají potravu jako saprofyti, živí se odumřelými zbytky rostlin nebo přímo z půdy, často tvoří symbiózu s kořeny zelených rostlin [11].

V této diplomové práci se hlavně budu zabývat houbami z oddělení *Basidiomycota* – vyššími houbami.

## 2.3 Morfologie vyšších hub

### 2.3.1 Stélka (talus)

Stélka je tvořena protáhlými různě větvenými vlákny, které se nazývají hyfy. Stěny hyf bývají velmi tenké a jednoduše přijímají živné látky celým svým povrchem. Po rozvětvení hyf, které se postupně zaplétají, vzniká podhoubí (mycelium) [6]. Základní stavba houby je hlavně podhoubí, které může přežít až desítky let, mohou se rozmnožovat bez vzniku plodnic (ty vyrostou až za příznivých podmínek) [12].

### 2.3.2 Podhoubí (mycelium)

Mycelium tvoří vegetativní tělo houby. Jak bylo zmíněno – za vhodných podmínek se může rozrůstat do substrátu a tvořit následně plodnice. Plodnice mohou mít různé tvary [1]. Mikroskopická stavba plodnic se skládá z tenkých vláken, které jsou přerušované přehrádkami. Přehrádky oddělují jednotlivé buňky mezi sebou, které tvoří postupně vlákénka. Pokud jsou vlákénka nahlučené a propletené, tak se jedná o sekundární podhoubí, které následně vytvoří pevné útvary. Primární podhoubí tvoří pouze jemné síťové mycelium [13].

#### 2.3.2.1 Plodnice

Plodnice je orgán, který slouží pro rozmnožování hub, zde se tvoří výtrusy, díky nimž se houby rozmnožují [13]. Jedná se o generativní část houby, která je produktem rozrůstání mycelia v substrátu. Plodnice mohou mít různé tvary, ale společným znakem je jejich výtrusné rouško (hymenium), kde se ukládají výtrusy. Výtrusy se mohou nacházet jak z vnitřní, tak i z vnější strany [1]. Plodnice se dělí na klobouk a třeň. Klobouk patří mezi hlavní část plodnice. Může mít spoustu různých tvarů jako kulovitý, klenutý, plochý, nálevkovitý. Klobouky mohou mít různé barvy díky, kolik slunečního tepla přijmou [13].



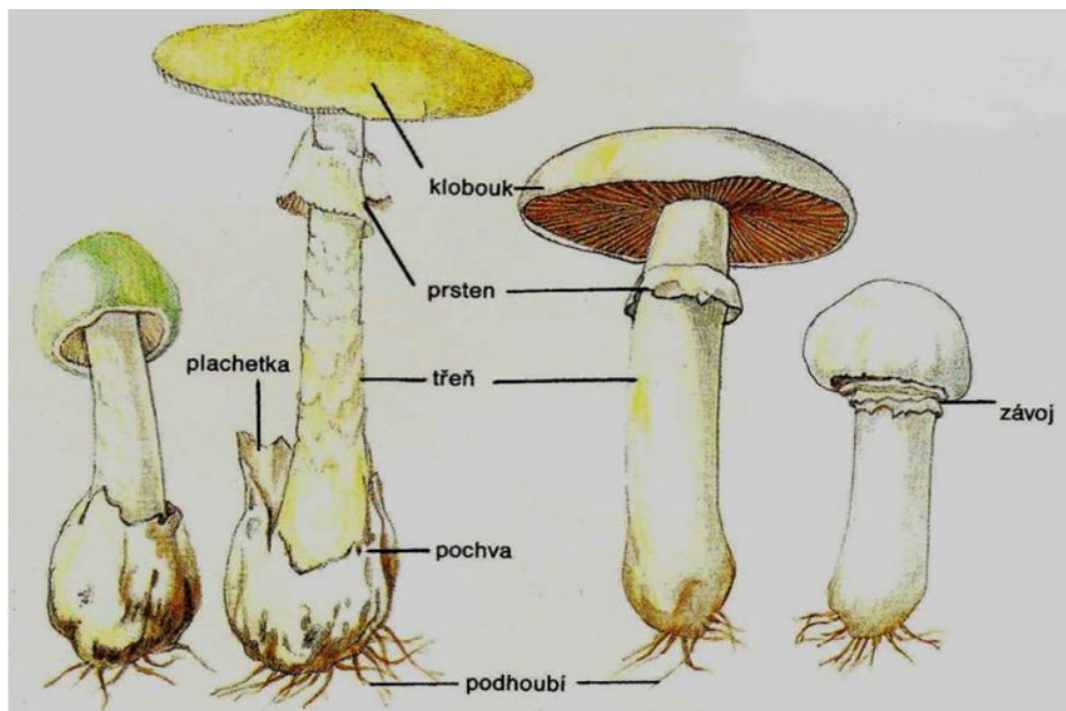
Obrázek 1 Tvary klobouků [1]

Další nepostradatelnou částí je třeň (noha), která nese klobouk. Třeň dělíme na středový, výstředný a boční. Třeň může být vnitřně dutý, plný nebo obsahovat dutiny. Povrch třene může být šupinkovitý, hladký nebo síťkovitý [6].

### 2.3.3 Další morfologické části vyšších hub

Plachetka – jedná se o „kapsu“, ve které houba rostla během vývoje. Celková plachetka pokrývá v mládí celou plodnici. Během vývoje se plachetka roztrhne a na klobouku zanechává pouze zbytky [6].

Prsten - pozůstatek po obalu, který ochraňoval plodnici v zemi.



Obrázek 2 Stavba těla vyšších hub [1]

## 2.4 Chemické složení hub

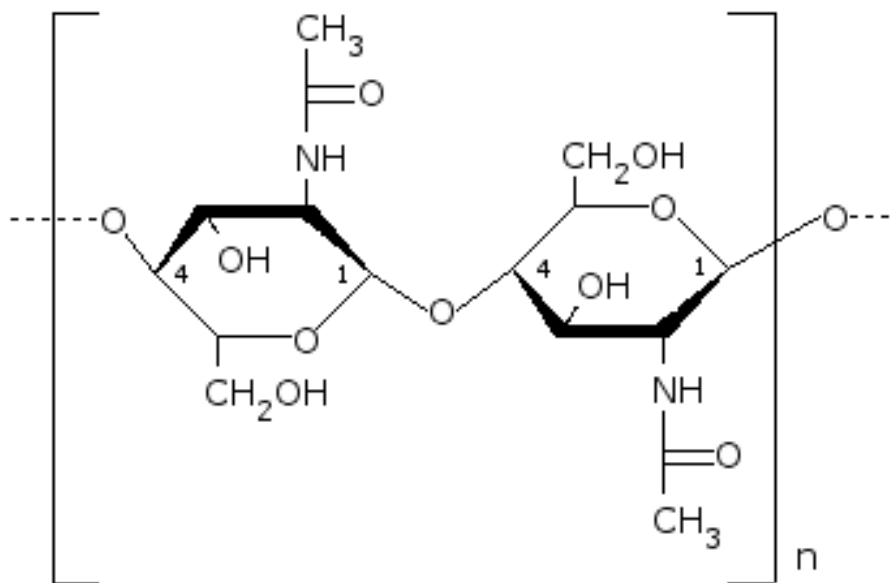
Houby v potravinářském průmyslu patří mezi zeleninu. Často se houby označovaly jako „maso chudých“, protože byly volně dostupné v přírodě [2]. Houby patří mezi ideální součást lidské potravy. Obsahují cenné zdroje bílkovin, minerálních látek, a naopak obsahují málo sacharidů a tuků. Energetická hodnota např. u 100 g samotné hlívy ústřední, představuje pouze 1 400 kJ, takže hodnota říká, že houby jsou nízkoenergetickou potravou [2]. Obsah vody v houbách tvoří okolo 75 – 94 % celkové hmotnosti [3].

### 2.4.1 Sacharidy

Obsah sacharidů může tvořit 6 % hmotnosti sušiny. Jedná se především o rezervní cukry. Sacharidy se vyskytují převážně ve formě oligo- a polysacharidů obsažených v cytoplazmě. Mezi důležité zástupce sacharidů patří trehalóza, neredukující disacharid, který se podílí na stavbě buněčné stěny společně s chitinem a je stabilizátorem buněčné membrány [2]. Dále mezi nezbytnými zástupci cukrů jsou glukany, galaktany, mannany a rozpustné cukry. Uvnitř buněk tvoří zásobní látku glykogen [2].

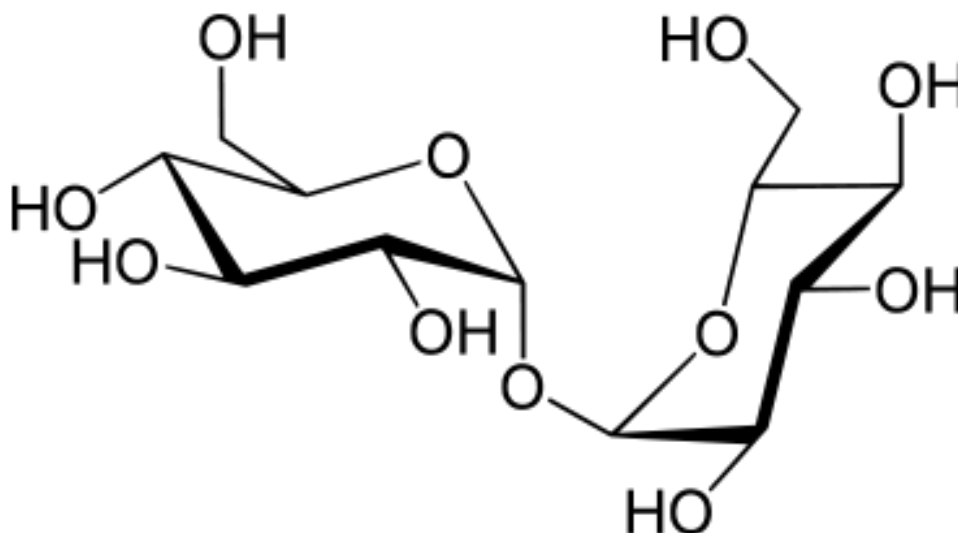
Chitin – lineární kopolymer, který se skládá N-acetyl- $\beta$ -D-glukosaminu (70 – 90 %) a  $\beta$ -D-glukosaminu (10 – 30 %), který je spojován  $\beta$ -1,4-glykosidovou vazbou. Jedná se o společný znak vyšších hub, který se vyskytuje v buněčné stěně. Chitin je také stavební látkou schránek korýšů, hmyzu. Najdeme ho rovněž v kvasinkách, řasách a bakteriích [9].

Díky vysokému množství chitinu u některých vyšších hub mohou způsobovat jejich těžší stravitelnost pro lidský organismus. Ale také na druhou stranu, dokážou podporovat střevní peristaltiku a přispívat k lepšímu trávení. Obsah chitinu v sušině je kolem 7 % [14].



Obrázek 3 Chemická struktura chitinu [14]

Trehalóza – u některých hub se vyskytuje jako zásobní disacharid. Tento se vyskytuje pouze v počátečním vývoji houby, kde postupem času následně mizí [10]. Trehalózu štěpí enzym zvaný trehaláza. Enzym je přítomný v lidských střevech, kde usnadňuje trávení hub v těle. Někteří jedinci mají problém s tvorbou trehalázy, tudíž nemohou trávit houbové pokrmu a následně na ně vzniká alergická reakce [15].



Obrázek 4 Chemická struktura trehalóza [15]

### **2.4.2 Bílkoviny**

Základním stavebním kamenem živého organismu jsou bílkoviny. Ty se skládají z aminokyselin. Je známo, že celkový počet základních aminokyselin tvořící bílkoviny lidského organismu je dvacet. Jedenáct z nich umí naše tělo vytvořit samo, zbylé aminokyseliny potřebujeme získat v potravě (tzv. esenciální aminokyseliny). V houbách nalezneme až deset potřebných aminokyselin jako lysin, leucin, prolin, asparagin, glutamin a další. Volné aminokyseliny dokážou ovlivnit chuť houby [2]. Obsah bílkovin v sušině je v rozmezí 8 – 36 %, záleží na stáří a druhu houby [16].

### **2.4.3 Tuky**

Množství tuků v houbách je zanedbatelné. Liší se od druhu a na podmínkách, kde se houba vyskytuje. Patří sem zastoupení glykolipidů, fosfolipidů, steroidů. Hlavním místem výskytu je v buněčná membrána, kde plní ochrannou a zásobní funkci [2].

Obsah lipidů v sušině je v rozmezí 1-3 %. Díky nízkému obsahu tuků patří houby mezi nízkoenergetické potraviny, které jsou vhodné hubnutí [1].

Fosfolipidy mají vliv na funkci jaterních buněk. Zajišťují správnou činnost jater a zvyšují detoxikační činnost. Dokáží opravit poškozené buňky buněčné membrány [2].

### **2.4.4 Minerální látky**

Výskyt minerálních látek v houbách je bohatý. Obsah minerálních látek závisí na podmínkách a charakteru půdy. Nejvíce zastoupen je draslík, dusík, fosfor, síra, hořčík a také selen, kterého může být v houbách až 100x více než v zelených rostlinách [2]. Obsah minerálních látek stoupá se stářím houby, nejvíce množství draslíku mají např. lanýže (*Tuber*). Houby mají negativní schopnost vstřebávat jedovaté, škodlivé látky jako rtuť, arsen, kadmium [2]. Hladina toxických prvků může dosáhnout několikanásobně vyšší než je koncentrace v půdě.

## **2.5 Vybrané specifické látky obsažené ve vyšších houbách**

Houby obsahují řadu specifických látek, které mají léčivý účinek. Některé specifické látky slouží jako primární (enzymy) nebo sekundární (vitamíny) metabolity [2].

### **2.5.1 Vitamíny**

Houby patří mezi významný zdroj vitaminů jako B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>3</sub>, B<sub>5</sub>, B<sub>6</sub>, také i vitamín A, D [1]. U některých hub je i přítomný β-karoten. Rostlinný steroid, ergosterol, kterým je provitaminem D, se podílí na tvorbě buněčné membrány a je také jejich součástí. Zajímavý je hlavně tím, že dokáže být zachován i po usušení, což souvisí s jeho lipofilním charakterem. Vitamín B<sub>9</sub> je nezbytný pro tvorbu nukleových kyselin a krvetvorbu [2].

### **2.5.2 Enzymy**

Vyskytují se v houbách hojně. Dokáží v malém množství urychlit průběh určité biochemické reakce v těle. Mezi zástupce patří superoxidodismutáza, která je významným ochranným činitelem před volnými radikály. Spolu s peroxidázou a katalázou účinně rozkládá kancerogenní peroxid vodíku. Obecně zvyšují antioxidační aktivitu která je účinná při léčbě rakoviny nebo kardiovaskulárních chorob. Největší obsah enzymů najdeme např. u outkovky

pestré (*Trametes versicolor*), lesklokorky lesklé (*Ganoderma lucidum*), trsnatce lupenitého (*Grifola frondosa*) [2].

## 2.6 Glukany

Patří mezi nejvýznamnější obsahové látky vyskytující se ve vyšších houbách, které mají léčivé účinky. Řadí se mezi sacharidy, které jsou složeny z jednotek glukózy [2]. Glukany můžeme také najít u pivovarských, pekařských kvasnic, v obilí. Tyto sacharidy jsou v dnešní době velmi oblíbeným tématem ve výzkumu, jelikož jsou silným antioxidantem, který by mohl mít uplatnění v lékařství. Glukany slouží jako zásobní polysacharid hub [17].

Tabulka 1 Konkrétní názvy glukanu u vybraných hub [1]

Název glukanu	Latinský název	Český název	Stupeň větvení
zymosan	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	kvasinka pивní	0,03-0,2
lentinan	<i>Lentinus edodes</i>	houževnatec jedlý ( <i>shii-také</i> )	0,23-0,33
HA (pleuran)	<i>Pleurotus ostreatus</i>	hlíva ústříčná	0,25
AM-ASN	<i>Amanita muscaria</i>	muchomůrka červená	0,3
grifolan	<i>Grifola frondosa</i>	trsnatec lupenitý	0,33
beta-glukan I	<i>Auricularia auricula-judae</i>	boltočovitka bezová (ucho jidášovo)	0,75

### 2.6.1 Stavba glukanu

Glukany se rozdělují podle místa glykosidické vazby. Jsou to silně větvené makromolekuly. Stavební jednotkou je cyklická D-glukosa, která je vázaná do formy  $\beta$ . U vyšších hub vytváří vazbu v místech 1, 3 a 1, 6. Konkrétně ve vyšších houbách jsou to  $\beta$ -(1, 3)-D-glukany,  $\beta$ -(1, 6)- D-glukany a  $\alpha$ -(1, 3)-D-glukany [2]. Nejaktivnější formou glukanu jsou  $\beta$ -(1, 3)-D-glukany, které se nachází v postranním řetězci v pozicích 1, 6 a dále se rozvětvují z hlavního  $\beta$ -1, 3- glukanového řetězce. Terciální strukturu stabilizují vodíkové můstky [17]. Glukany mají v oblibě se větvit do postranních řetězců, díky nimž získávají vysokou biologickou aktivitu. Nejvyšší biologickou aktivitu vykazují glukany se stupněm větvení v intervalu 0,20 až 0,33 [17]. Také díky své konformaci ve tvaru šroubovice se zvyšuje biologická aktivita. Tyto šroubovice buď mají jednoduchý, polysacharidový řetězec nebo tři řetězce spojené vodíkovými můstky („triple helix“). Biologická aktivita je schopnost neutralizovat volné radikály, které škodí lidskému organismu [17].

$\beta$ -glukany se vyskytují pouze v malém množství u vyšších hub oproti kvasinkám [15].

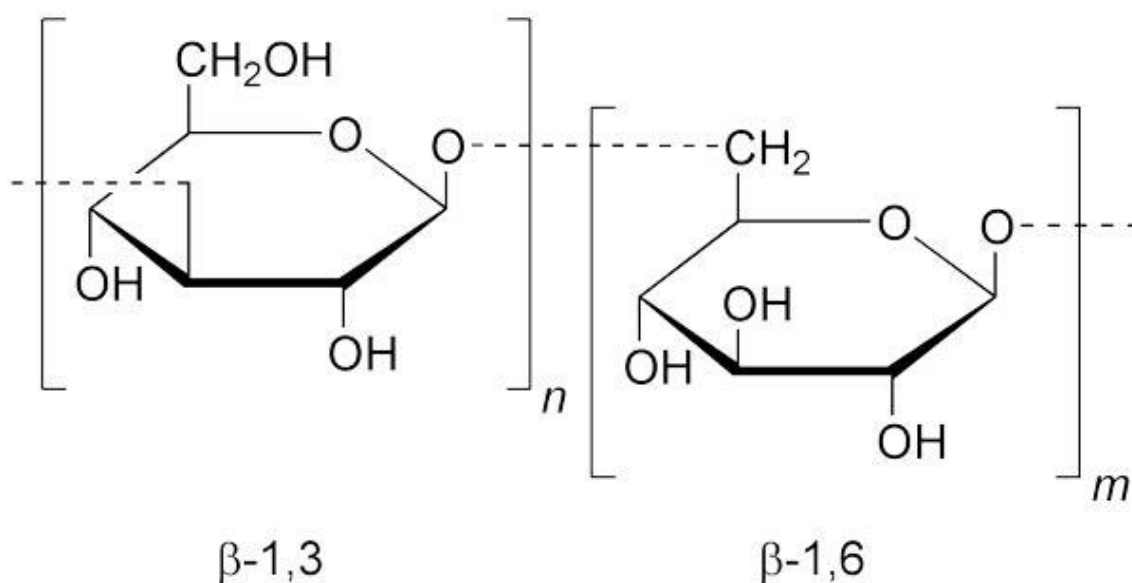
### 2.6.2 Mechanismus působení glukanu v organismu

Glukany podporují systémy jako imunitní, nervový, hormonální. Úplný princip působení  $\beta$ -glukanu není doposud ještě zcela objasněný. Pravděpodobně glukany fungují na bázi interakce se specifickými glukano-pyraseonovými receptory na leukocytech [1].

Konkrétně napomáhají činnosti fagocytózy a zesilují proliferativní aktivitu fagocytujících buněk (granulocyty, monocyty, makrofágy, dendritické buňky). Makrofágy patří mezi efektorové buňky, které sehrávají funkci obrany organismu proti bakteriím a virům [18].

Princip fungování makrofágu spočívá v tom, že na jejich povrchu existují vzory, které dokáží rozeznat konzervované mikrobiální struktury, tzv. PAMPs (Pathogen Associated Molecular Patterns), do které beta-glukany patří. Pomocí receptoru TLR-2 (toll-like receptor 2), lactosylceramidu, CR3 (complement receptor type 3), které jsou přítomné na povrchu makrofágů, dokáží rozpoznat beta-glukan. Podle dosavadního výzkumu receptor CR3 patří mezi nejdůležitější pro rozpoznání beta-glukanů [18].

Receptor CR3 je dvouřetězová molekula, která nese několik biologických domén. Beta-glukan se váže na lektinové místo (sacharidové). Po navázání se aktivuje fagocytóza. Glukanová aktivace je složena z několika procesů tzv. chemokineze (neřízený pohyb buněk); chemotaxe (řízený pohyb na chemický podnět); postupné postupování makrofágů k cizorodým částicím, dále degranulace a další prostup do tkání. Po době stimulace nastane sekrece primárních a sekundárních cytokinů a aktivace T a B lymfocytů (imunocyty). Mezi nejdůležitější zástupce lymfocytů patří Th1 a Th2. Th1 je odpovědná za imunitu vůči intracelulárním parazitům a Th2 udržuje imunitu extracelulární. Pokud nastane přerušení rovnováhy mezi lymfocyty, dochází k autoimunitním reakcím [19]. Makrofágy, které jsou aktivované, postupně likvidují zárodky, které vyvolávají jejich aktivaci a také potom začnou ničit cizorodé částice [18].

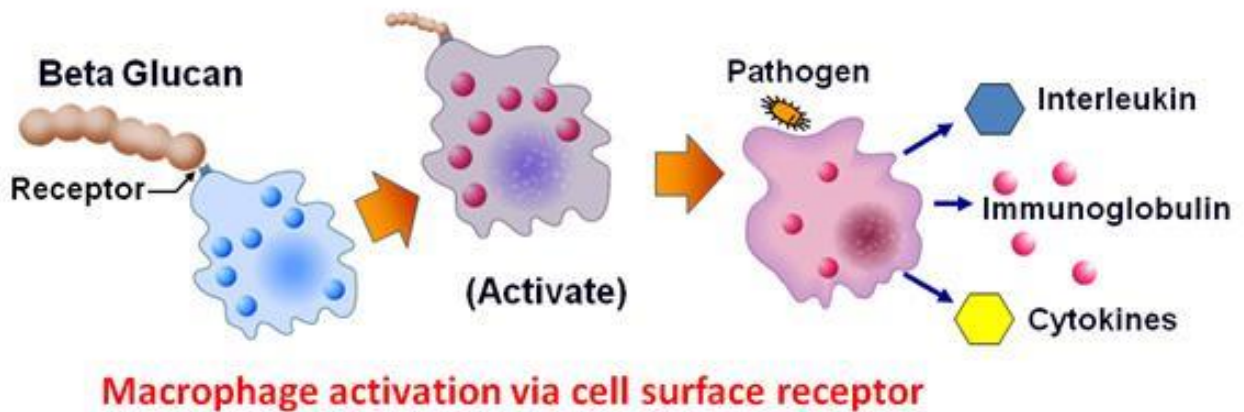


Obrázek 5 Chemická struktura  $\beta$ -glukanu [17]

Beta-glukan dokáže fungovat nejen jako stimulátor imunocytů, ale také dokáže regulovat jejich počet. Stimuluje produkci prekurzorových buněk, z kostní dřeně, zejména to jsou hematopoetické kmenové buňky. Například při stresových situacích organismus ztrácí imunocyty a klesá obranyschopnost. Díky beta-glukanu vznikne větší počet nově vytvořených imunocytů v krevním oběhu a v dalších orgánech, díky tomu má organismus dohled nad imunitou. Glukany plní roli jak v nespecifické, tak specifické imunitě. Využití specifické imunity dochází během aktivace makrofágy a při nespecifické imunitě je využívána produkce imunocytů [18].



Člověk přijímá  $\beta$ -glukany hlavně v potravě. Glukany jsou odolné vůči různým typům enzymům.  $\beta$ -1,3-glukan je odolný vůči kyselému prostředí žaludku, po perorální aplikaci dochází k postupnému prostupu do orgánu až k dvanáctníku [20].



Obrázek 6 Aktivace makrofága beta-glukanem [21]

### 2.6.3 Léčivé účinky beta-glukanů

Účinky glukanů jsou rozsáhlé. Jsou silným antioxidantem, mají imunomodulační účinky, slouží jako prevence proti kardiovaskulárním onemocněním, podporují růst kožních buněk. Glukany se využívají dokonce u veterinářů, v zemědělství, nebo v kosmetice.

#### 2.6.3.1 Využití beta-glukanů v protinádorové terapii

Rakovina je onemocnění, při kterém se nekontrolovatelně rozmnožují buňky, které vznikly porušeným dělením nebo diferenciací. Důsledkem vzniku může být z hlediska fyzikálního např. ionizující záření, chemického – tabákový kouř nebo z biologického zapříčinění např. produkty plísní. Tyto faktory patří mezi externí karcinogeny, dále mezi externí faktory patří onkogenní viry. Mezi interní faktory patří například genetické mutace [21].

Glukany napomáhají v léčbě rakoviny díky aktivaci a zvýšení počtu imunocytů, zejména makrofágů. Ty jsou pak schopné rozpoznat a zničit rakovinné buňky. U *lentinanu*, *pleuranu* byla právě zaznamenána vysoká hodnota protinádorové aktivity [21].

Při léčbě rakoviny vznikají vedlejší účinky, hlavně u ozařování a chemoterapie. Tyto faktory glukany dokážou snížit, a to díky vytvořeným novým buňkám, které posilují imunitní systém a chrání před infekčním onemocněním. Konzumace extraktů z hub napomáhá prevenci proti karcinogenním onemocněním [19].

Hlavní studie o léčení rakoviny pomocí glukanů pochází z Japonska, kde se podávají pravidelně výluhy z houževnatce jedlého pacientům, kteří se léčí s rakovinou.

#### 2.6.3.2 Infekce

Účinky proti infekci patří mezi první vlastnosti, které byly sledovány u glukanů. U několika studií bylo potvrzeno, že glukany stimulují imunitní systém po infekci viry, bakteriemi. Můžeme potom snížit dávku podaných antibiotik nebo antivirotik a přitom se zvyšuje účinek antimikrobiální léčby [22].

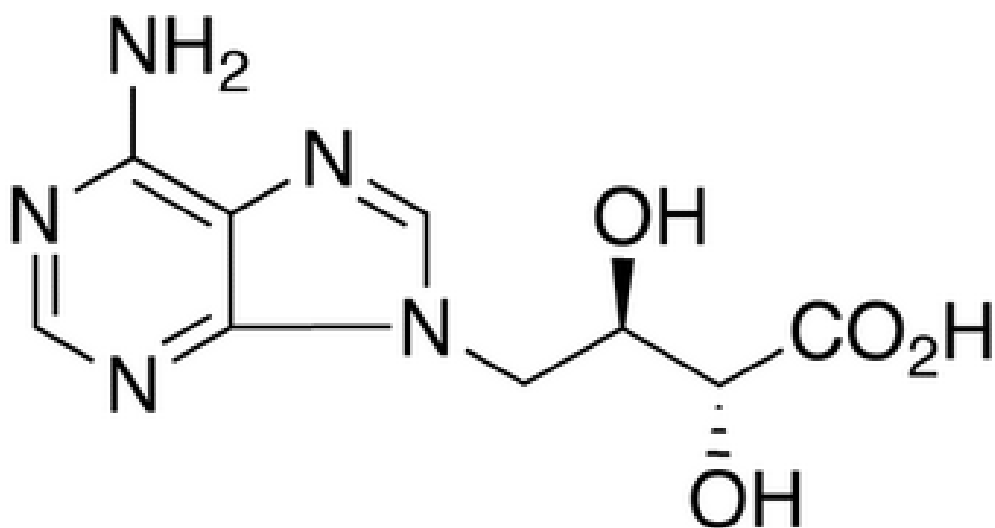
Studie zatím jen proběhly na bázi klinických zkoušek u zvířat, kdy se jednalo o infekce jako viry *Herpes simplex*, myší hepatitida [1].

### 2.6.3.3 Zvýšená hladina cholesterolu

Zvýšená hladina cholesterolu je velkým problémem pro náš organismus, je to problém poměrně rozsáhlý a nejednoznačný. Má vliv na kardiovaskulární onemocnění. Řada hub obsahuje látky, které ovlivňují hladinu cholesterolu. Jde například o lovastatin, který je obsažen v plodnicích hlívy ústříčné [2]. Mechanismus není zcela objasněný, ale účinek se vysvětluje tím, že  $\beta$ -glukany vytvoří v tenkém střevě viskózní vrstvu, která snižuje absorpci žlučových kyselin. Žlučové kyseliny jsou produktem odbourání cholesterolu [21].

Beta-glukany snižují hladinu cholesterolu, tuku a cukru v krvi, aniž by se snížilo množství inzulínu, jsou vhodné pro diabetiky. Vysokou hladinu cholesterolu snižuje i purinový alkaloid eritadenin, který je zastoupený v boltcovitce bezové, lesklokorce lesklé, žampionu brazilském [2].

Cholesterol patří mezi organické látky, který se u teplokrevných živočichů vyskytuje v játrech, žlučníku, v nadledvinkách a ovlivňuje metabolismus tuků. V buňce je syntetizován cholesterol v izoprenoidní dráze a je regulován pomocí specifického enzymu (HMG-CoA reduktáza, hydroxymethylglutarylCoA-reduktáza). Při výskytu nadměrného množství cholesterolu v lidském organismu, dokáže cholesterol způsobovat poruchy metabolismu tuků a vznik cévních onemocnění (aterosklerózy) [1].



Obrázek 7 Chemická struktura eritadeninu [23]

### 2.6.3.4 Hladina cukru v krvi

Cukrovka je chronické onemocnění, které je vyvolané úplným nebo částečným nedostatkem inzulínu. Pokud si tělo nedokáže vytvořit inzulín, nazýváme toto onemocnění tzv. diabetes. Inzulín se vytváří v slinivce břišní (pankreat). Existují dva typy onemocnění. První typ cukrovky je závislé pouze na injekční podávání inzulínu. U diabetu 2. typu jde o částečný nedostatek inzulínu. Většinou je to způsobené díky špatné funkčnosti slinivky nebo špatnému uvolňování inzulínu [2].

Mechanismus snižování hladiny cukru v krvi je také stále nepotvrzený. Podle starších výzkumů glukany dokáží ovlivnit střevní peristaltiku. Některé studie tvrdí, že  $\beta$ -glukany jsou přírodní látky, které mají hypoglykemický účinek citace. Nejnovější studie z Japonska se

zabývají glukany jako preventivním lékem při diabetu. Tyto studie probíhají na laboratorních krysách, které mají v těle vysoký výskyt glukózy. Po podání glukanu se hodnota hyperglykémie (zvýšení o 43,3 %) snížila na 6,7 %. Z výzkumu vyplývá, že glukany představují nějaké autoimunitní mechanismy, které souvisí s ovlivňováním činnosti Langerhansových ostrůvků a tím mohou zpomalovat rozvoj diabetu [21].

#### 2.6.3.5 Kožní onemocnění

Výrobky s obsahem  $\beta$ -glukanů přispívají k revitalizaci kůže a působí lokálně. Jsou vhodné k léčení povrchových zranění. Slouží i k vyhlazení vrásek a redukci vlhkosti kůže, díky těmto účinkům se beta-glukan často přidává do asijských krémů s pyknogelem na pleť [22].

Epidermální makrofágy aktivuje glukan rovněž a působí fotoprotektivně (ochraňuje kůži před zářením), tím zabrání mikrobům proniknout přes poranění. V roce 2005 bylo potvrzeno, že glukan prostupuje do kožního epidermu a v menším množství i do dermis (místo, kde vznikají vrásky). V dermis se stimulují fibroblasty a ukládá se kolagen. Glukany se většinou přidávají do výrobku jako krémy na opalování, na pleť proti vráskám [24]. Pro tyto aplikace se glukany většinou izolují z ovsu, méně z hub.



Obrázek 8 Kosmetická řada od  $\beta$ -GLUCAN [25]

#### 2.6.4 Negativní účinky vyšších hub

Na druhé straně všech pozitivních účinků existují i negativní účinky. Houby mají schopnost kumulovat z vnějšího prostředí těžké kovy, které se uchovávají v myceliu nebo v plodnicích. Těžké kovy mohou negativně ovlivnit náš zdravotní stav. Jedná se hlavně o akumulaci olova, kadmia a rtuti [2].

Plodnice, mycelium a výtrusy mohou způsobovat různé alergické reakce u některých lidí. Velkou hrozbou je také i přítomnost toxinů v houbách, například polypeptidy amanitiny ( $\alpha$ -amanitin). Po požití toxinů se může dostavit otrava, která může dojít do fáze smrti [2].

Existují potraviny i houby, které nemohou být konzumovány s alkoholem, např. u hnojníku inkoustového, *Coprinus atramentarius*. Plodnice obsahují látku, *coprin*, který má v lidském těle funkci blokáce enzymu štěpícího alkohol. V lidském organismu následně způsobuje

nevolnosti a zažívací potíže. *Coprin* má stejný účinek jako známý *antabus*, který je používán v protialkoholových léčebnách [2].

## 2.7 Vybraní zástupci hub

### 2.7.1 Hlíva ústříčná (*Pleurotus ostreatus*)

Hlíva pochází z Číny, ale v dnešní době je rozšířena po celém světě. Druhové jméno získala díky tvaru připomínajícímu tvar ústřice [26].

*Pleurotus ostreatus* je dřevokazná lupenitá houba, která má šedivý masitý klobouk o velikosti 5-35 cm. Má lasturovitý, bokem přirostlý nebo protažený krátký třeň. Plodnice tvoří bohaté trsy, které jsou řazeny stupňovitě nad sebou, mohou dosáhnout až do hmotnosti 1 kg. Pokožka má hladkou a lysou strukturu. Zbarvení pokožky je od šedé, přes šedohnědou až po černou barvu, jen u třeně je běle plstnatá, lupeny bílé až do našedlé. Velikost třeně měří 1-4 cm a je 2 cm tlustý, válcovitého bílého tvaru. Dužnina je bílého zbarvení. Pokud je plodnice mladá, má měkký tvar, kde postupem stáří tuhne [2].



Obrázek 9 lupeny hlívy ústříčné [5]

Hlíva roste v mírném klimatickém pásu, parazituje na mrtvých i živých kmenech, především na listnatých stromech. Poškozuje kmeny bílou hnilobou. Roste od konce léta až do zimy (srpen až prosinec). Patří mezi zimní houby, které ani mráz nepoškodí [27].

Pěstování hlívy je velkou komerční záležitostí. Ročně se v Číně vypěstuje 85 % světové produkce. Mezi velmocí v Evropě patří také Maďarsko. Při velkovýrobním pěstování je důležité dodržet pár zásadních podmínek. Hlíva roste na pěstebním substrátu, většinou na špalcích slámy, nebo na odpadcích obsahující lignin a celulózu, např. kukuřičná vřetena, piliny, kokosová vlákna [2]. Mohou také růst na dřevě listnatých stromů, hlavně dubu, buku, topolu. Důležitou zásadou při vytváření plodnic je skutečnost, že substrát nesmí být vysušený. Abychom dostali, co největší produkci, je nutné dodržovat větrací a tepelný režim



jednotlivých kroků. Je potřeba dodržet nízkou hodnotu oxidu uhličitého ve fázi prorůstání mycelia, nasazování a tvorbě plodnic. Pro růst je optimální pH prostředí 5-6,5. Hlíva pro svůj růst vyžaduje relativní vlhkost vzduchu v rozmezí 80-90 %. Zajímavostí je, že při vývoji se hlíva chrání pomocí vypouštění plynu ve formě methoxybenzaldehydu, který zabraňuje růstu gram pozitivních a gram negativních bakterií a hub. Zastavuje tím růst konkurenčních hub. Plodnice konkrétně tuhle látku nevyučují, ty jsou chráněny pomocí oktenolu, který poskytuje antibakteriální ochranu. Plodnice mohou bez komplikací dozrávat a uvolňovat výtrusy [1].

Je nutné při pěstování ve velkých pěstírnách používat ochrannou masku, která je vybavená ventilátorem a filtrem. Při dozrávání hlívy dochází k postupnému vytváření spor. Citlivé osoby mohou vdechnout spory a ty mohou způsobit alergickou reakci. Spory vniknou do plicních sklípků a způsobují onemocnění, tzv. alveolitidu. Alergická reakce se dostaví po 6-8 hod po vdechnutí spor, charakteristickým znakem alergie je suchý kašel, bolest hlavy, zvýšená teplota, nevolnost [1].



Obrázek 10 Hlíva ústříčná [5]

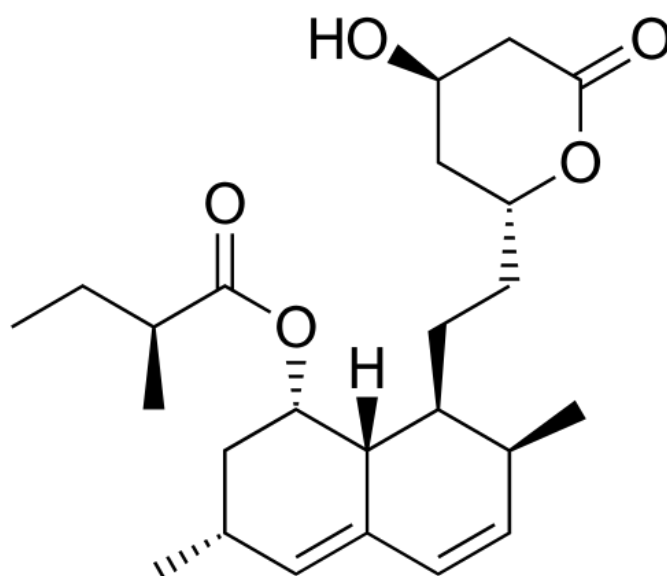
Nejvíce obsahových látek nalezneme v plodnicích, asi 2,5 % bílkovin, 5 % sacharidů a pouze 0,1-0,2 % tuku. Doposud bylo zjištěno, že hlíva obsahuje 18 mastných kyselin, zejména kyselina linolenová a kyselina olejová. Hlíva je obohacena o širokou škálu aminokyselin, největší zastoupení má kyselina glutamová [2].

V plodnicích hlívy byl zjištěn specifický  $\beta$ -(1,3)-D-glukan, nazývaný *pleuran* ( $\beta$ -D-glukopyranoza), který má hlavně výrazné protinádorové účinky a podporuje imunitu [2]. Dále byl objeven lovastin (mevinolin, monakolin K, levastacin), který aktivně působí proti odbourávání cholesterolu. Lovastin spadá do skupiny statinů, které patří mezi inhibitory HMG-CoA reduktázy [2].

Dále jsou přítomny steroly, např. ergosterol a nízké obsahy vitamínů skupiny B, C, K. V hlívě je přítomný alkaloid *eritadenin*, který má schopnost regulace hladiny cukru a cholesterolu v krvi. V hlívě je přítomný terpen *pleurotin*, který vykazuje antimikrobiální a

protirakovinnou aktivitu. Dále je nezbytnou součástí houby chitin, který zachycuje cholesterol [2].

Z minerálních látek je přítomno hlavně železo, draslík, fosfor a ze stopových prvků jsou to selen, zinek bor, jod [2]. Díky obsahu draslíku, přispívá hlíva k rozkladu hlíst. Hlíva ústřičná je specifická masožravá houba. Specializuje se hlavně na drobné hlísty (hád'átka), kteří přežívají v dřevu [1]. Rozkládá jejich těla pomocí smyček houbovými vlákny. Vylučuje se látka toxin (*ostreatin*) do prostředí, který má za úkol imobilizovat tělo hád'átka. Vlákna pronikají a prorůstají do těla, kde ho potom postupně vysají. K průniku hyf dochází od 1 do 7 hodin a do vzdálenosti až 400 mikrometrů, po inaktivaci hlístu. Pomocí asimilativních prorůstajících hyf je hád'átka časem stráveno hlívou. Po strávení kořisti dochází k zvýšené aktivitě růstu hyf houby a v okolí se zvýší počet sekrečních buněk, který přispívá k zvýšené dostupnosti živin v prostředí [1].



Obrázek 11 Vzorec lovastinu [2]

Hlíva ústřičná má široké spektrum pro využití. Je zdrojem glukanů, na výrobu imunitních přípravků. Používají se při léčbě dermatóz jako alergie, vyrážky např. produkt Dermovital. A jsou také nezbytnou součástí v přípravě pokrmů přidávají se do polévek, omáček. Doporučená denní dávka je 5-10 g sušené nebo drcené hlívy [2].



Obrázek 12 Doplněk stravy Imunit [29]

### 2.7.2 Houževnatec jedlý (*Lentinula edodes*, jap. shiitake)

Latinsky *Lentinula edodes*, japonsky shiitake je houba pocházející z Japonska. Shiitake se pěstuje už více než 2 000 let. Jedna známá japonská legenda praví o opicích, které nikdy netrpěly rakovinou, vysokým krevním tlakem ani diabetem, neboť pravidelně konzumovaly houževnatce jedlého [2].

Označení shiitake znamená „houba z dubu“. První zmínky o téhle houbě sahají do 10. století. Už v tomhle století se vědělo, že houba má blahodárné účinky a byla nazývána jako „elixír života“ nebo „houba dlouhověkosti“ [2].

Houževnatec je lupenatá dřevní houba, její plodnice mají velikost o průměru 5-10 cm. Zbarvení klobouku je do světlé až tmavé hnědé s červenohnědým nádechem, záleží podle dostatku světla, na povrchu klobouku se objevují šupiny. V mládí mají podvinutý okraj, který se vývojem pomalu zvedá vzhůru. Lupeny jsou velmi hustě naskládány na sebe, zřetelně odsedlé od třeně. Lupeny jsou na začátku vývoje bělavé, později až narůžovělé zbarvení s hnědými skvrnami. Třeň houby je tuhá, vláknitá na povrchu. Spory mají bílé zbarvení [2].

Rozlišujeme dva typy houževnatce, první typ „donko“ má silnější dužninu a výrazně popraskaný povrch klobouku, na trhu je považován za kvalitnější a dražší druh. Druhý typ se nazývá „koshin“, má klobouk se slabší dužninou a na povrchu je méně popraskaný [1]. Dužnina má připomínat chuť česneku, v Asii se říká téhle chuti umami [1].

Shiitake najdeme v mírném klimatu, vyskytuje se samostatně nebo v trsech na odumřelých listnatých stromech. Řadí se mezi saprofytické organismy. Saprofytické houby přijímají živiny pomocí podhoubím ze svého okolí. Poté přispívají k mineralizaci a humifikaci odumřelé dřevní hmoty. Shiitake obsahují specifické enzymy, které přispívají k rozkladu ligninu [30].





*Obrázek 13 Houževnatec jedlý [31]*

Světová produkce shiitake je kolem 1 500 00 t za rok, tenhle záznam je z roku 2000. Největším producentem jsou země z Asie jako Čína, Japonsko. 80 % vypěstovaných shiitake se vysuší a následně se zpracovává např. v lékařství [1].

Shiitake je dřevokazná houba, která ráda roste v přírodních podmínkách na dubech a habrech. První plodnice se objevují po 2 letech. Na extenzivní pěstování jsou používány špalky, které jsou plněny z rýžové slámy nebo z pilin buku, které jsou namáčeny ve výtažku sójových bobů, aby se šetřilo dřevem a hodnoty živin byly stále optimální. Dřevo je v Asii velmi vzácné. Podhoubí začne prorůstat dřevem, 6-18 měsíců v závislosti na odrůdě shiitake a podmínkách inkubace. Aby se získala největší kvalita houby, vyžaduje se pravidelné máčení špalků ve vodě, obsah vody na klátech má být 35-55 %. Cyklus plodnosti trvá 2-6 let. Maximální denní přírůstky se vytváří za teploty 20-27 °C. Celková doba pěstebního cyklu trvá 3-6 měsíců v závislosti na udržení optimálních podmínek [1].



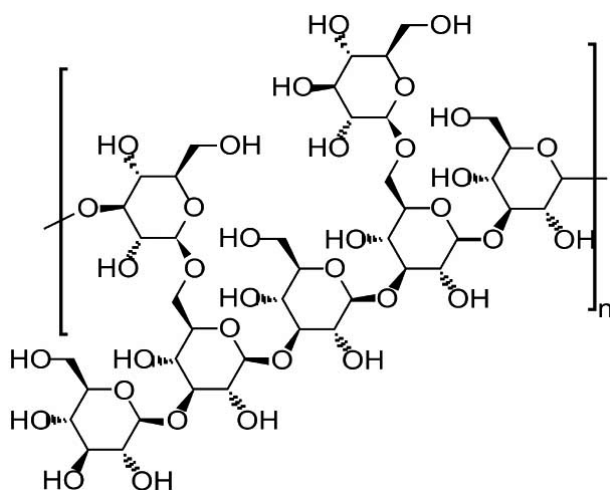
*Obrázek 14 Pěstování Shiitake na umělém substrátu [1]*



Plodnice shiitake obsahuje kolem 85-95 % vody, 20 % bílkovin, především albumin a prolamin. Dále se v shiitake vyskytuje 8 základních aminokyselin, které jsou nepostradatelné pro lidský organismus a to hlavně leucin, lysin. 43-78 % sacharidů je přítomno v sušině. Tuku je přítomno okolo 2 %, shiitake je nízkoenergetická potravina [2].

V celkovém obsahu houby jsou zastoupeny minerální látky, hlavně draslík, vápník, železo, hořčík, zinek, který zlepšuje kvalitu kůže a nehtů. Vzácně jsou přítomny podíly vitamínu skupiny B jako thiamin, riboflavin, niacin a kyselina pantotenová [2].

Nejdůležitější skupinou jsou polysacharidy. V 60. letech 20. století získaly velkou pozornost polysacharidy izolované z shiitake. Byly vyhodnoceny statistiky, které ukazovaly, že ve dvou regionech Japonska s nejhojnějším místem pěstování a konzumace této houby byl nejmenší výskyt nádorových onemocnění. V roce 1975 byl izolován polysacharid lentinan ( $\beta$ -D-glukan) a vyroben první imunitní lék s touto aktivní látkou. Izolace lentinanu je obtížná, protože pro získání čistého glukanu je potřeba značné množství shiitake. Pro představu z 200 kg čerstvých shiitake je získáno pouze 31 g čistého glukanu. Optimální dávka pro lidský organismus je 1-5 mg na kg váhy, podává se intravenózně, při perorálním podávání organismus přijme méně účinné látky. Při katastrofě v Hirošimě byly podávány pacientům různé podpůrné látky, nejúčinnější látkou byl *lentinan* z plodnice shiitake. Lentinan a jeho deriváty podporují tvorbu bílých krvinek, zvyšují jejich aktivitu a stimulují tvorbu interferonu (chrání zdravé buňky před vlastní infekcí) a zabraňují množení virů. Lentinan spolu s kininy pozitivně ovlivňuje imunitní systém [30]. Lentinan dále vykazuje aktivitu proti parazitům jako *Schistosoma japonicum* a *Schistosoma mansoni*, proti bakteriím *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, proti kvasinkám *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae* a proti plísním *Physalospora piricola*. Lentinan je v posledních 20 letech předmětem různých studií, které postupně přechází do klinických výzkumů. Shiitake je považována za zázračnou houbu, která by mohla bojovat s řadou onemocnění včetně různých druhů rakoviny, velmi dobré výsledky byly dosaženy při léčbě nádoru krku, tlustého střeva. Extrakt z plodnic se podává jako preventivní imunitní lék proti toxickým látkám při léčbě pomocí chemoterapie, nebo radioterapie. Dále má potenciál v léčbě kardiovaskulárních a infekčních onemocněních. V nejnovějších článcích se objevuje studium účinku na potlačení replikace viru HIV [31].



Obrázek 15 Chemická struktura lentinanu **Error! Reference source not found.**

V plodnicích je přítomen *eritadenin*, u kterého byla prokázána protivirová aktivita a snižuje hladinu cholesterolu v krvi. Tyhle účinky byly potvrzeny jak u zvířat, tak i u člověka. Také nechybí přítomnost obsahu chitinu a enzymů, které mají za úkol rozložit bílkoviny a škrob. Enzym asparagináza, která je přítomna v shiitake se využívá k léčbě některých druhů leukémie. Extrakty z shiitake se mohou zevně využívat na kožní onemocnění jako jsou ekzémy, akné [2].

Z houževnatce jedlého jsou nyní pro komerční trh získány jak roztoky, nebo tablety obalené cukrem, kapsle, tinktury, čaje, sirupy, víno. Tyhle komerční přípravky najdeme na mnoha místech jako obchody se zdravou výživou, nebo v lékárnách. Také jsou nejpoužívanějším surovinou pro přípravu pokrmů v Asii díky svému česnekovému aroma.



Obrázek 16 Shiitake tablety jako doplněk stravy [32]

### 2.7.3 Boltcovitka - ucho Jidášovo (lat. *Auricularia auricula-judae*, jap. Kikurage)

Boltcovitka je známá už 300 let před n. l v Číně. Ve středověku se využíval její extrakt jako obklad na záněty očí a krku. V ČR je houba známá pod „Jidášovo ucho“ [2]. Název boltcovitka se využívá díky podobnosti s lidským boltcem.

Plodnice nemá rozlišenou část na třen a klobouk. Plodnice je pružná do boltcovitého tvaru, který je různě zprohýbaný. Plodnice dosahuje velikosti 2-12 cm a její tloušťka dorůstá do velikosti 0,1-3 cm. Její tělo je částečně průsvitné, zbarvení plodnice je skořicově hnědé až červenohnědé. V mládí je pohárkovitá, později nepravidelně miskovitá a různě pokroucená, vrásčitá. Je jedním místem přirostlá k substrátu. Ve vlhkém prostředí je velmi pružná, za sucha má velmi tuhou až rohovitou strukturu. Z jedné strany má povrch hladký, lesklý (výtrusorodá vrstva s výtrusy). Vnější strana je drsná, jemně ochlupená, plstnatá. Chut' houby je velmi nevýrazná. Dužnina je rosolovitá a chrupavčitá, díky tomu mají své oblíbené místo v asijské kuchyni [1].



Obrázek 17 "Jidášovo ucho" v čerstvé a sušené podobě [33]

Boltcovitka je rozšířená v mírném klimatickém pásmu (Evropa, Severní Amerika, Asie). Roste především na uschlých pařezech bezu černého, buku, dubu. Vyrůstají buď jednotlivě nebo v trsech. U nás se vyskytují v létě nebo na podzim hlavně po silných deštích, kdy se substrát dostatečně nasytí vodou a plodnice se začínají zvětšovat [1].

Při extenzivním pěstování se používá podobný substrát jako při shiitake. Podhoubí dřevem proroste za 30-40 dnů. Aby plodnost byla nejúčinnější, je potřeba namočit na 24 hodin špalky do vody. Při pěstování je nutno dodržet 85-95% vlhkost. Optimální prostředí pro růst je pH 7. Na špalcích dokáže boltcovitka plodit 3-5 let [1].

V houbě je přítomna pestrá škála chemických sloučenin, ale dosud známe jen málo informací. Především je důležité zmínit se o přítomnosti polysacharidů -  $\beta$ -glukanu I. Dále najdeme v plodnicích obsah kyseliny glukuronové, ergosterol, lecitin. Celkové množství bílkovin je 10,6 % bílkovin a 0,2 % tuku. Z vitamínů je zde zastoupení vitamíny skupiny B a z minerálních látek je to draslík, železo [2].

Uplatnění boltcovitky bezové najdeme i v léčbě. Nejvíce zmiňovanou léčbou je zastavení krvácení, např. při krvácení z nosu, hemoroidní krvácení, křeči končetin, má antikoagulační schopnosti. Doporučuje se častá konzumace boltcovitky bezové jako prevence proti infarktu myokardu. Dále od středověku se jeho extrakt používal jako obklad při zánětech očí a krku. Podporuje správné fungování střev a napomáhá při léčbě hemoroidů. Má příznivé vlastnosti pro kvalitu vlasů a nehtů. Doporučená dávka je 5-10 g suché houby denně. Na přípravu extraktu se namočí 3 g houby do 0,5 litru vody a nechá se přes noc stát. Potom se nechá uvařit, získaný odvar se pije 1-2 šálky denně před spaním, můžeme dosladit medem [2].

Na trhu nalezneme komerční produkty jako doplněk stravy pro posílení cév, nebo také ve formě krému pro revitalizaci pleti. Pro kulinářské využití najdeme Jidášovo ucho v sušené podobě.



Obrázek 18 Extenzivní pěstování houby Jidášovo ucho [1]



Obrázek 19 Doplněk stravy pro posílení krevních cév, krém na revitalizaci pleti s extraktem z boltcovitky bezové [34][35]

#### 2.7.4 Žampion dvouvýtrusý (lat. *Agaricus bisporus*)

Latinsky *Agaricus bisporus* je druh houby, která ve volné přírodě roste jen vzácně na vyhnojených místech jako jsou pastviny, hnojená pole. Plodnice dokážou působit velkou silou, která je schopna nadzdvihnout dlažbu při růstu [1]. Žampion u nás roste od léta (července) do konce září [1].

Klobouk žampionu je v průměru 4-15 cm polokulovitěho tvaru, který má bílé zbarvení. V mládí bývá pokrytý blanou, která má okraj podvinutý. Klobouk je na povrchu suchý, hedvábně lesklý a hladký. Jeho lupeny jsou na začátku růžové, později se zbarví do hněda. Třeň je bílý, plný a válcovitý, na délku měří okolo 3-5 cm, kolem třeně se vyskytuje bílý prstenec [2].

Výtrusy mají tmavohnědé zbarvení. Existuje více kmenů žampionu výtrusného, který se liší tvarem, povrchem klobouku, zbarvením a chutí plodnice. Jedním ze zástupců, který se pěstuje, je žampion hnědý. Forma hnědého žampionu (*Agaricus brunnescens*), má výraznější chuť a vůni, ale také vyšší obsah sušiny [36].





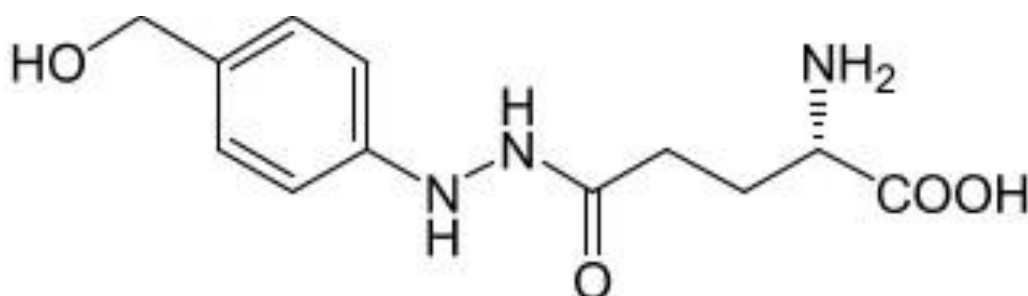
Obrázek 20 Kmeny žampionu výtrusého (bílý a hnědý) [37]

Tradice umělého pěstování žampionu sahá do Francie na přelomu 16. a 17. století. První pěstování začala na pařeništích pomocí koňského hnoje. První spory prošly koňským traktem a začaly klíčit v zemině [38]. Z dosavadních záznamů první pěstírna žampionů vznikla v roce 1915 v USA. V půlce 20. století, po druhé světové válce, se začaly rozšiřovat pěstírny po celém světě. Největším producentem je stále USA, Francie, Holandsko. Na extenzivní pěstování se používal nejvíc koňský hnůj, postupem času se začal používat substrát směsi ze slámy a drůbežního trusu. Žampion dvouvýtrusý je nejvíce pěstovanou houbou na světě [2]. Při růstu mycelia se preferuje vyšší teplota (optimálně 30 °C). Důležitou podmínkou pro produkci je kvalitní, selektivní substrát. Při takové optimální teplotě se často vyvíjí i jiné plísně. Plodnice se vytváří při optimální teplotě 24-25 °C. Optimální vlhkost pro růst plodnic je 90-95 %. Prorůstání podhoubí trvá necelé 2 týdny při optimálních podmínkách. Důležitým kritériem je, aby substrát byl neustále vlhký. Po 6-8 dnech se začne podhoubí prorůstat zeminou a na povrchu se začnou objevovat bílé mycelia. Po prorůstání plodnic se náhle musí změnit teplota na 19 °C (teplotní šok). Při pěstování je nutné dodržet i koncentrace oxidu uhličitého 0,08-1 %, který se reguluje větráním. Žampiony se sklízí v 4 vlnách. Nejvýnosnější sklizeň je první vlna, poté se zemina zalije vodou a po týdnu se sklizeň uskuteční znovu. Výtěžky časem klesají [39].

V čerstvých plodnicích nalezneme hlavně vodu 80 %. Dále jsou bohaté na bílkoviny 4,8 %, obsahují 13,6 % sacharidů, 0,2 % tuků, 0,8 % vlákniny a 0,8 % minerálních látek jako draslík. Až 16 druhů aminokyselin je zastoupeno v žampionech např. lysin, leucin, kyselina glutamová, nechybí ani kyselina linolová, lektin (proteiny neimunitního původu, bez enzymové aktivity) a chitin. Hlavní složku hub tvoří polysacharidy, glukany, 90 % z nich tvoří  $\alpha$ -glukany. Účinek  $\alpha$ -glukanů je zanedbatelný, protože výtěžek glukánů z *Agaricus* je nízký. Součástí žampionů nechybí ani ergosterol a vitaminy skupiny B [2].

Mezi specifickými obsahovými látkami v žampionu nalezneme i látky jako agaritin, psalliotin. Agaritin (1-( $\gamma$ -L-glutamyl)-2-[(4-(hydroxymethyl)fenyl]-hydrazin), který je přítomný pouze v žampionech, potenciálně způsobuje karcinogenní a mutagenní účinek, který byl prokázán pouze *in vitro*. Část agaritinu je přeměněna v metabolismu na vysoce karcinogenní diazoniový derivát. U pěstovaných žampionů je obsah agaritinu velmi nízký. Člověk se nemusí bát rizika při konzumaci žampionů. Při varu se agaritin zcela rozkládá na neškodné látky [40].

Psalliotin je účinná látka, která se užívá při alergickém astmatu, ekzémech a jiných kožních alergiích. Jako antibiotikum působí proti všem streptokokům. Dále bylo izolováno antibiotikum, kampestrin, který působí proti původci tyfu [2].



Obrázek 21 Chemická struktura agaritinu [41]

Plodnice jsou vhodné pro diabetiky, snižují hladinu cukru v krvi a jsou ideální potravou pro redukci váhy. Také se díky přítomnosti psalliotinu užívá zevně při kožních ekzémech a jiných alergiích. Užívá se při prevenci rakoviny prsu, protože dokáže snížit hladinu estrogenů. Vodný extrakt z žampionů napomáhá k posílení imunitního systému. Může se užívat jako sušený prášek, nebo i jako tinktura, kdy 100 g čerstvých plodnic se zalije 0,5 litrem 60 % ethanolu. Nechá se 10 dní louhovat, poté se scedí a uloží se do tmavé láhve. Užívá se 4krát denně, 25 kapek. Žampion dvouvýtrusý je nejoblíbenější houbou, která se připravuje v kuchyni [2].

## 2.8 ANALYTICKÉ METODY

### 2.8.1 Spektrofotometrie

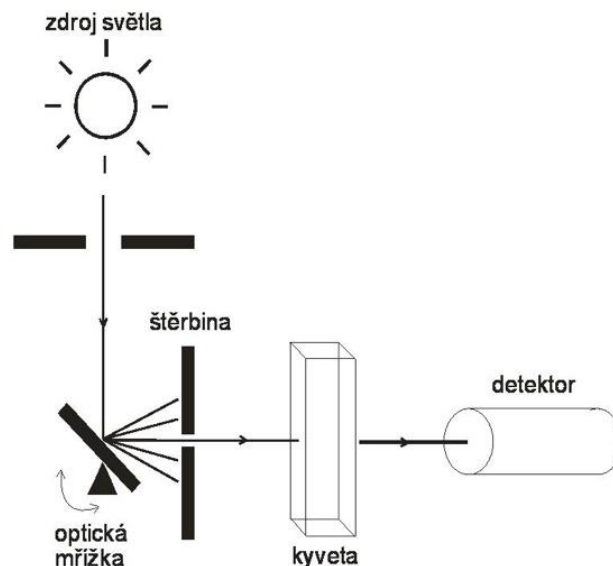
Spektrofotometrie je metoda, která je založená na Lambert-Beerově zákonu. Spadá mezi optické metody. Definuje vztah, který určuje meze absorpcí světla a vlastnosti určité látky, kdy světlo prochází skrz vzorek. Celé znění zákona říká, že intenzita zbarvení roztoku (absorbance) je při konstantní tloušťce optické vrstvy (délka kyvety), přímo úměrné koncentraci  $c$ , kde  $A$  je naměřená absorbance vzorku,  $c$  koncentrace roztoku [ $\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ],  $\epsilon$  je molární absorpční koeficient [ $\text{dm}^3 \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$ ],  $d$  je délka kyvety [cm] [41].

$$A = \epsilon \cdot c \cdot d$$

*Rovnice 1 Lambert - Beerův zákon*

### UV-VIS spektrofotometr

Přístroj je založen na interpretaci elektronových spekter jednotlivých molekul látek, které absorbují elektromagnetické záření (absorbance) v rozmezí 200 až 800 nm. Vlnová oblast menší než 380 nm se nazývá UV - oblast. Lidské oko vnímá látky v této oblasti jako bezbarvé. Látky, které absorbují z bílého slunečního záření v rozmezí vlnové délky od 380-770 nm jsou pro lidské oko vnímané jako barevné roztoky [44].



Obrázek 22 Instrumentace spektrofotometrie [43]

### 2.8.2 Plynová chromatografie (GC – FID)

Plynová chromatografie spolu s kapalinovou chromatografií patří mezi nejpoužívanější analytické metody v biotechnologii. V GC dochází k rovnovážné separaci složek, které jsou obsažené ve vzorku. Stanovuje jak kvalitativní, tak i kvantitativní informaci jednotlivých látek. Kvantitativní informace se získá z plochy píku nebo jeho výšky a udává množství látky ve vzorku. Pro kvalitu vzorku se vyhodnocují retenční časy a maximum píků [45].

Jedná se o jednoduchou metodu s citlivou a vysokou účinností separace [46]. Plynová chromatografie je hlavně vhodná pro organické látky, které mají bod varu do 400 °C. Aby proběhla úspěšná separace, látky se nesmí při odpařování rozkládat. Metoda je spolehlivá např. při separaci tuků a těžkých esterů mastných kyselin [43], [46].

GC se skládá ze zdroje nosného plynu, čistícího a regulačního zařízení, dávkovacího zařízení (injektor), chromatografické kolony, termostatu, detektoru a vyhodnocovacího zařízení [47].

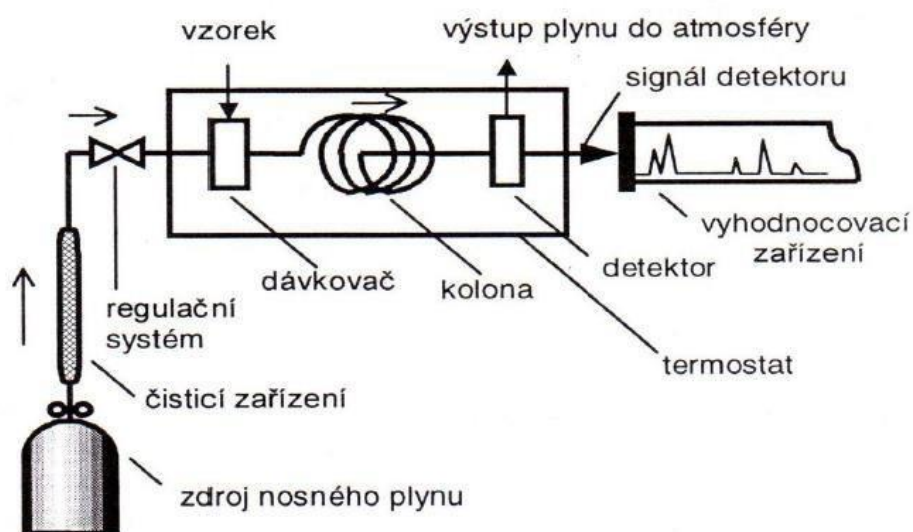
Nosný plyn slouží jako mobilní fáze, který transportuje vzorek kolonou. Musí být zpravidla inertní a nesmí reagovat s analyzovanou látkou. Nejpoužívanějším nosným plynem při separaci MK je dusík. Dusík má stabilní signál a rychlou odezvu. Nosné plyny jsou uchovány v tlakových láhvích. Separace složek probíhá vždy v plynné fázi. Separace spočívá na základě různých interakcí složek vzorku se stacionární fází, kde jsou postupně eluovány inertním plynem. Jednotlivé složky jsou pak detekovány detektorem a výchozím záznamem je signál [48].

Injektor slouží jako nástřík vzorku. Vzorek můžeme zavést pomocí mikrostříkačky přes silikonové septum, nebo pomocí dávkovacího ventilu, který lze nastavit jako autosampler. Rozlišujeme několik typů kolon: kapilární, náplňové. U kapilárních kolon jsou stěny kapiláry pokryty stacionární fází. Vnitřní průměr kolon dosahuje velikosti 100 – 700 μm a délka kolony měří 15 – 100 m. Materiál kolony bývá nejčastěji z taveného křemenu, který je pokrytý polyimidovou vrstvou. Náplňové kolony jsou trubice, které jsou naplněné

adsorbentem. Nejpoužívanějším adsorbentem je silikagel, alumina. Délka kolony měří 1-3 m a průměr je 2 – 3 mm [48],[49].

Termostat má za úkol udržovat dostatečně vysokou teplotu dávkovače, kolony, aby vzorek byl stále v plynném skupenství [49].

Při stanovení lipidů je často využíván FID (plamenově ionizační) detektor. Patří mezi destruktivní detektory. Při FID dochází ke spalování vzorku kyslíko-vodíkovým plamenem, který hoří mezi dvěma elektrodami (anodou a katodou). V plameni dochází k vytvoření radikálů, které přechází na ionty. Dochází ke zvýšení ionizace a elektrického proudu. Detektorem následně prochází proud, který je úměrný koncentraci jednotlivých složek. Poslední částí instrumentace je vyhodnocovací zařízení např. počítač, slouží ke zpracování signálu, kde se zakreslí chromatogram, který se vyhodnotí pomocí software.



Obrázek 23 Instrumentace plynového chromatografu [49]

## 2.9 Využití mikroorganismů k testování antimikrobiální

### 2.9.1 Kultivace mikroorganismů

Kultivace je metoda pěstování mikroorganismů, která spadá mezi mikrobiologickou práci. Mezi hlavními faktory úspěšné kultivace je správná volba živného (kultivačního) média, optimální teploty a přístup vzduchu (záleží na mikroorganismu) [50].

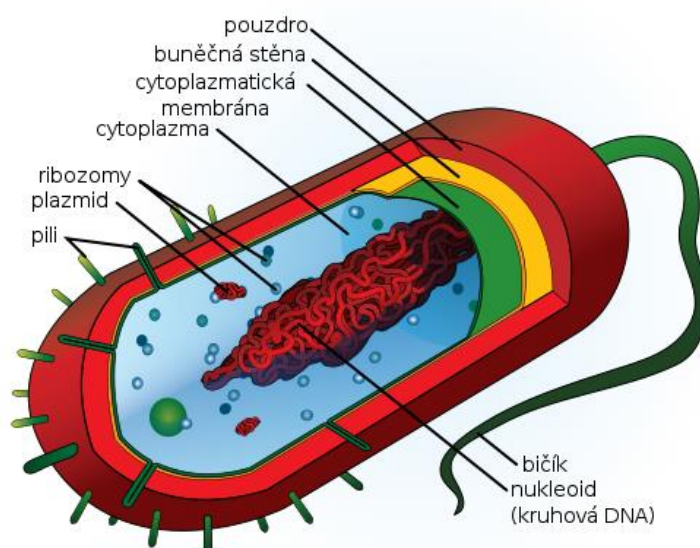
Živná média můžeme rozdělovat např. podle skupenství (pevná, polotuhá, tekutá), původu (přírodní, syntetická, umělá). Hlavní složkou všech médií je přítomnost uhlíku, dusíkatých látek, minerálních látek, vody, selektivní činidel a látek, co upravují pH. Do tuhých médií se převážně přidává agar. Agar je polysacharid, který se získává z mořských řas. Tuhne při teplotě 40 °C a stává se tekutým při 96 °C. Tyhle informace využíváme při sterilizaci médií. Tuhá média se kultivují v termostatu, aby došlo k výměně vzduchu. Tekuté médium se kultivuje na třepačce, zajištění přísunu kyslíku [50].



## 2.9.2 Vybrané testovací mikroorganismy

Na stanovení antibakteriální aktivity byl vybrán jeden kmen kvasinky *Candida glabrata* a dva druhy bakterií. Jeden druh bakterie zastupuje grampozitivní a druhý patří mezi gramnegativní bakterie [50].

Bakterie jsou jednobuněčné mikroorganismy s prokaryotickým typem buňky. Má buněčnou stěnu, která chrání před chemickým nebo mechanickým poškozením. Dále udržuje buňce tvar a proudění osmotického tlaku [51].



Obrázek 24 Bakteriální buňka [54]

Bakterie se nejčastěji dělí podle Gramova diagnostického barvení na grampozitivní a gramnegativní bakterie. Krystalová violet s roztokem jodu působí na tepelně fixované buňky bakterií. Poté se buňky nechají opláchnout organickým rozpouštědlem (aceton, ethanol). Jako rozdíl jsou fialově obarvené buňky (grampozitivní) a buňky, které jsou odbarvené (gramnegativní) [51].

Buněčná stěna gramnegativních bakterií je složena z vrstvy peptidoglykanů. Vrstva peptidoglykanů je velmi tenká. Vnější strana se skládá z fosfolipidů, lipoproteinů, strukturálních a enzymových proteinů [53]. Buněčnou stěnu grampozitivních bakterií tvoří velmi silná vrstva peptidoglykanů, která je vyplněna kyselinou teichoovou. U gramnegativních bakterií kyselina teichoová není přítomná ve vrstvě buněčné stěny. Díky této kyselině u Gramově diagnostického testu způsobuje fixaci fialového zbarvení [53].

### 2.9.2.1 *Serratia marcescens*

Gramnegativní bakterie patřící do rodu *Enterobakterie*. Z hlediska morfologického má tvar tyčinkovitý. Jedná se o pohyblivou bakterii, která je fakultativně anaerobní. Živí se chemotrofně a netvoří spory. Specifickou vlastností bakterie, že produkuje červený pigment tzv. prodigiozin.



Obrázek 25 *Serratia marcescens* [55]

Pacienti, kteří mají oslabenou imunitu, mohou být napadeni touto bakteríí. *Serratia marcescens* způsobuje infekci dýchacích cest, meningitidu nebo infekci ran [52].

#### 2.9.2.2 *Micrococcus luteus*

Patří mezi aerobní grampozitivní bakterie. Vyskytuje se v shlucích nebo v párech. Netvoří spory a nemají bičíky. Morfologicky mají kulovitý tvar. Charakteristickým znakem je produkce barviva *lutein*, který patří mezi karotenoidní barviva, typickou barvou luteinu je žlutá. *Micrococcus luteus* je rozšířený, nalezneme ho na kůži nebo v dutině ústní. Považuje se za neškodnou bakterii pro zdravého člověka, může způsobovat infekce u pacientů s oslabenou imunitou [56].



Obrázek 26 *Micrococcus luteus* [54]

### 2.9.2.3 *Candida glabrata*

Patří do rodu kvasinek *Candida*. Kvasinky jsou eukaryotní mikroorganismy, které mají rozšířené uplatnění v potravinářství. Z morfologického hlediska mají tvar válce. Buňku tvoří cytoplazmatická membrána s cytoplazmou, obal buněčná stěna. Buněčná stěna u kvasinek, není zcela objasněná. Stěnu tvoří tři vrstvy. Vnitřní vrstva udržuje tvar buňky. Vnější strana reguluje propustnost [57].

Až donedávna byla *C.glabrata* považována za nepatogenní mikroorganismus. Ale s přibývajícím růstem jedinců s oslabenou imunitou se ukázalo, že *Candida glabrata* se vyskytuje v močových cestách a může způsobovat povrchové infekce [58].



Obrázek 27 *Candida glabrata* [54]

### 2.9.3 Antibakteriální stanovení – Agarová difúzní metoda

Metoda, která určuje minimální účinnou koncentraci MIC, která inhibuje růst mikroorganismů. Princip metody spočívá v přidání přesného objemu testované látky do kultivačního média (pevné médium). Po zaočkování se sleduje růst MO a vytvoření inhibičních zón. Metoda většinou slouží jako srovnávací metoda pro nové antimikrobiální látky [59].

## 2.10 Stopové prvky v houbách

### 2.10.1 Přehled vybraných těžkých kovů přítomných v houbách

Houby mohou kumulovat toxické stopové prvky, které čerpají z organické hmoty substrátu. Prvky získávají ve formě iontů nebo soli, které jsou rozpuštěné ve vodě a díky zvětrávání půdy se kumulují např. v plodnicích hub. Houby mají schopnost přijímat mnohem větší množství stopových prvků než zelené rostliny, které se nachází ve stejných podmínkách [60].

Největší část stopových prvků přijímá podhoubí a mycelium. V plodnicích nalezneme největší zastoupení prvků jako kadmium a rtuť. Dále mohou obsahovat prvky jako arsen a olovo. Tyto prvky patří do skupiny těžkých kovů. Obsahy těchto látek jsou vyjádřené

v jednotkách ppm (parts per milion = miliontina z celku;  $1 \text{ ppm} = 1 \text{ mg.kg}^{-1} = 1 \text{ }\mu\text{g.g}^{-1}$ ) v sušně plodnice [61].

Podstatné je zmínit, že stopové prvky se vyskytují pouze v malých koncentracích, které by lidskému zdraví neměly ublížit. Vyšší obsah těžkých kovů se mohou objevovat u hub, které rostou u zatíženějších míst, kde je znečištěné ovzduší. Při konzumaci komerčně vypěstovaných hub je riziko a přítomnost těžkých kovů minimální až nulová.

**Arsen** (As) – arsen se nejčastěji kumuluje v plodnicích. Tento prvek nepředstavuje velké riziko otravy. Je vázaný v sloučeninách, které nejsou natolik toxické např. arzenobetain. Smrtelná dávka arsenu je okolo 120 mg. V houbách se arsen vyskytuje v jednotkách ppm [61].

**Kadmium** (Cd) – kadmium patří mezi největší rizika při konzumaci hub. Jeho obsah je rozložen nerovnoměrně, dosahuje desítky až stovky ppm. Nejvíce kadmia je přítomno ve výtrusové vrstvě a nejméně v třeni. Kadmium nalezneme hlavně u některých druhů žampionů (*Agaricus*). V západoevropských státech se nedoporučuje konzumovat *Agaricus arvensis*, který obsahuje největší zastoupení kadmia [61]. Riziková dávka kadmia se pohybuje okolo 10 mg. Při překročení dávky můžeme zpozorovat zvracení, nevolnosti a v nejhroších případech dochází k poškození jater [62].

**Olovo** (Pb) – obsah olova se pohybuje pouze okolo 5 ppm. Nízký obsah olova nepředstavuje žádné riziko pro lidské zdraví. Příjem olova nad 0,5 mg/den může dojít ke kumulaci v organismu, který se může přímo ukládat do jater a ledvin [63].

**Rtuť** (Hg) – relativní obsah rtuti v houbách je okolo 5 ppm. Vyšší koncentrace se pohybuje kolem desítek ppm. Vyšší zastoupení rtuti se může objevit v žampionech (*Agaricus*) a bedlách (*Macrolepiota*). Tento prvek se převážně váže na vysokomolekulární bílkoviny ve formě methylrtuti. Tyto houby se nedoporučují k sbírání na volných místech, kde se nachází znečištěná půda. Rtuť se dokáže kumulovat přímo z půdy. *Agaricus bisporus*, žampion dvouvýtrusý, který je vypěstovaný v pěstírnách, má mnohem nižší obsah rtuti než na volných místech. Je doporučeno konzumovat tyto houby z pěstíren [61].

### **2.10.2 Stanovení těžkých kovů pomocí ICP- OES (emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem)**

Jedná se o multielementární analýzu. Vyhodnocuje prvkové složení biologických materiálů. Principem metody je emise fotonů z excitovaných atomů, které se přeměňují na ionty. Během nadávkování vzorků se vzorek přemění na aerosol, který je následně veden do plazmatu, kde dojde k vypařování a vzniku volných atomů v plynném stavu. Volné atomy jsou následně excitovány do vyšších energetických hladin. Energetické stavy jsou nestabilní, a tak dochází k rychlé deexcitaci do nižších energetických hladin. Poté dochází k emisi fotonů, které jsou pak přiděleny ke konkrétním vlnovým délkám jednotlivých prvků. Počet fotonů je rovný koncentraci prvků ve vzorku. Výhodou ICP-OES je široký dynamický rozsah stanovení jednotlivých prvků [64].

Instrumentace ICP-OES se skládá z generátoru vysokofrekvenčního proudu, ICP hořáku, systému vnášení vzorku, spektrálního přístroje (zobrazovací optika, disperzní prvek, detektor) a vyhodnocovacího systému. Vyhodnocením ICP jsou spektrální čáry, tzv. série, které vznikají návratem elektronu do stejné hladiny z libovolného vyššího stavu. Hrana série odpovídá vlnové délce energie, která je potřebná k přechodu elektronu z dané energetické hladiny do volného stavu [65]. Identifikace polohy spektrálních čar nám umožňuje stanovit kvalitativní analýzu. Intenzita jednotlivých čar odpovídá stanovení koncentrace prvku ve vzorku – kvantitativní analýza [65].

## 2.11 Testování toxicity a cytotoxicity

Význam cytotoxicity je schopnost buněk, nebo chemických látek usmrtit jiné buňky. Testování cytotoxicity patří mezi bezpečnostní hodnocení, které se musí stanovit vždy před uvedením doplňku stravy nebo potravinového produktu na komerční trh, vyhodnocuje se bezpečnost pro lidské zdraví. K testování se většinou používají testy *in vitro*, které se stanovují mimo živý organismus, provádí se ve zkumavkách. Metoda je rychlá a levná. Výhodou stanovení je test bez použití zvířat [66].

Cytotoxicita se vyhodnocuje pomocí hodnoty  $IC_{50}$ , která představuje střední inhibiční koncentraci. Mírou cytotoxicity se stanovuje pomocí křivky *dose-responce*. Na osy křivek se vynáší koncentrace toxické látky a zastoupení přeživších buněk. Při použití logaritmického vyjádření získáme sigmoidní křivku, kde se hodnota  $IC_{50}$  se vyhodnotí jako inflexní bod [67]. O houbách je známo, že některé druhy obsahují toxiny, které mohou způsobit potíže lidskému organismu. Jedná se o jedovaté houby, které by se neměly konzumovat, patří sem např. druh muchomůrek (*Amanita*). Ty mohou dokonce způsobit úmrtí. Jejich peptidy (amanitiny) dokážou inhibovat RNA polymerázu. Konečným důsledkem jsou střevní potíže, poškození jater, ledvin [66].

Toxiny nalezneme také v houbách, které dennodenně využíváme v kuchyni, např. žampion dvouvýtrusý (*Agaricus bisporus*). Ten obsahuje toxin tzv. agaritin, který má karcinogenní účinky. V žampionech se vyskytuje pouze v nízkých koncentracích, kde při tepelné úpravě ztrácí svou aktivitu o 85 %, proto konzumace žampionů je zcela bezpečná. [2].

### 3 CÍL PRÁCE

Hlavním cílem diplomové práce byla celková charakterizace aktivních látek se zvláštním zaměřením na množství beta-glukanů přítomných ve vybraných druzích vyšších hub. Práce byla konkrétně zaměřena na 4 druhy hub (houževnatec jedlý, hlíva ústříčná, boltcovitka bezová, žampion dvouvýtrusý). V rámci práce byly řešeny následující dílčí roky:

- Stručná rešerše zaměřená na vyšší houby a jejich dosavadní studie
- Úprava vzorků a příprava extraktů
- Charakterizace aktivních a obsahových látek
- Stanovení množství  $\beta$ -glukanů ve vyšších houbách
- Stanovení antimikrobiální aktivity
- Cytotoxické test (MTT test)
- Stanovení těžkých kovů pomocí ICP-OES.

## 4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 4.1 Chemikálie, použité přístroje a materiál

#### 4.1.1 Chemikálie

Acetonitril, p.a., LachNer (ČR)

ABTS - 2,2-azinobis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonoová kyselina), Sigma Aldrich (SRN)

Agar Powder, Himedia (India)

Albumin 98% – Sigma-Aldrich s.r.o.

Diethylether, p.a., LachNer (ČR)

Dodecylsíran sodný Serva (DEU)

Dusitan sodný, p.a., Lachema (ČR)

Etanol pro UV-VIS, Lachema (ČR)

Fenol, p.a., LachNer (ČR)

Folin-Ciocalteu činidlo, Serva (SRN)

Hydrogen uhličitan sodný- p.a., LachNer, (ČR)

Hexakynoželeznatan draselný, Penta (ČR)

Heptahydrát hydrogen arsenitu sodného - Lachema

Hydroxid draselný, p.a., LachNer (ČR)

Hydroxid sodný, p.a., LachNer (ČR)

Chlorid hlinitý, p.a., LachNer (ČR)

Chlorid sodný, p.a., Lachema (ČR)

Chloroform, VWR Chemicals BDH PROLABO (USA)

Kyselina chlorovodíková (35%), LachNer (ČR)

Kyselina dusičná 67 %, p.a Analytika (Praha, ČR)

Kyselina sírová (96%), LachNer (ČR)

Metanol, p.a., Lachema (ČR)

Molybdenan amonný – LachNer (ČR)

Nutrient Broth (NB), Himedia (India)

Octan sodný, p.a., Lachner (ČR)

Peroxodisíran draselný, p.a., Sigma Aldrich (SRN)

Peroxid vodíku 30 %, p.a Lachner (ČR)

Prvkové standardy 1 g/L, Analytika (ČR)

Síran zinečnatý heptahydrát, p.a., LachNer (ČR)

Síran měďnatý pentahydrát – Lach-Ner s.r.o. (ČR)

Síran sodný - – Lach-Ner s.r.o. (ČR)

Standardy jednotlivých prvků G/l Analytika (ČR)

Uhličitan sodný, p.a., LachNer (ČR)

Uhličitan vápenatý, p.a., LachNer (ČR)

Ultradeionizovaná voda Pure Lab Water

Vinan sodno-draslený tetrahydrát p. a. – PENTA s.r.o. (ČR)

Yeast extract – LachNer (ČR)

#### 4.1.2 Plyny

Dusík 5.0 SIAD v tlakové bombě s redukčním ventilem

Vodík 5.5 SIAD v tlakové bombě s redukčním ventilem

Vzduch 5.0 SIAD v tlakové bombě s redukčním ventilem

#### 4.1.3 Standardy

Enzymatic Yeast  $\beta$ -Glucan Assay Kit - Megazyme (Ireland)

Glukosa monohydrát, p.a., LachNer (ČR)

Katechin- Sigma-Aldrich (SRN)

Kyselina gallová, Sigma Aldrich (SRN)

Trolox, Sigma Aldrich (SRN)

DME/High Glucose (USA)

#### 4.1.4 Přístroje

Analytické váhy Boeco (SRN)

Centrifuga Sigma Laborzentrifugen (SRN)

ELISA reader BioTek Elx808, BioTek (Německo)

Inverzní biologický mikroskop, Laboserv (ČR)

Jednotka pro přípravu ultračisté deionizované vody Pure Lab Classic UV (UK)

Mikrovlnný rozkladný systém Milestone 1200 s karuselem na 6 vzorků (USA)

Optický emisní spektrometr s indukčně vázaným plazmatem Horiba Ultima 2 (Horiba Scientific, Francie)

Plynový chromatograf TRACE GC (ThermoQuest Italia S. p. A, Itálie) s plameno - ionizačním detektorem (Thermo Scientific, USA)

Spektrofotometr VIS, Helios  $\delta$ , Unicam (GB)

Třepačka IKA Yellow Line (SRN)

Vodní lázeň EL-20, Merci a.s. (ČR)

Vortex, TK35, Kartell spa (USA)

#### 4.1.5 Buněčné linie

Použité buněčné linie byly získány ve sbírkách The European Collection of Cell Cultures a American Type Cell Collection (ATCC).

**HaCaT** – keratinocyty – imortalizované (schopnost neomezeného buněčného dělení) (ECC)

**B16F1** – kožní nádor – melanomy (ATCC)



#### 4.1.6 Materiál

- Houževnatec jedlý - čerstvá
- Původ: Polsko
- Dovozece: Hlívenka s.r.o



Obrázek 28 Čerstvé Shiitake [68]

- Houževnatec jedlý – sušený
- Původ: Vietnam
- Dovozece: Non Lá



Obrázek 29 Sušené Shiitake [69]

- Boltcovitka bezová – sušená
- Původ: Vietnam
- Dovozece: Non Lá



*Obrázek 30 Usušené Jidášovo ucho [69]*

- Hlíva ústříčná – čerstvá
- Původ: Brno, Česká republika
- Dovozece: Hlívenka s.r.o



*Obrázek 31 Čerstvá hlíva sušená dovozce Hlívenka s.r.o [68]*

- Hlíva ústříčná – sušená
- Původ: AGRO-HURT S.P., Polsko
- Dovozece: Hlívenka s.r.o



Obrázek 32 Mletá hlíva sušená od Hlívenka s.r.o [68]

- Žampion dvouvýtrusý – čerstvý
- Původ: AGRO-HURT S.P., Polsko
- Dovožce: Hlívenska s.r.o



Obrázek 33 Žampion bílý od Hlívenka s.r.o [68]

- Žampion dvouvýtrusý – hnědý kmen
- Původ: AGRO-HURT S.P., Polsko
- Dovožce: Hlívenka s.r.o



Obrázek 34 Žampion hnědý - dovozce Hlívenka s.r.o [68]

#### 4.2 Příprava materiálů - sušení

Všechny jednotlivé houby byly zváženy na předvážkách v syrovém stavu. Houby byly nakrájeny na tenké plátky. Následně byly na pečící papír rozloženy po jednotlivých druzích a vloženy do sušárny, kde byly sušeny při teplotě 50 °C do konstantní hmotnosti. Po usušení houby byly zváženy a hmotnosti zaznamenány pro následnou diskuzi.



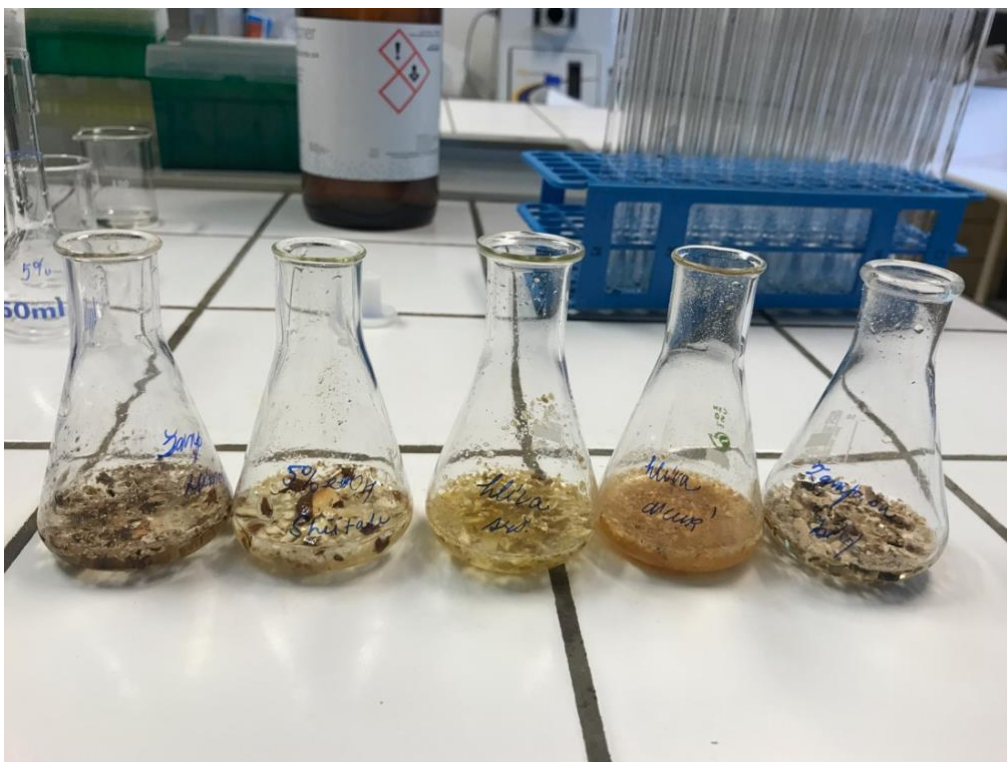
Obrázek 35 Příprava hub na sušení

#### 4.3 Příprava vzorků

Bylo naváženo 0,5 g vzorku a následně přidáno 10 ml destilované vody. Takto připravené vzorky byly nechány na třepačce 30 min. Vzorky byly poté centrifugovány 5000ot./10 min. Stejným principem byly nachystány 5% etanolové extrakty.

Tyto extrakty sloužily jako vzorky pro stanovení polyfenolů, flavonoidů, proteinů, antioxidační aktivity.





Obrázek 36 Extrakty jednotlivých hub

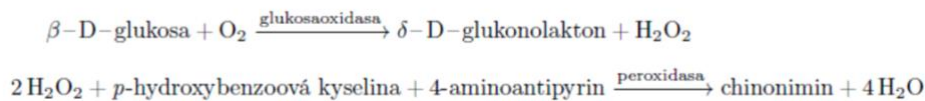
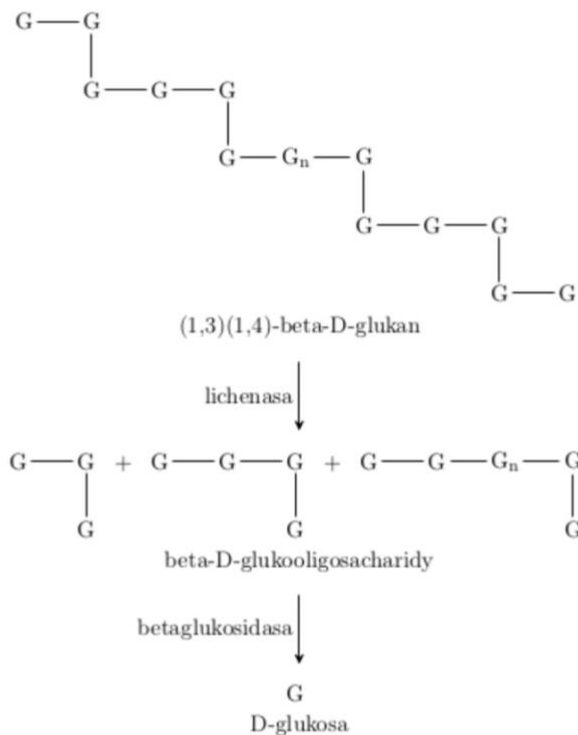
#### 4.4 Stanovení $\alpha$ -glukanů, $\beta$ -glukanů a celkových glukanů

Metoda byla publikována v roce 1985 McCleary a Glennie-Holmes z Irska [70]. Tento postup měření  $\beta$ -glukanů se stal celosvětovou využívanou metodou pro měření glukanů v ječmenu, sladu, vyšších houbách. Základním principem je enzymatická hydrolyza  $\beta$ -D-glukanu lichenasou (glukanohydrolasa izolovaných z *Bacillus subtilis*) na oligosacharidy, které se kvantitativně štěpí na glukosu pomocí  $\beta$ -glukosidasy. Poté se glukosa měří pomocí pufrované směsi, které je směsí glukosaoxidasy a peroxidasy [70].

Jedná se o enzymatický rozklad polysacharidů až na jednotlivé D-glukózy. Metoda je jednoduchou přímou metodou k štěpení  $\beta$ -glukanů na prvotní oligosacharidy pomocí lichenázy a následně rozklad na jednotky glukózy pomocí  $\beta$ -glukosidázy.

Principem metody v prvním kroku je hydrolyza 1,3 a 1,6 -  $\beta$ - glukanů solubilizovat v 12 M kyselině sírové a poté následný rozklad 2 M kyselinou sírovou za zvýšené teploty. Glukanové fragmenty se následně hydrolyzují kvantitativně na jednotky glukózy, a to purifikovanou směsí exo-1,3- $\beta$ -glukonázy a  $\beta$ -glukosidázy.

Při měření  $\alpha$ -glukanů se vzorek hydrolyzuje dále pomocí použití amyloglukosidázy a  $\alpha$ -amylázy, měření probíhá přidáním činidla GOPOD.  $\beta$ -glukany se vypočítají z rozdílu naměřených celkových glukanů a  $\alpha$ -glukanů. Absorbance se měří při 510 nm.



Obrázek 37 Schéma enzymového stanovení  $\beta$ -glukanů [70]

#### 4.4.1 Obsah kitu

**Láhev 1:** 2 ml suspenze síranu amonného ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) s obsahem:

- exo-1,3- $\beta$ -glukanáza 100 U/ml
- $\beta$ -glukosidáza 20 U/ml

**Láhev 2:** 20 ml roztoku 50% glycerolu obsahující:

- Amyloglukosidázu 1,63 U/ml
- Invertázu 500 U/ml

**Láhev 3:** 50 ml reakčního pufru GOPOD pH 7,4 s obsahem:

- p-hydroxybenzoová kyselina
- azid sodný.

**Láhev 4:** Reakční směs GOPOD enzymů a substrátů:

- Glukózaoxidáza (GOD)
- Peroxidáza (POD)
- 4-aminoantipyrin

**Láhev 5:** 5 ml standardního roztoku glukózy v 0,2% kyselině benzoové:

- D-glukóza 1,00 mg/ml

**Láhev 6:** Kontrolní vzorek  $\beta$ -glukanu ~ 2 g.

#### **4.4.2 Příprava pomocných roztoků a úpravy části kitu**

##### **Sodno-acetátový pufr (200 mM, pH 5,0)**

Bylo napipetováno 11,6 ml koncentrované kyseliny octové do 900 ml destilované vody a pomocí roztoku 4 M NaOH bylo upraveno na pH 5 a následně doplněn celkový objem na 1 000 ml.

##### **Sodno-acetátový pufr (1,2 M, pH 3,8)**

Bylo napipetováno 69,6 ml koncentrované kyseliny octové do 800 ml destilované vody a pomocí roztoku 4 M NaOH byl roztok upraven na pH 3,8 a následně doplněn na celkový objem 1 000 ml.

##### **10 M hydroxid draselný KOH**

Bylo naváženo 561 g KOH a přidáno 700 ml destilované vody. Po rozpuštění hydroxidu, byl roztok doplněn destilovanou vodou na celkový objem 1 000 ml.

##### **2 M hydroxid draselný KOH**

Bylo naváženo 112 g KOH a přidáno k 800 ml destilované vody. Poté byl objem doplněn destilovanou vodou na 1 000 ml.

##### **12M kyselina sírová H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>**

Byl připraven roztok o objemu 640 ml H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 300 ml destilované vody, který byl poté doplněn destilovanou vodou na celkový objem 1 000 ml.

##### **Úprava kit láhev 1:**

Bylo přidáno 9 ml acetátového pufru pH 5 do objemu kitu (láhev 1). Roztok byl rozdělen na vhodné alikvoty a uchován při -20 °C.

##### **Úprava kit láhev 3:**

GOPOD byla zředěn destilovanou vodou na celkový objem 1 000 ml.

##### **Úprava kit láhev 4:**

Reakční směs GOPOD byl rozpuštěn v 20 ml v acetátovém pufru pH 5 a následně kvantitativně převeden do celkového objemu acetátového pufru pH 5. Vzniklý roztok byl obalen alobalem (ochrana před světlem) a uchován při -20 °C.

#### **4.4.3 Solubilizace a částečná hydrolýza celkových glukanů ( $\alpha$ -glukan, $\beta$ -glukan, D-glukózy v oligosacharidech, sacharóze a volná D-glukóza)**

Do kultivačních zkumavek s uzávěrem bylo naváženo 50 mg namletého vzorku. Bylo přidáno 1 ml 12M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Vzorek byl promíchán a uložen do ledové lázně na 2 hodiny, zkumavky byly uzavřeny uzávěrem. Během lázně byl vzorek několikrát promíchán na vortexu. Poté bylo přidáno 2 ml destilované vody, obsah byl vortexován 10 sekund a následně bylo znovu přidáno 3 ml destilované vody. Zkumavky byly vloženy do vroucí lázně na 2 hodiny, po 5 minutách byly zkumavky zazátkovány. Vzorek byl následně ochlazen na laboratorní



teplotu a byly uvolněny uzávěry. Bylo napipetováno 3 ml hydrolyzátu a 1,5 ml 10M KOH do 50 ml centrifugační zkumavky. Pomocí acetátového pufru pH 5 byl roztok vzorku doplněn na výsledný objem 25 ml. Vzorek byl centrifugován při 1 500 rpm o dobu 10 minut. Hydrolyzáty byly připraveny k okamžitému měření.

#### **Měření celkových glukanů ( D-glukóza v sacharóze a volné D-glukózy)**

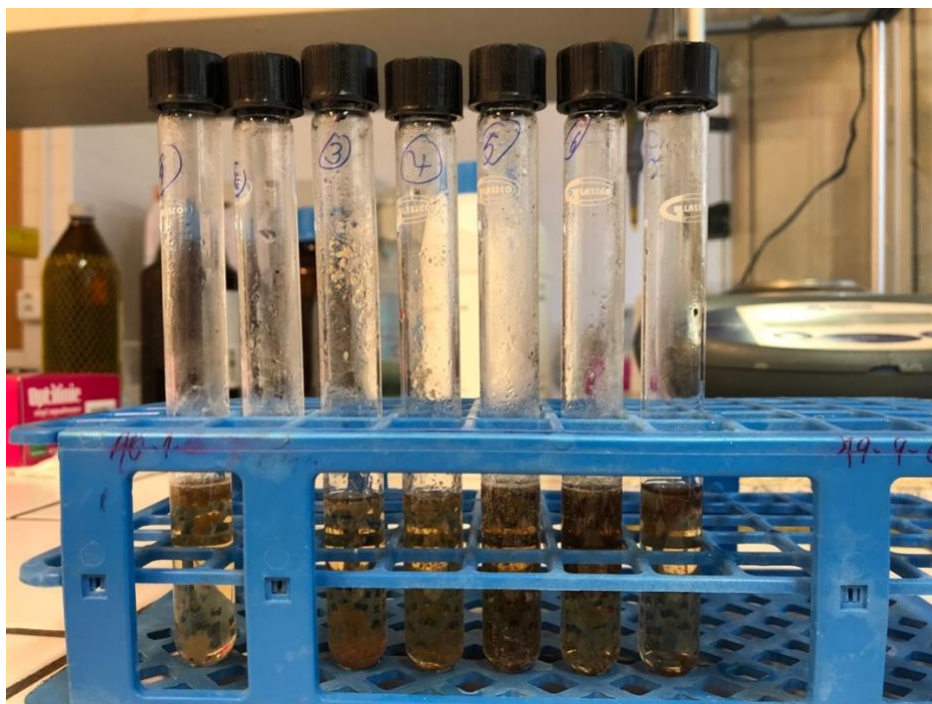
Bylo napipetováno 50  $\mu$ l hydrolyzátu (viz. 4.4.3) a 50  $\mu$ l upravené části kitu (láhev 1). Obsah roztoku byl promíchán na vortexu. Vzorek byl inkubován na 1 hodinu ve vodní lázni při teplotě 40 °C. Poté bylo napipetováno 1,5 ml GOPOD (reakční směs) a vzorek byl ponechán ve vodní lázni při 40 °C po dobu 20 minut. Absorbance byla proměřena při 510 nm. Vzorky byly připraveny v duplikátu. Slepý vzorek (blank) byl připraven 0,1 ml acetátového pufru pH 5 a 1,5 ml GOPOD roztoku. Roztok D-glukózy sloužil jako standard, který byl připraven 0,1 ml kit (láhev č. 5) a 0,1 ml acetátového pufru pH 5.

#### **4.4.4 Solubilizace a hydrolýza $\alpha$ - glukanů (D-glukózy z sacharózy a volné D-glukózy)**

Do kultivačních zkumavek bylo naváženo na analytických vahách 50 mg mletého vzorku. Bylo přidáno 1 ml 2M KOH. Obsah zkumavky byl promíchán a ponechán 20 minut v ledové lázni. Poté bylo přidáno 4 ml acetátového pufru o pH 3,8 a následně byl ihned přidán 0,1 ml části kitu (láhev č. 2). Vzorek byl promíchán na vortexu a ponechán 30 minut ve vodní lázni při 40 °C. Během inkubace byl vzorek několikrát promíchán. Vzorek byl následně kvantitativně převeden do centrifugálních zkumavek. Vzorky byly centrifugovány při rpm 1 500 otáček na 10 minut.

#### **Měření $\alpha$ - glukanu (D-glukózy v sacharóze a volné D-glukózy)**

Do zkumavek bylo napipetováno 50  $\mu$ l hydrolyzátu (viz. 4.4.4) a 50  $\mu$ l upravené části kitu (láhev 1). Dále bylo přidáno 1,5 ml GOPOD směsi. Vzorek byl ponechán ve vodní lázni při 40 °C na 20 minut. Absorbance byla proměřena při 510 m. Vzorky byly připraveny v duplikátu. Blank a standard byly připraveny stejným způsobem jako při měření celkových glukanů.



Obrázek 38 Hydrolyza glukanů

#### 4.5 Stanovení polyfenolů

Polyfenoly jsou látky, které jsou odvozené od fenyylpropanu. Jsou nedílnou součástí lidské potravy. Při reakci s činidlem Follin-Ciocalteu vzniká modrý komplex. Intenzita modrého zbarvení je závislá na koncentraci hydroxylových látek [71].

Do zkumavky byl napipetován 1 ml Follin-Ciocalteuova činidla, které bylo předem zředěno vodou (poměr 1:9). Byl dále přidán 1 ml destilované vody a 50  $\mu$ l vzorku (viz. kap. 4.2). Obsah zkumavky byl promíchán a ponechán stát při laboratorní teplotě na 5 minut. Poté byl přidán 1 ml nasyceného roztoku uhličitanu sodného. Roztok byl promíchán a ponechán 15 minut stát. Absorbance byla měřena při 750 nm proti blanku, kde byla místo vzorku přidána voda. Každý vzorek byl analyzován třikrát. Po sestrojení kalibrační křivky byl použit stejný postup. Jako standard byla použita kyselina gallová o koncentracích v rozmezí 0,1-0,7 mg/ml. Ze získaných dat byl sestrojen graf kalibrační závislosti.

#### 4.6 Stanovení flavonoidů

Flavonoidy jsou přírodní látky, u kterých se nejvíce sleduje antimikrobiální aktivita. Míra antioxidačních účinků je závislá na počtu a poloze hydroxylových skupin v struktuře. Flavonoidy jsou odvozené od kyslíkaté heterocyklické sloučeniny flavanu, který je tvořen dvěma benzenovými jádry, spojený heterocyklickým pyranem. Patří mezi hydroxylované aromatické sloučeniny [72].

Metoda je založená na změně zbarvení roztoku s hlinitou solí, kterou vyvolá přítomnost flavonoidů. Intenzita oranžového zbarvení je závislá na koncentraci přítomných flavonoidů. Absorbance se měří při 510 nm, jako standard se používá katechin [71].

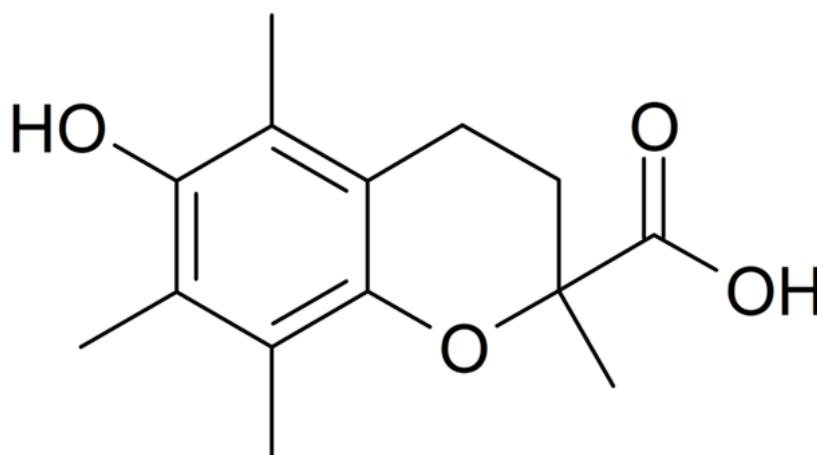
Do zkumavky bylo přidáno 0,5 ml extraktu (viz kap.4.3), 1,5 ml destilované vody a 0,2 ml 5%  $\text{NaNO}_2$ . Obsah zkumavky byl promíchán a ponechán na 5 minut stát. Poté bylo přidáno 0,2 ml 10%  $\text{AlCl}_3$ . Obsah byl promíchán a ponechán 5 minut stát. Bylo přidáno 1,5 ml  $\text{NaOH}$

o koncentraci 1 M a 1 ml destilované vody. Roztok byl promíchán a nechán stát po dobu 10 min při laboratorní teplotě. Následně byla změřená absorbance při vlnové délce 510 nm. Vzorčky byly proměřeny třikrát.

#### 4.7 Stanovení antioxidační aktivity

Pro určení antioxidační aktivity extraktů byla použita metoda, která využívá činidlo ABTS (2,2-azinobis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonová kyselina). Principem metody je sledovat schopnost vzorku zhaset kation- radikál  $ABTS^{\bullet+}$ . Stanovení se měří spektrofotometricky.

ABTS se měří spektrofotometricky při vlnové délce 734 nm. Výsledné množství se udává v ekvivalentech syntetického derivátu Troloxu [71].



Obrázek 39 Molekula Troloxu[65]

V prvním kroku byl připraven kationt-radikál  $ABTS^{\bullet+}$  do 10 ml odměrné baňky. ABTS byl rozpuštěn v destilované vodě na koncentraci 7mM, kde byl přidán peroxidisíran draselný o koncentraci 2,45 mM a baňka byla doplněna destilovanou vodou po rysku. Vzorek byl obalen alobalem a ponechán po dobu 12 hodin stát ve tmě, při pokojové teplotě, k dalšímu využití. Před měřením podle TEAC byl ABTS zředěn etanolem pro UV-VIS na absorbanci 0,700 při vlnové délce 734 nm. Jako blank byl použit ethanol.

Do zúžené kyvety bylo napipetováno 1 ml upraveného  $ABTS^{\bullet+}$  a 10  $\mu$ l připraveného vzorku (viz. kap.4.3). Byla zaznamenána počáteční hodnota absorbance ( $A_0$ ) a pokles absorbance v desáté minutě ( $A_{10}$ ).

Kalibrace byla připravena ze zásobního roztoku Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid) o koncentraci 400  $\mu$ g/ml. Bylo naváženo 40 mg, navážka byla rozpuštěna ve 100 ml odměrné baňce v 60% vodném roztoku etanolu pro UV-VIS (kalibrace v rozmezí 0-400  $\mu$ g/ml). Měření probíhalo stejně jako měření vzorků, kde slepý vzorek byl použit 60% roztok etanolu pro UV-VIS [71].

Pro výpočet koncentrace byla dosazována hodnota  $\Delta A$  ( $A_0 - A_{10}$ ) a výsledný hodnota antioxidační aktivity byla vyjádřena jako ekvivalent Troloxu.

## 4.8 Stanovení redukujících sacharidů podle Somogyiho – Nelsona

Metoda stanovení redukujících sacharidů je založena na principu redukce měďnatých sloučenin poloacetalovou skupinou sacharidů pomocí Somogyiho činidla. Vzniká sraženina oxidu měďnatého, reaguje s arsenmolybdenanovým činidlem podle Nelsona, kde vzniká barevný komplex. Intenzitu zbarvení měříme spektrofotometricky při vlnové délce 720 nm [73].

Tabulka 2 Složení jednotlivých Somogyi- Nelson činidel

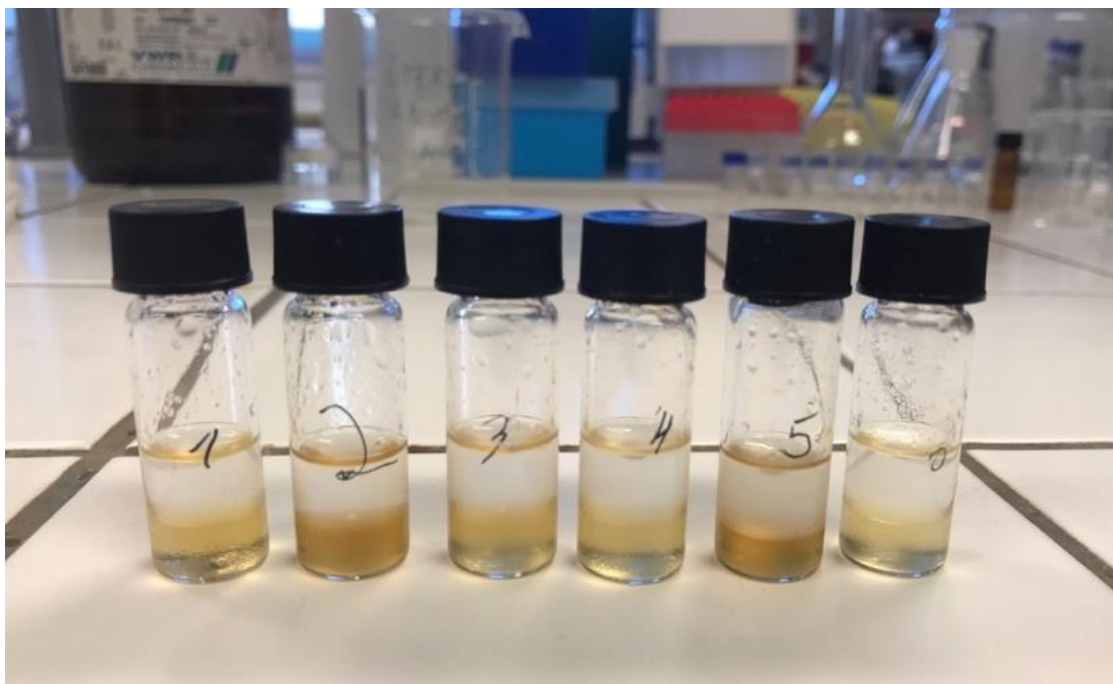
<i>Somogyi – Nelson činidla</i>	
Somogyi-Nelson I	6 g bezvodého Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> , 4 g NaHCO <sub>3</sub> , 3 g vlnanu sodno-draselného (Seignetova sůl), 36 g bezvodého Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (síran sodný) v 200 ml destilované vod
Somogyi-Nelson II	4 g CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O; 24 g Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> síran sodný; 200 ml destilovaná voda
Somogyi-Nelson III	25 g molybdenanu amonný; 21 ml koncentrované kyseliny H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 3 g Na <sub>2</sub> HAsO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O heptahydrát hydrogen arsenitanu sodného; 450 ml destilovaná voda

K 1ml připraveného hydrolyzovaného vzorku bylo přidáno 0,5 ml činidla I a 0,5 ml činidla II. Zkumavka byla promíchána a umístěna do vroucí lázně na dobu 10 minut. Po uplynutí doby byla směs ochlazená na laboratorní teplotu, kde bylo přidáno 0,5 ml činidla III a promíchávána do rozpuštění sraženiny. Následně bylo přidáno 7,5 ml destilované vody. Absorbance byla měřena při vlnové délce 720 nm. Slepý vzorek byl připraven stejným způsobem, místo vzorku se však přidala destilovaná voda. Kalibrační rovnice byla stanovena podle proměření vodného roztoku glukosy v koncentračním rozmezí 0-0,025 g/l.

## 4.9 Plynová chromatografie – stanovení mastných kyselin

### 4.9.1 Transesterifikace lipidů

Do skleněných vialek bylo na analytických váhách naváženo 10 mg vzorku a dále bylo přidáno 1 ml chloroformu a 0,8 ml transesterifikační směsi (15 % H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> v MeOH (p.a.), 500 mg/ml kyseliny heptadekanové jako inertního standardu). Vialky byly za pomoci kleští zazátkovány víčkem. Vzorky byly transesterifikovány v termobloku při 90 °C na 3 hodiny. Po transesterifikaci byly vialky ochlazeny na laboratorní teplotu. Do 5 ml vialek byl následně kvantitativně převeden celý obsah vialky a bylo přidáno 0,5 ml 0,05M roztoku NaOH. Vialky byly uzavřeny víčkem a obsah roztoku byl intenzivně protřepán. Následně bylo sledováno dokonalé oddělení fází. Do nových šroubovacích vialek bylo napipetováno 0,5 ml chloroformové fáze (spodní fáze) a 0,5 ml chloroformu. Vialky byly uchovány v mrazáku a následně proměřeny.



Obrázek 40 Roztoky po transesterifikaci + chloroformu (rozdělení do 2 fází)

#### 4.9.2 Stanovení mastných kyselin pomocí plynové chromatografie s plamenově ionizačním detektorem (GC – FID)

Podmínky stanovení MK (mastné kyseliny) jsou uvedeny níže.

Tabulka 3 Parametry pro stanovení MK

Plynový chromatograf TRACE GC (ThermoQuest S.p.A., Itálie) Autosampler AI/AS 3000	
<b>Kapilární kolona</b>	DB-WAX o rozměrech 30 mx 0,32 mm x 0,5 μm
<b>Oven –teplotní progrm</b>	počáteční teplota: 50 °C na 1 minutu Vzestupný gradient: 25 °C/min do 200 °C s výdrží 0 minut; 3 °C/min do 230 °C s výdrží 30 minut
<b>Celková doba analýzy</b>	47 minut
<b>Teplota injektoru</b>	250 °C
<b>Splitless time</b>	1 minuta, 1:20 průtok/min
<b>Dávkování</b>	autosampler bez děliče toku (splitless), 1 μl
<b>Nosné plyny</b>	Průtok dusíku: 1 ml/min
<b>Průtoky plynů v detektoru</b>	Vzduch 350 ml/min
	Vodík: 35 ml/min
	Make-up dusíku: 30 ml/min

## 4.10 Stanovení proteinů dle Hartree-Lowryho

Toto stanovení patří mezi spektrofotometrické kolorimetrické metody, je založeno na použití trojsložkových činidel. Dochází k interakci proteinů s ionty mědi za vzniku chelátů. Při přidání třetího činidla Folin-Ciocalteu, který obsahuje polykyseliny fosfomolydenové a fosfowolframové se redukují tyrozinové zbytky proteinů ve vzorku a roztok se barví do modra. Dle intenzity zbarvení je stanovena koncentrace proteinů. Absorbance se proměřují při vlnové délce 650 nm [71].

Tabulka 4 Složení jednotlivých činidel pro stanovení proteinů

Činidlo A	0,2 g tetrahydrátu vinanu sodno-draselného, 10 g Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> , 50 ml 1M NaOH, doplněno destilovanou vodou na objem 100 ml
Činidlo B	2g tetrahydrátu vinanu sodno-draselného, 1 g CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O, 10 ml 1M NaOH, doplněno destilovanou vodou na objem 100 ml
Činidlo C	Folin-Ciocalteu roztok naředěný s destilovanou vodou v poměru (1:15)

K 1 ml extraktu (viz. 4.3.) bylo přidáno 0,9 ml Hartree-Lowryho činidla A. Poté byl roztok inkubován ve vodní lázni při 50 °C. Po ochlazení roztoku na laboratorní teplotu bylo přidáno 0,1 ml činidla B. Vzniklý roztok byl promíchán a inkubován 10 minut při laboratorní teplotě. Následně byly přidány 3 ml činidla C. Roztok byl promíchán a inkubován ve vodní lázni 10 minut při 50 °C. Poté byl vzorek opět ochlazen na laboratorní teplotu. Absorbance byla měřena při vlnové délce 650 nm. Kalibrační křivka byla sestavena stejným postupem s použitím roztoku albuminu o koncentracích 0-250 µg/ml.

## 4.11 Cytotoxický test

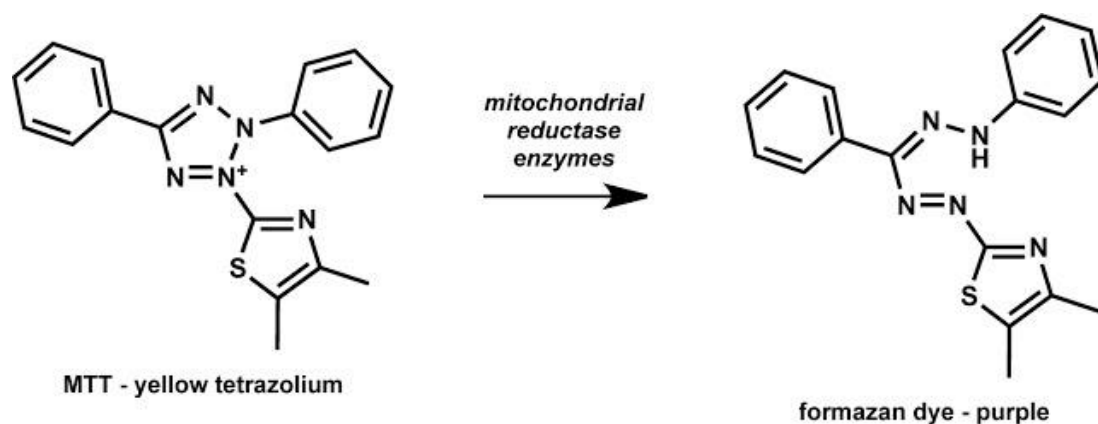
### 4.11.1 Počítání buněk

Z připravených buněk bylo napipetováno 50 µl roztoku a 50 µl trypanové modři. Roztoky byly napipetovány na Bürkerovu komůrku. Pomocí mikroskopu byly spočítány buňky, které byly spočítány v každém čtverci mřížky a následně byl vypočítán průměr, ze kterého byla stanovena koncentrace na 1 ml. Pro provedení testu byl nutný celkový počet buněk 10<sup>4</sup>/100 µl.

### 4.11.2 MTT test

MTT 3-[4, 5-dimethyl-2-thiazolyl]-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromid je tetrazoliová sůl žlutého zbarvení. MTT test je kolorimetrická metoda, kdy MTT v živých buňkách je redukován pomocí mitochondriálních dehydrogenáz na modro-fialovou sraženinu tzv. formazan. Před samotným měřením je nutné tuto sraženinu rozpouštět. Test je proveden spektrometricky a vyhodnocením se získá množství formazanu, který vykazuje životaschopnost buněk. Čím tmavší barva roztoku, tím je pravděpodobnější větší přítomnost živých buněk [74].





Obrázek 41 Schéma reakce MTT [74]

Použité buněčné linie:

**HaCaT** – keratinocyty – imortalizované (schopnost neomezeného buněčného dělení)

**B16F1** – kožní nádor - melanomy

Na MTT test byla využita 96 jamková destička, která je tvořena osmi řadami (A-H) a dvanácti sloupci. Bylo napipetováno 100  $\mu$ l buněk do každé jamky, do krajních jamek byl napipetován pufr PBS (zamezení vysychání buněk). Destička byla ponechána na 24 hodin inkubovat v termostatu při 37  $^{\circ}$ C. Po uplynutí inkubace bylo do jamek přidáno 20  $\mu$ l vzorku. Jamky byly napipetovány s různou koncentrací (dvojkové ředění). Následně byla destička ponechána na 24 hodin inkubovat při 37  $^{\circ}$ C. Po inkubaci bylo přidáno 20  $\mu$ l MTT roztoku a po dalších třech hodinách bylo napipetováno 100  $\mu$ l roztoku SDS (dodecylsírán sodný). Připravená destička byla ponechána minimálně na 24 hodin ve tmě a poté pomocí ELISA reader byla proměřena absorbance při vlnové délce 540. Test proveden dvakrát s každou buněčnou kulturou HaCaT a B16F1.

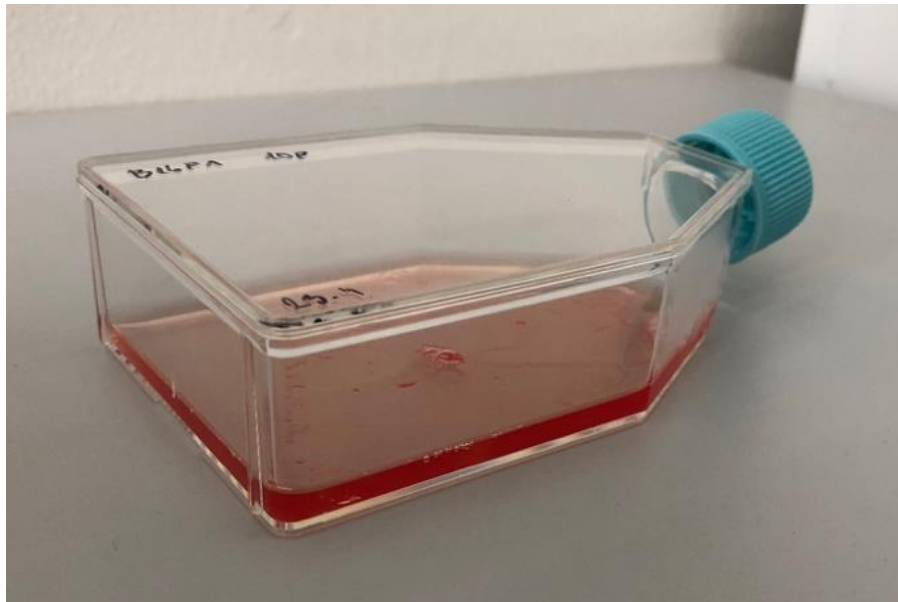


Obrázek 42Burkerova komůrka





*Obrázek 43 Inverzní mikroskop na počítání buněk*



*Obrázek 44 Kultivační láhve s buňkami*

## 4.12 Stanovení těžkých kovů pomocí ICP - OES – emisní spektrometrie s vázaným indukčním plazmatem

### 4.12.1 Příprava vzorků

Na analytických vahách byla naváženo 100 mg lyofilizovaných vzorků do teflonových patron. Ke vzorkům bylo přidáno 5 ml 67% kyseliny dusičné a 2 ml 30% peroxidu vodíku. Teflonové patrony byly umístěny do mikrovlnné rozkladné pece Milestone, kde byl proveden rozklad vzorků. Mineralizované vzorky byly následně kvantitativně převedeny do 25 ml odměrných baněk a doplněny ultračistou deionizovanou vodou. Po důkladném promíchání byly vzorky převedeny do plastových zkumavek. Takto připravené vzorky byly připraveny na měření pomocí ICP-OES.

*Tabulka 5 Parametry rozkladu v mikrovlnné peci Milestone*

Krok	Čas (min)	Výkon (W)
1	2	250
2	2	0
3	6	250
4	5	400
5	5	600



*Obrázek 45 Mikrovlnná pec Milestone*

#### 4.12.2 Stanovení těžkých prvků

Měření bylo provedeno pomocí ICP- OES na přístroji Horiba Yvone, typ Ultima 2. Jako plazmový plyn a plyn pro proplach sloužil argon. Plazmový hořák generoval plazma v konfiguraci s radiálním uložením. Vzorek byl převeden do zmlžovače pomocí peristaltické pumpy. Vzorek byl zmlžován pomocí konického zmlžovače, který byl zavedený do cyklonické mlžné komory, který přímo navazoval na plazmový hořák. Ve vzorcích hub bylo stanoveno osm prvků: hliník, arsen, beryllium, baryum, kadmium, kobalt, chrom a olovo.

Tabulka 6 Parametry optické částí ICP-OES

Prvek	Vlnová délka (nm)	Napětí fotonásobiče (V)	Vstupní štěrbin (μm)	Výstupní štěrbin (μm)
Al	396,152	750	20	15
As	193,695	750	20	15
Ba	230,424	750	20	15
Be	234,861	750	20	15
Cd	214,438	750	20	15
Co	228,616	750	20	15
Cr	205,552	750	20	15
Pb	216,999	750	20	15

Tabulka 7 Nastavení metody ICP-OES

Výkon (W)	1 400
Otáčky pumpy (ot/min)	18
Plazmový plyn (l/min)	12,5
Stínící plyn (l/min)	0,2
Tlak na zmlžovači (bar)	3

Kalibrace je na základě vytvořeného blanku, který se připravil stejně jako při přípravě vzorků. Zvolený koncentrační rozsah je uvedený níže v tabulce Tabulka 8. Blank byl vytvořen rozkladem kyseliny dusičné a peroxidu vodíku (bez naváženého vzorku).

Tabulka 8 Koncentrace standardů pro ICP-OES

Prvek	Koncentrační rozsah (mg/l)
Al, As, Ba, Be, Cd, Co, Cr, Pb	0,05 – 0,1 – 0,5 – 1

#### 4.13 Kultivace organismů

Ke kultivaci byly použity bakteriální kmen *Micrococcus luteus* (grampozitivní) a *Serratia marcescens* (gramnegativní) a kvasinka *Candida glabrata*. Práce byla provedena ve sterilním boxu a kultury byly očkovány na tekuté a tuhé médium. Před kultivací byla

média vždy sterilizována v tlakovém hrnci s otevřeným ventilem po dobu 60 minut. Pro kultivaci mikroorganismů bylo použito 30 ml příslušného média do 100 ml Erlenmayerové baňky. Inkubace byla prováděna při 37 °C.

#### **4.13.1 Příprava vzorků na stanovení antibakteriální antimikrobiální aktivity**

Byly vybrány určité vzorky na stanovení antibakteriální, antimikrobiální aktivity podle nejvyšší antioxidační aktivity podle metody v kapitole 4.7. Byla vytvořena koncentrační řada a jejich navážky byly: 0,05; 0,1; 0,2 a 0,3 g/ 10 ml vzorku.

#### **4.13.2 Příprava média pro *Micrococcus luteus* a *Serratia marcescens***

Na přípravu tekutého média bylo použito:

- 5 g/l peptonu
- 3 g/l beef extraktu
- 3 g/l NaCl

Na tuhé médium byl přidán agar o koncentraci 20 g/l. Po sterilizaci bylo ještě horké médium rozlito do Petriho misek.

#### **4.13.3 Příprava média pro *Candida glabrata***

Na přípravu tekutého média bylo použito:

- 20 g/l glukosy
- 10 g/l peptonu
- 10 g/l kvasničného extraktu (Yeast extract)

Na přípravu tuhého média byl přidán agar v množství 20 g/l. Po sterilizaci bylo ještě horké médium rozlito na Petriho misky.

#### **4.13.4 Agarová difúzní metoda**

Nejprve byly zaočkovány vybrané MO kultury do tekutých médií na 24 hodin, aby došlo k nárůstu MO. Po 24 hodinách bylo napipetováno 100 µl MO na agarovou misku, které byly rozetřeny sterilní hokejkou. Misky byly ponechány na 20 minut stát. Poté bylo na miskách vytvořeno 5 jamek. Do jamek bylo napipetováno 80 µl antimikrobiálního vzorku (vodný extrakty hlívy ústřičné a shiitake). Jako blank byla použita voda. Po 24 hodinách byla sledována velikost inhibiční zóny v okolí jamek. Inhibiční zóny byly změřeny a zaznamenány. Vzorky byly připraveny v duplikátu.

## 5 VÝSLEDKY A DISKUSE

Tato diplomová práce byla zaměřena na studium vyšších hub, kdy byla stanovena celková charakterizace obsahových látek, především množství  $\beta$ -glukanů a vybrané biologické účinky.

K diplomové práci byly vybrány vzorky jako houževnatec jedlý, hlíva ústřičná, boltcovitka bezová a žampion dvouvýtrusý (bílý a hnědý kmen). Při experimentální části byly připraveny extrakty vodné i etanolové, kde byl použit 5 % vodný roztok ethanolu.

U takto připravených extraktů byly sledovány obsahy aktivních látek (polyfenoly, flavonoidy), antioxidační aktivita a množství redukujících sacharidů, proteinů. Pomocí plynové chromatografie byly identifikovány mastné kyseliny.

V poslední experimentální části byla věnována pozornost antimikrobiální a cytotoxické aktivitě. Byly vybrány extrakty s nejvyšší antioxidační aktivitou, které byly podrobeny antimikrobiálním a MTT testu. Na závěr diplomové práce proběhla analýza těžkých kovů ve vzorcích hub.

### 5.1 Příprava materiálů – sušení

Nejvhodnější metodou pro uchování hub je sušení. Největší ztrátu na hmotnosti houby je jednoznačně voda, která tvoří 80–95 % celkové hmotnosti. V Tabulka 9 lze vidět procentuální podíl vody, obsažených v jednotlivých druzích hub. Byl vypočítán procentuální obsah sušiny z celkové hmotnosti pomocí vztahu viz. Rovnice 2, který je vypočítán pomocí hmotnostního zlomku, vyjádřeného v procentech, kdy  $m_A$  vyjadřuje podíl sušiny a  $m_C$  je celková hmotnost.

*Rovnice 2 Vztah pro hmotnostní zlomek*

$$w = \frac{m_A}{m_C}$$

*Tabulka 9 Hmotnosti vzorků hub před a po sušení*

	Hmotnost před sušením [g]	Hmotnost sušiny[g]	w [%]	voda [%]
shiitake	66	8	12,12	87,88
hlíva ústřičná	72	6	8,33	91,67
žampion bílý	83	10,5	12,65	87,35
žampion hnědý	100	16	16,00	84,00

Nejvyšší obsah vody byl přítomen v hlívě ústřičné (91,7 %) a v shiitake, kde byla naměřena hodnota 87,9 %. Naopak nejméně vody bylo přítomno v žampionu hnědém.

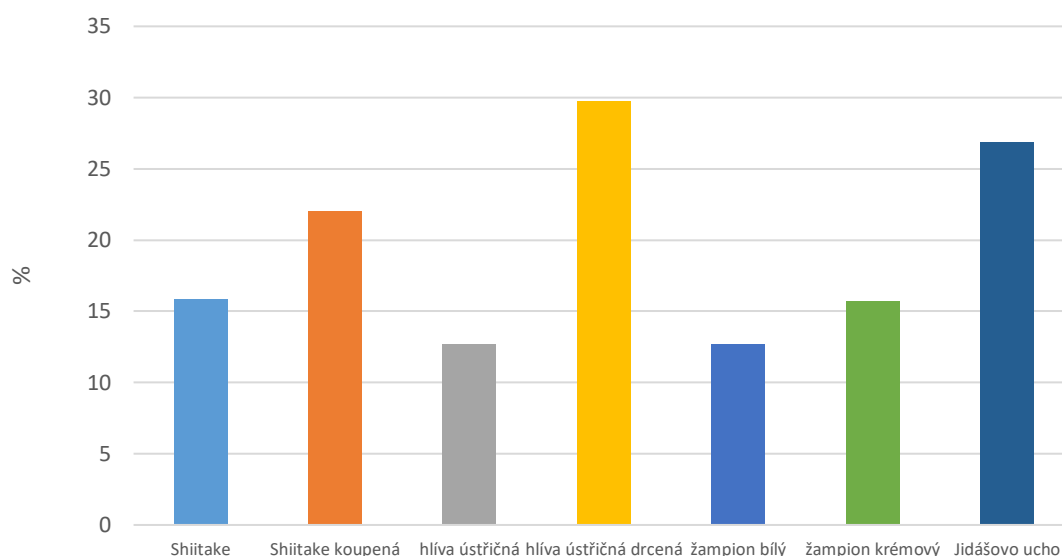
### 5.2 Stanovení $\alpha$ -glukanů, $\beta$ -glukanů a celkových glukanů

Podle postupu kap. 4.4 bylo stanoveno celkové množství  $\beta$ -glukanů v jednotlivých typech hub. Byly proměřeny absorbance celkových a  $\alpha$ -glukanů dle certifikované enzymatické metody společnosti Megazyme. Před začátkem měření bylo nutné hydrolyzovat (rozklad na jednotky D-glukózy) vzorky a následně byl použit enzymatický rozklad. Součástí kitu byl od výrobce přiložen postup na výpočet množství celkových,  $\alpha$ - a  $\beta$ -glukanů (viz Příloha 2).

Do tabulky byly potom zaznamenány hodnoty naměřených absorbancí vzorků, standardu a jejich navážky. Hmotnostní procento je vztažen na celkovou navážku 50 mg suché hmoty.

Tabulka 10 Obsah jednotlivých  $\alpha$ - ,  $\beta$ - a celkových glukaniů

	<b>Celkové glukany (%w/w)</b>	<b><math>\alpha</math>-glukany (%w/w)</b>	<b><math>\beta</math>- glukany (%w/w)</b>
Shiitake	15,84	0,79	15,05
Shiitake koupená	22,04	3,87	18,17
hlíva ústříčná	12,65	1,63	11,02
hlíva ústříčná drcená	29,69	4,02	25,67
žampion bílý	12,65	0,87	11,78
žampion krémový	15,72	3,58	12,14
Jidášovo ucho	26,82	5,45	21,38



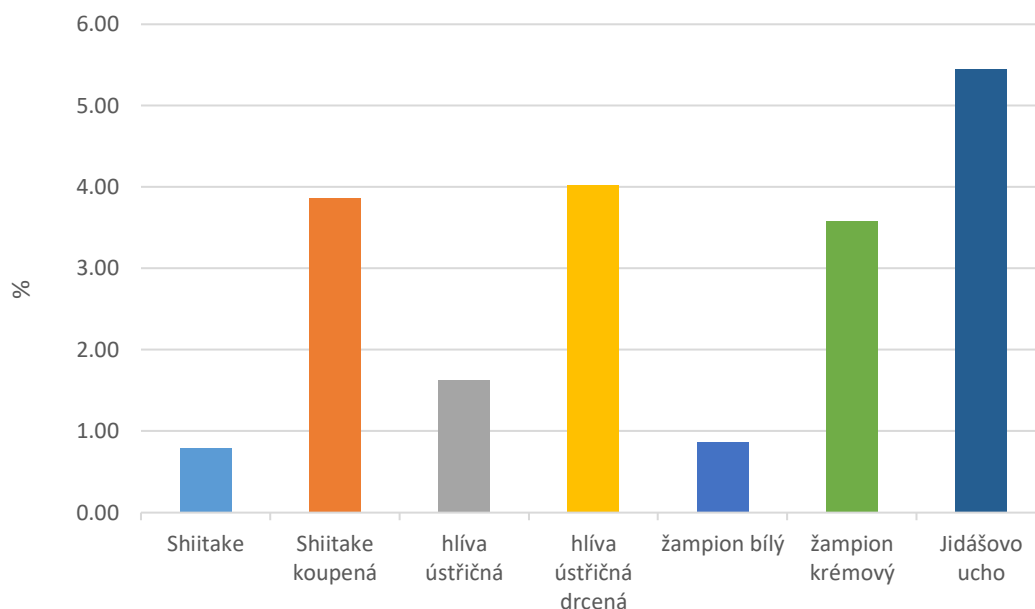
Graf 1 Obsah celkových glukaniů [%]

Dle Graf 1 je zřetelné, že  $\beta$ -glukany se vyskytují ve všech analyzovaných vzorcích hub. Nejvíce glukaniů bylo stanoveno v hlívě ústříčné, která byla zakoupena u společnosti Hlívenka s. r. o. Hlíva byla dodána jako drcený prášek. Dle grafu vidíme, že obsah glukaniů v čerstvé hlívě (sušené) je rapidně nižší. V drcené hlívě je obsah glukaniů kolem 29 % a v sušené hlívě 12%, což je o více než 2x vyšší množství, než obsah glukaniů v sušené. Důvodem rozdílu může být i proces sušení (podmínky a čas) a následné zpracování hlívy ústříčné, ale také rovněž druh hlívy. Vliv může mít i zpracování hlívy do drcené formy, z níž se glukany pravděpodobně lépe extrahují.

Procentuální obsah celkových glukaniů byl zřetelně nižší u vzorků, které byly vlastnoručně usušeny. Rozdíl obsahů komerčních a volně sušených hub může spočívat v konečné fázi zpracování. U hlívy drcené byl materiál zcela rozemletý na prášek, kdežto u sušené hlívy

mohlo dojít k neúplné homogenizaci, kdy mohly ve vzorku zůstat menší kusy houby. Obsah glukanu je také závislý na podmínkách růstu a vývoje.

Je pravděpodobné, že vyšší houby neobsahují pouze glukany, ale i jiné polysacharidy např. galaktany, mannany, trehalózu.



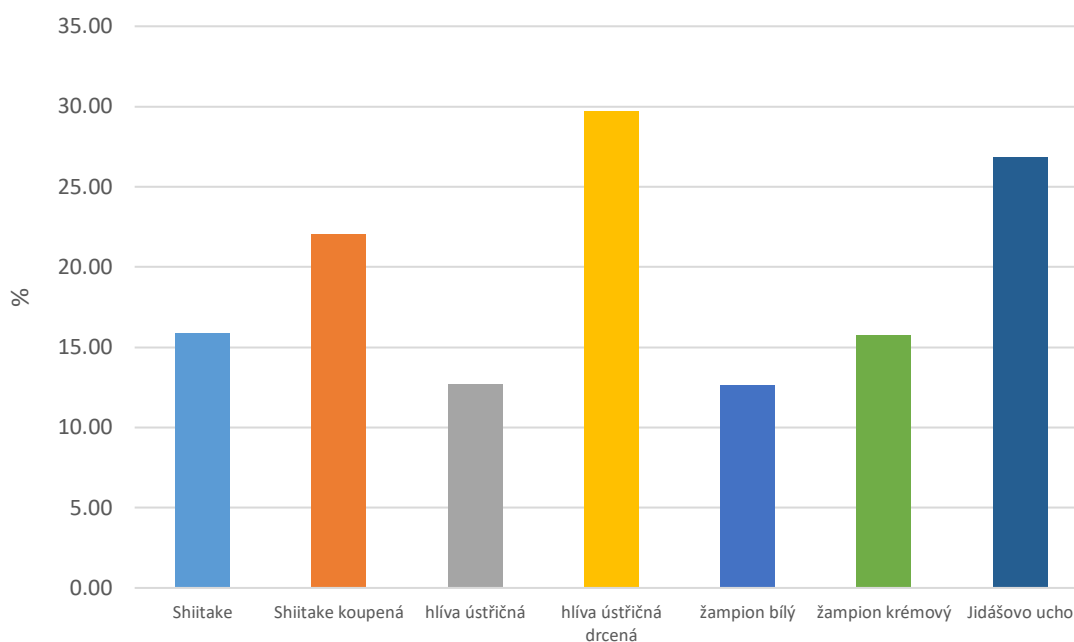
*Graf 2 Obsah  $\alpha$ -glukanů [%]*

Z Graf 2 je zřetelné, že nejnižší obsah  $\alpha$ -glukanů byl naměřen v žampionu bílém a shiitake. Obsah alfa glukanu netvoří ani 1%. Naopak největší výskyt  $\alpha$ -glukanů byl naměřen u boltcovitky bezové, který se pohybuje v rozmezí 5-6%. Celkově je obsah alfa-glukanů v houbách je velmi nízký. Maximální koncentrace dosahuje pouze do 6% sušiny.

Množství beta-glukanů, byl vypočítán z rozdílu obsahů celkových a alfa-glukanů. Nejvyšší obsah beta-glukanů byl přítomen v hlívě ústříčné (drcený prášek), který představuje čtvrtinu z celkového množství glukanu. Průměrný výskyt beta-glukanů ve vyšších houbách je cca 15%. Chyba měření mohla být v distribuci částic. U vzorku hlívy drcené byla sušina zcela namleta na prášek.

Dle dosavadních publikací ne všechny  $\beta$ -glukany jsou rozpustné ve vodě. Závisí to na především na jejich struktuře. Průměrný obsah  $\beta$ -glukanů v hlívě ústříčné je 24% a toto zjištění bylo potvrzeno i v literatuře [75].





Graf 3 Obsah  $\beta$ -glukanů [%]

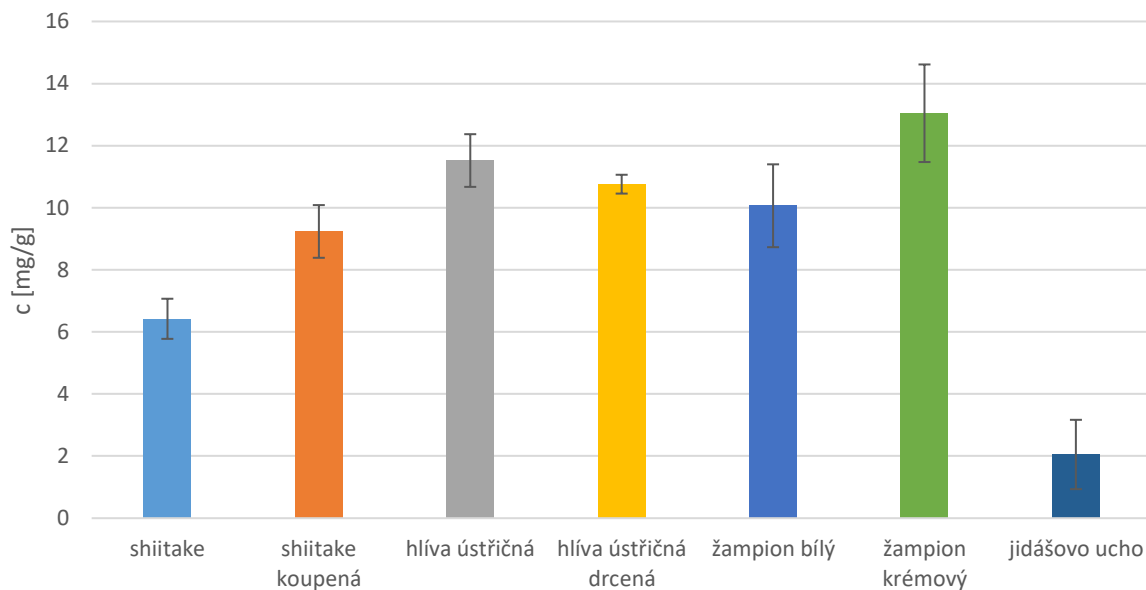
### 5.3 Polyfenoly

Bylo stanoveno množství polyfenolů ve vzorcích podle postupu v kap. 4.5.. Byly použity vodné a 5 % etanolové vzorky, které byly připraveny s koncentrací 0,1 g/10 ml daného rozpouštědla. Vzorek byl vždy přeměřen třikrát a z průměru absorbancí byla pomocí kalibrační křivky stanovena koncentrace polyfenolů. Koncentrace byla dále přepočítaná na množství polyfenolů na mg/g sušiny.

V Tabulka 11 jsou uvedeny všechny výsledné koncentrace polyfenolů, které byly naměřeny ve vodných a etanolových extraktech.

Tabulka 11 Výsledné koncentrace polyfenolů v extraktech

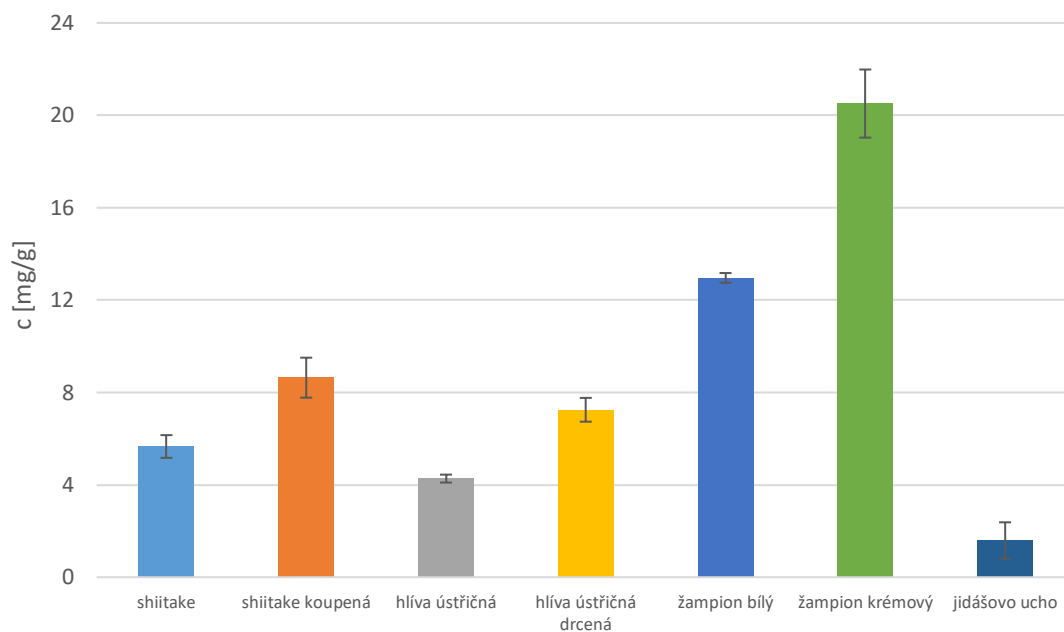
	Vodné extrakty c [mg/g]	Etanolové c [mg/g]
shiitake	6,42 ± 0,65	5,66 ± 0,49
shiitake koupená	9,24 ± 0,85	8,64 ± 0,87
hlíva ústříčná	11,52 ± 0,85	4,27 ± 0,17
hlíva ústříčná drcená	10,76 ± 0,30	7,25 ± 0,52
žampion bílý	10,06 ± 1,33	9,20 ± 0,21
žampion krémový	13,04 ± 1,57	18,90 ± 1,47
Jidášovo ucho	2,05 ± 1,12	1,59 ± 0,79



*Graf 4 Množství polyfenolů ve vodných extraktech*

Z Graf 4 je viditelné, že nejmenší obsah polyfenolů byl přítomen ve vodném extraktu boltcovitky bezové (Jidášovo ucho) 2 mg/g. Naopak nejvyšší obsah polyfenolů obsahoval vodný roztok žampionu krémového (hnědého) 13,04 mg/g.

Porovnáním vodných a etanolových extraktů u žampionu hnědého se koncentrace polyfenolů zvýšila v etanolovém roztoku. Naopak u hlívy se díky použití etanolu snížila koncentrace přítomných polyfenolů. Možným vysvětlením opačného jevu je, že etanol mohl způsobit dehydrataci aktivních složek v hlívě ústříčné.



*Graf 5 Obsah polyfenolů (etanolové extrakty)*

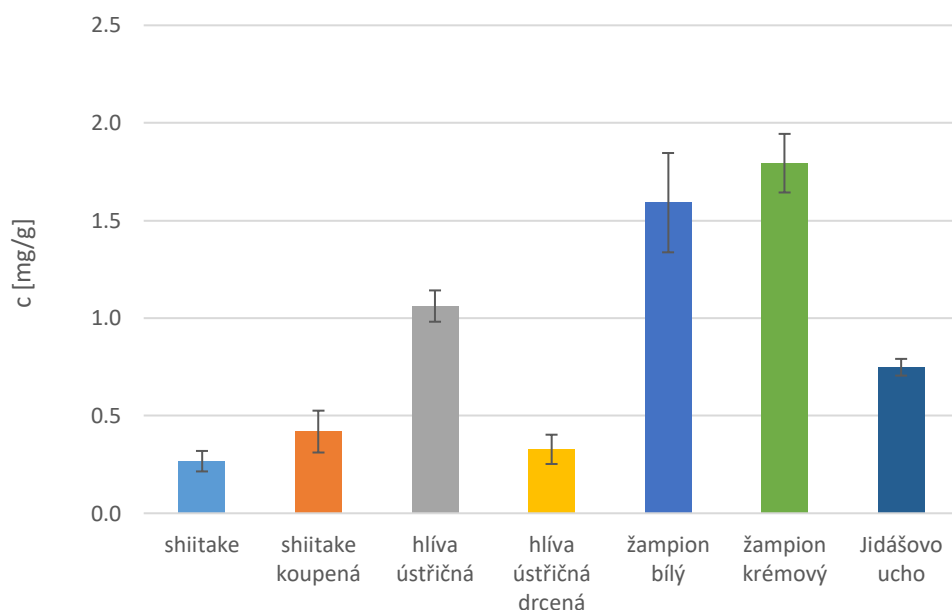
## 5.4 Flavanoidy

Pro stanovení flavanoidů byla sestrojena kalibrační závislost podle postupu v kap. 4.6. Koncentrace flavanoidů byla stanovena spektrometricky a byla z koncentrační řady vypočítána pomocí lineární regrese. Vzorek byl proměřen třikrát a hodnoty byly zprůměrovány. Výsledná koncentrace je uvedena v mg/g sušiny. V Tabulka 12 jsou uvedeny všechny výsledné koncentrace flavanoidů (vodné a etanolové extrakty).

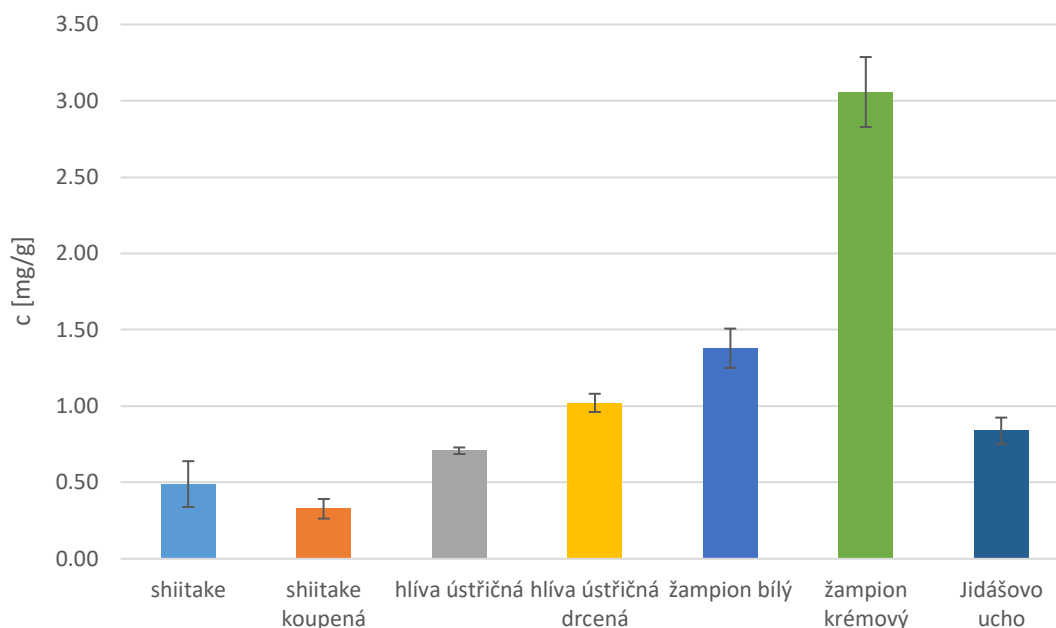
Tabulka 12 Výsledné koncentrace flavanoidů v extraktech

	Vodné extrakty c [mg/g]	Etanolové c [mg/g]
shiitake	0,27 ± 0,05	0,49 ± 0,15
shiitake koupená	0,42 ± 0,11	0,33 ± 0,02
hlíva ústříčná	1,06 ± 0,08	0,71 ± 0,06
hlíva ústříčná drcená	0,33 ± 0,08	1,02 ± 0,13
žampion bílý	1,59 ± 0,25	1,38 ± 0,21
žampion krémový	1,79 ± 0,15	3,06 ± 1,23
Jidášovo ucho	0,75 ± 0,04	0,84 ± 0,09

Podle Tabulka 12 můžeme vidět, že nejnižší koncentrace flavanoidů byla naměřena u shiitake, a to 0,27 mg/g. Celkově flavanoidy ve vzorcích mají nízké obsahy, pohybují se do 3 mg/g. Flavanoidy jsou v houbách přítomny v minimálním množství. Nejsou žádné dosavadní poznatky o přítomnosti fenolických látek ve vyšších houbách. V obou extraktech má nejvyšší koncentraci žampion krémový (hnědý). Hodnoty měření mohou být zkresleny ředěním vzorků.



Graf 6 Obsah flavanoidů (vodné extrakty)



Graf 7 Obsah flavonoidů (etanolové extrakty)

## 5.5 Stanovení redukujících cukrů dle Somogyi – Nelsona

Pro stanovení koncentrace redukujících cukrů byla použita metoda dle Somogyi-Nelsona (viz. kap. 4.8). Koncentrace byla stanovena spektrofotometricky a vypočítána z kalibrační závislosti. Každý vzorek byl měřen třikrát a hodnoty byly následně zprůměrovány. Výsledná koncentrace redukujících cukrů byla přepočítána na  $\mu\text{g/ml}$ . V Tabulka 13 jsou uvedeny výsledné koncentrace redukujících sacharidů.

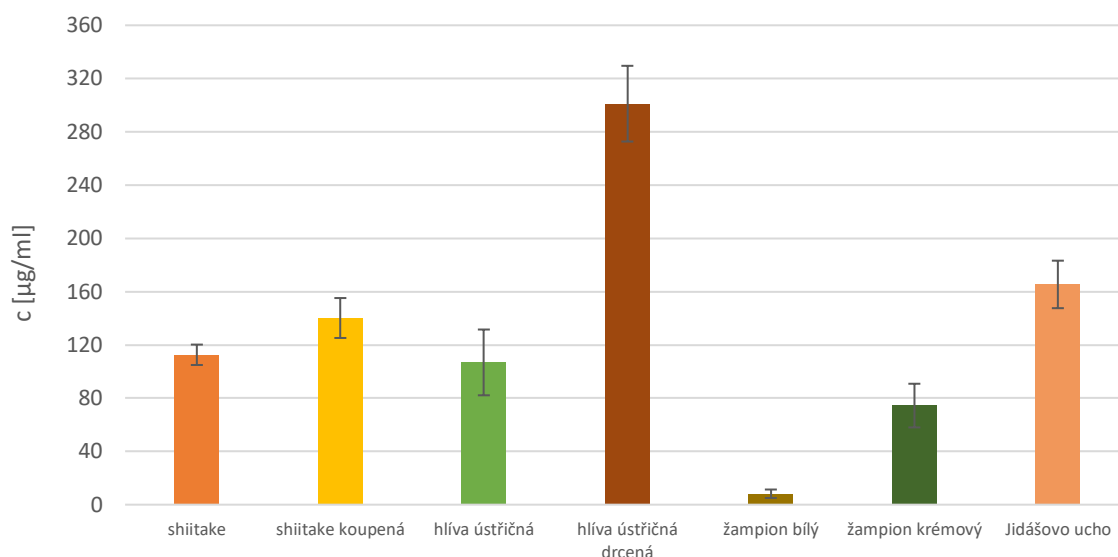
Tabulka 13 Výsledné koncentrace redukujících sacharidů

	Vodné extrakty c [ $\mu\text{g/ml}$ ]
shiitake	112,55 $\pm$ 7,66
shiitake kouspená	140,18 $\pm$ 15,00
hlíva ústříčná	106,85 $\pm$ 24,70
hlíva ústříčná drcená	301,14 $\pm$ 28,44
žampion bílý	8,20 $\pm$ 3,19
žampion krémový	74,41 $\pm$ 16,39
Jidášovo ucho	165,41 $\pm$ 17,84

Z dosažených výsledku dle Graf 8 je patrné, že žampion bílý neobsahuje skoro žádné redukující cukry. Nejvyšší obsah byl stanoven u hlívy drcené, a to 300  $\mu\text{g/ml}$ . Celkové koncentrace redukujících cukrů jsou velmi nízké.

Možnou odchylku měření si můžeme vysvětlit tak, že sacharidy se dostatečně nerozpadly na redukující sacharidy a byla detekována pouze část sacharidů odpovídající množství

volných redukujících konců. Vyšší houby neobsahují pouze redukující cukry, ale také neredukující, jako je např. trehalóza.



Graf 8 Výsledné koncentrace redukujících sacharidů

## 5.6 Antioxidační aktivita

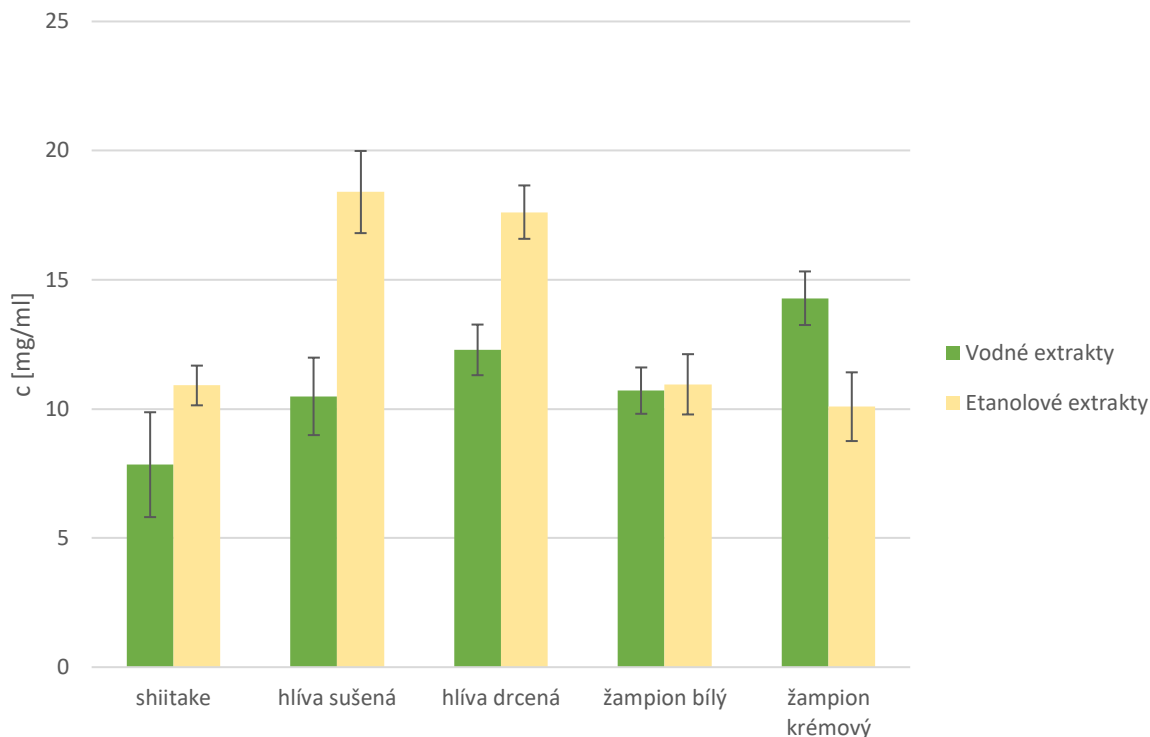
Dle postupu viz. kap. 4.7 byla stanovena antioxidační aktivita ve vodných a etanolových extraktech. Vzorky byly proměřeny v triplikátu a byl z nich vypočítán aritmetický průměr. Výsledná antioxidační aktivita byla přepočítána na mg/g sušiny. V tabulce Tabulka 14 jsou uvedeny výsledné koncentrace antioxidační aktivity.

Tabulka 14 Výsledné koncentrace antioxidační aktivity

	Vodné extrakty c [mg/g]	Etanolové c [mg/g]
shiitake	7,84 ± 2,03	10,91 ± 0,77
hlíva ústříčná	10,48 ± 1,50	18,40 ± 1,59
hlíva ústříčná (drcená)	12,28 ± 0,98	17,62 ± 1,03
žampion bílý	10,71 ± 0,90	10,95 ± 1,17
žampion krémový	14,28 ± 1,04	10,08 ± 1,33

Z dosažených výsledků dle grafu Graf 9 je patrné, že nejvyšší antioxidační aktivitu vykazovaly obecně etanolové extrakty kromě žampionu hnědého. Nejvyšší antioxidační aktivitu měla hlíva ústříčná 18,40 mg/g. Naopak nejnižší antioxidační aktivita byla naměřena u vodného extraktu z shiitake. Obecně můžeme potvrdit, že všechny druhy hub mají antioxidační účinky.

Nebyla však nalezena jednoznačná významná korelace mezi antioxidační aktivitou a obsahem fenolických látek ani glukánů, i když vyšší hodnoty všech parametrů byly nalezeny v drcené hlívě a žampionu hnědém.



Graf 9 Výsledné koncentrace antioxidantní aktivity

### 5.7 Stanovení mastných kyselin pomocí GC-FID (plynová chromatografie s plamenově ionizačním detektorem)

Mastné kyseliny byly stanovené po převedení na methylestery podle postupu viz. kap.4.9.2. Identifikace metylesterů byla na základě porovnání retenčních času identických standardů. Data byla následně zpracována pomocí programu MS Excel.

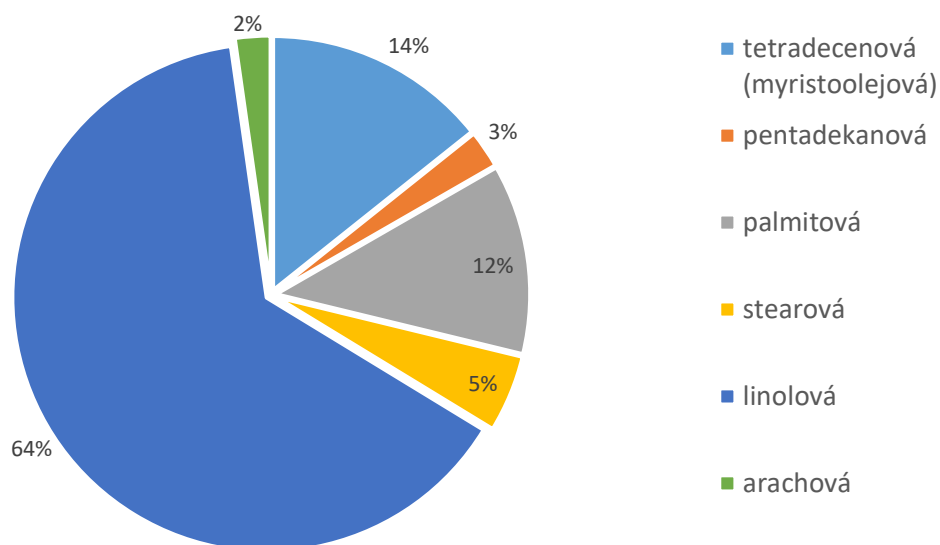
Zastoupení mastných kyselin bylo vyjádřeno mg/g sušiny. Koncentrace jsou vztaženy na reálnou navážku a objem. Níže v tabulce jsou uvedeny obsahy MK v jednotlivých druzích hub.

Tabulka 15 Obsah mastných kyselin identifikovaných v Shiitake čerstvém

Název mastné kyseliny	Symbol	c (mg/g)
tetradecenová (myristoolejová)	C14:0	4,76
pentadekanová	C15:0	0,80
palmitová	C16:0	4,03
stearová	C18:0	1,64
linolová	C18:2	21,32
arachová	C20:0	0,75
Celkový obsah MK	x	33,30

V Tabulka 15 jsou uvedeny mastné kyseliny a jejich koncentrace. Bylo celkem identifikováno 6 MK, největší koncentraci měla kyselina linolová, která představovala více než polovinu celkových MK v shiitake. Přítomnost kyseliny linolové v houbách je také

popsána v publikaci Houby a jejich léčivé účinky (Valíček) [2]. Kyselina linolová (omega 6) je typickým zástupcem rostlinných olejů. Celková koncentrace MK v shiitake je 33,30 mg/g.



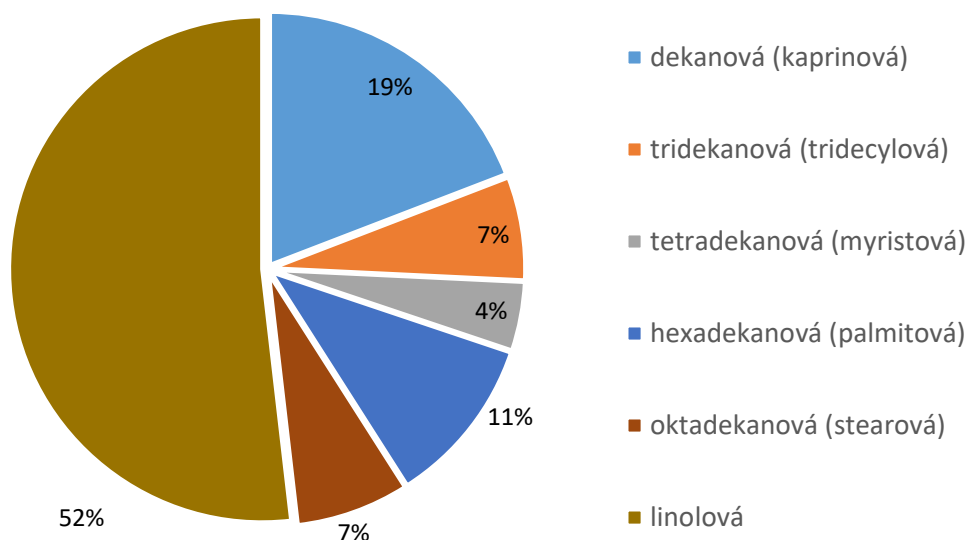
Graf 10 Zastoupení MK v shiitake

V Tabulka 16 jsou uvedeny všechny identifikované MK. Nejvyšší koncentraci mastných kyselin, která je přítomná v koupené shiitake je kyselina linolová. Obsahy v obou vzorcích se shodují (viz. Tabulka 15). U této houby byla také naměřena kyselina kaprinová, která nemá v řetězci žádnou dvojnou vazbu. Tato kyselina se vyskytuje hlavně v palmovém oleji a slouží pro houby jako energetická rezerva [76]. Celková koncentrace MK v shiitake je 39,03 mg/g.

Tabulka 16 Obsah MK shiitake (koupěný)

Název mastné kyseliny	Symbol	c [mg/g]
dekanová (kaprinová)	C10:0	7,48
tridekanová (tridecylová)	C13:0	2,58
tetradekanová (myristová)	C14:0	1,72
hexadekanová (palmitová)	C16:0	4,22
oktadekanová (stearová)	C18:0	2,81
linolová	C18:2	20,23
Celkový obsah MK	x	39,03



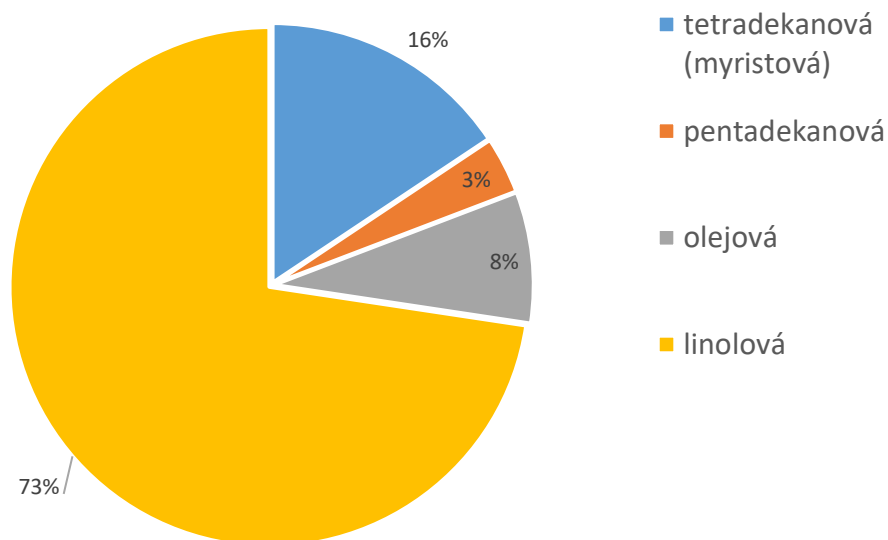


*Graf 11 Procentuální zastoupení MK v shiitake (koupený)*

V Tabulka 17 jsou uvedeny analyzované mastné kyseliny, které byly přítomny v hlívě ústříčné. Nejvyšší zastoupení MK v hlívě představuje kyselina linolová, které tvoří 73 % z celkových MK. Hlíva ústříčná by měla obsahovat až 18 MK [2]. Po analýze bylo identifikováno kolem 10 MK, ale jejich koncentrace byly velmi nízké. Níže jsou uvedeny alespoň 4 MK, které byly zastoupeny nejvíce. V analyzovaném vzorku byla nalezena i kyselina myristová, která je přítomná hlavně v muškátovém oříšku. Tato MK se často přidává do kosmetických přípravků, kde podporuje absorpci kůže [76].

*Tabulka 17 Výsledné obsahy MK v hlívě ústříčné*

Název mastné kyseliny	Symbol	c [mg/g]
tetradekanová (myristová)	C14:0	5,16
pentadekanová	C15:0	1,17
olejová	C18:1	2,70
linolová	C18:2	23,96
Celkový obsah MK	-	34,51

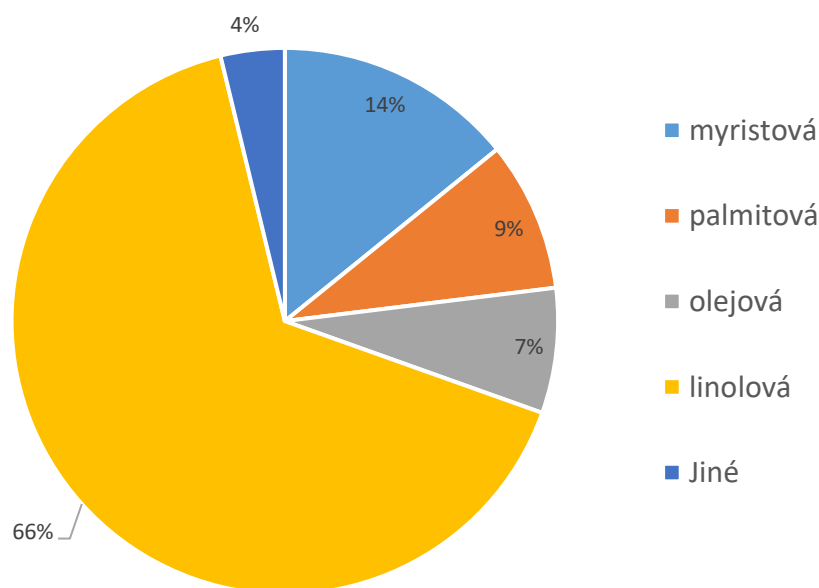


Graf 12 Procentuální zastoupení MK v hlívě ústříčné drcené

V Tabulka 18 jsou uvedené MK, které se vykytovaly v hlívě ústříčné, konkrétně v drceném prášku. Koncentrace je vztahena na mg/g. Při porovnání s hodnotami z Tabulka 17 si můžeme všimnout, že koncentrace kyseliny linolové a olejové jsou shodné. Jediným rozdílem je výskyt kyseliny palmitové, která byla přítomná u práškového vzorku. Koncentrace kyseliny palmitové je velmi nízká. Kyselina palmitová patří mezi MK, které mohou být přirozeně obsaženy v houbách, např. klouzek obecný. Z Graf 13 pak můžeme vidět procentuální zastoupení MK ve vzorku.

Tabulka 18 Obsahy MK v hlívě ústříčné (drcený prášek)

Název mastné kyseliny	Symbol	c [mg/g]
myristová	C14:0	5,16
palmitová	C16:0	3,23
olejová	C18:1	2,70
linolová	C18:2	23,96
Celkový obsah MK	-	34,51



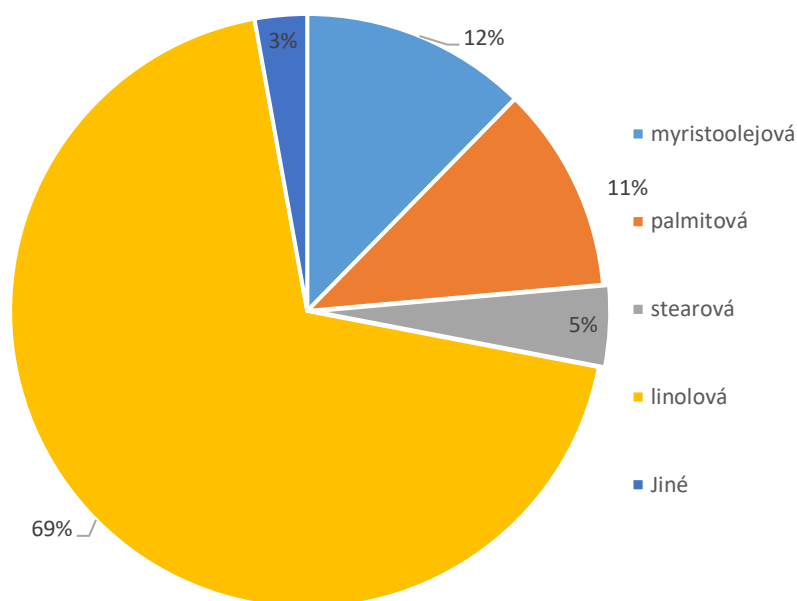
*Graf 13 Procentuální zastoupení MK v hlívě ústříčné*

V Tabulka 19 jsou vyhodnoceny všechny mastné kyseliny, které byly detekovány v žampionu dvouvýtrusém (bílý). Nejvyšší množství v žampionu bílém je kyselina linolová, která patří mezi rostlinné oleje. Kyselina linolová působí jako inhibitor aromatázy (enzym, který napomáhá tělu produkovat estrogen). Konzumace hub může působit jako prevence proti onemocněním, např. rakovina prsu [77].

Dále v Graf 14 jsou vyjádřeny procentuální zastoupení jednotlivých MK ve vzorku žampionu bílého. Nejnižší množství MK v žampionu bílém je kyselina stearová o koncentraci 1,94 mg/g. Celková koncentrace přítomných MK je 35,06 mg/g.

*Tabulka 19 Obsahy a nalezené MK v žampionu dvouvýtrusém (bílý)*

Název mastné kyseliny	Symbol	c [mg/g]
myristoolejová	C14:0	5,39
palmitová	C16:0	4,91
stearová	C18:0	1,94
linolová	C18:2	30,18
Jiné	-	1,24
Celkový obsah MK	-	43,50



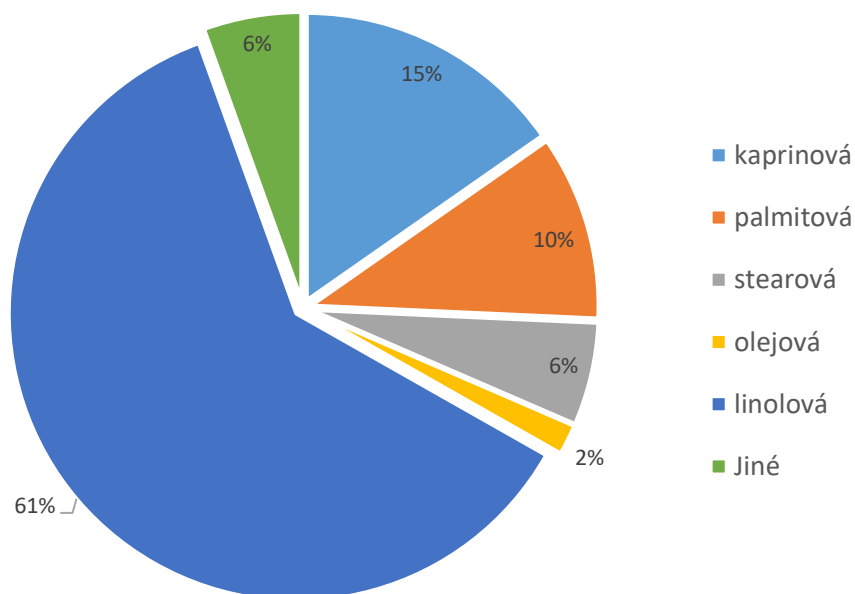
Graf 14 Procentuální zastoupení MK v žampionu bílém

V žampionu hnědém převažuje také kyselina linolová. Celkově v extraktu byly stanoveny velmi nízké koncentrace MK. V Tabulka 20 jsou uvedeny všechny identifikované MK.

Do tabulky bylo vybráno 5 MK, které byly zastoupeny v největší míře. Kyselina linolová tvoří 61 % ze všech mastných kyselin. I když kyselina linolová patří mezi rostlinné oleje, je jednou z hlavních mastných kyselin vyskytujících se v houbách. Můžeme si to vysvětlit tím, že houby byly v starších systémech zařazeny mezi říší rostlin a některé obsahové látky mají společné.

Tabulka 20 Výsledné koncentrace MK v žampionu hnědém (krémovém)

Název mastné kyseliny	Symbol	c [mg/g]
kaprinová	C10:0	5,76
palmitová	C16:0	3,93
stearová	C18:0	2,18
olejová	C18:1	0,64
linolová	C18:2	23,09
Jiné	-	2,07
Celkový obsah MK	-	37,66

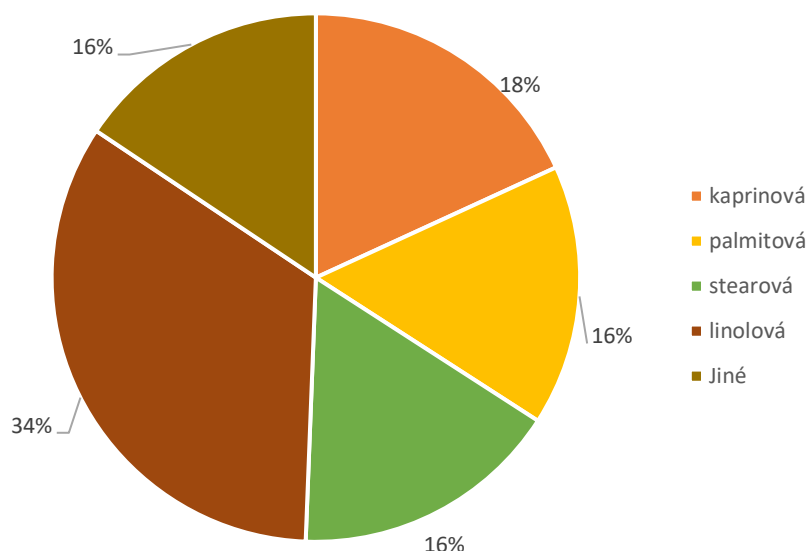


Graf 15 Procentuální zastoupení MK v žampionu hnědém (krémovém)

V Tabulka 21 jsou uvedeny mastné kyseliny, které se vyskytují v boltcovitce bezové (Jidášovo ucho). Je patrné, že obsahy mastných kyselin v houbě jsou velmi nízké. Množství všech mastných kyselin jsou pod hranicí 10 mg/g. Boltcovitka má ze všech vyhodnocených hub nejmenší obsah mastných kyselin. Díky přítomnosti tuků v houbách se mění chuť každé houby. Nyní si dokážeme vysvětlit, proč chuť Jidášova ucha je velmi mdlá až žádná [78].

Tabulka 21 Výsledné koncentrace MK v boltcovitce bezové (Jidášovo ucho)

Název mastné kyseliny	Symbol	c [mg/g]
kaprinová	C10:0	3,06
palmitová	C16:0	2,69
stearová	C18:0	2,78
linolová	C18:2	5,69
Jiné	-	2,63
Celkový obsah MK	-	14,13



Graf 16 Procentuální zastoupení MK v boltcovitce bezové

Největší zastoupení ze všech MK ve vzorcích hub, měla kyselina linolová, které ve většině tvořila více než polovinu celkových MK. Největší koncentraci mastných kyselin byl stanoven u žampionu dvouvýtrusém (bílý) 50 mg/g, naopak nejmenší byla u boltcovitky bezové - 14,13 mg/g. Obsah MK se liší od jednotlivých druhů hub. Chuť každé houby je závislý na množství MK. Při porovnání chutí u žampionu bílém a boltcovitky, můžeme říci, že žampion má mnohem výraznější chuť.

## 5.8 Stanovení celkových proteinů

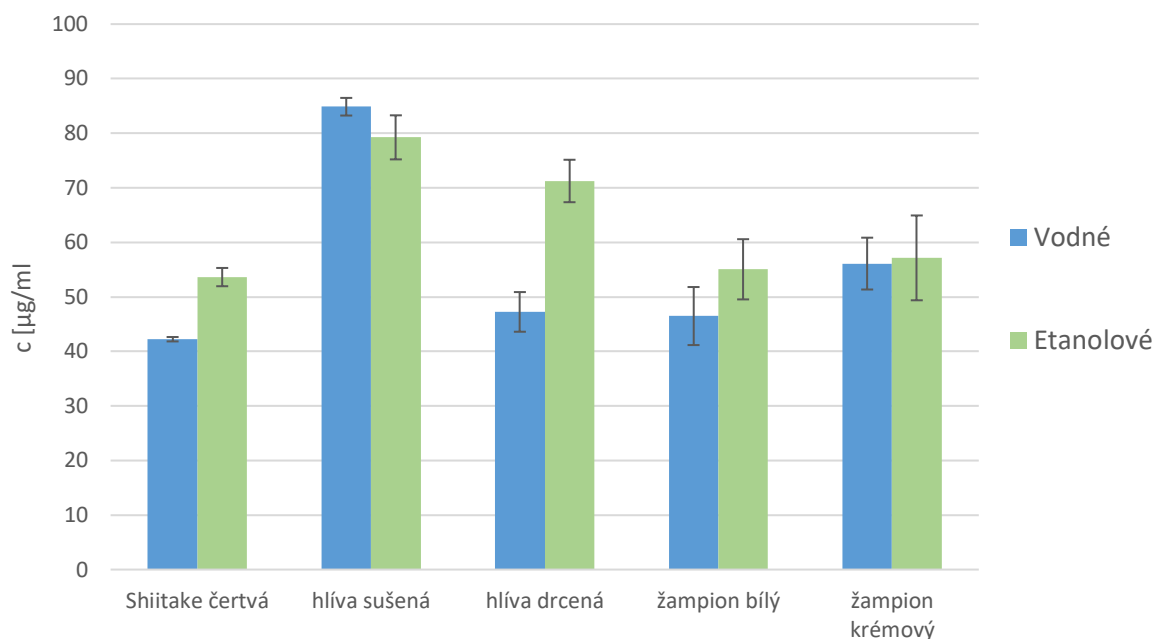
Při stanovení koncentrace proteinů byla nejdříve sestavena kalibrační závislost, a to podle postupu v kapitole 0. Vzorky byly připraveny stejným způsobem a proměřeny třikrát. Hodnoty byly zprůměrovány a vyhodnoceny v programu MS Excel.

V tabulce Tabulka 22 je zřetelné vidět, že nejvyšší obsah proteinů byl přítomen v hlívě sušené. V obou rozpouštědlech se koncentrace pohybuje kolem 80 mg/g. Nejnižší koncentraci proteinů obsahoval vodný extrakt houby shiitake - 42,23 mg/g.

Při porovnání vodných a etanolových extraktů, je zřetelné, že v alkoholových extraktech je vždy vyšší koncentrace. Pro příští měření je doporučeno stanovit proteiny jak spektrometricky, tak i s jinou analytickou metodou, např. hmotnostní spektrometrii pro analýzu proteinů.

Tabulka 22 Výsledné koncentrace proteinů v extraktech

	Vodné extrakty c [μg/ml]	Etanolové c [μg/ml]
shiitake	42,23 ± 0,40	53,62 ± 1,67
hlíva ústříčná	84,86 ± 1,62	79,24 ± 4,04
Hlíva ústříčná (drcená)	47,24 ± 3,64	71,24 ± 3,89
žampion bílý	46,48 ± 5,32	55,05 ± 5,52
žampion krémový	56,10 ± 4,75	57,14 ± 7,78



Graf 17 Porovnání obsahu proteinů ve vodných a etanolových extraktech

## 5.9 Antimikrobiální testy

Antimikrobiální aktivita byla testována na 2 kmenech bakterií – *Micrococcus luteus* a *Serratia marcescens* a na kvasince *Candida glabrata*. Byl prováděn difúzní test dle postupu v kap. 4.13.4.

### 5.9.1 Testy na kmeni *Micrococcus luteus*

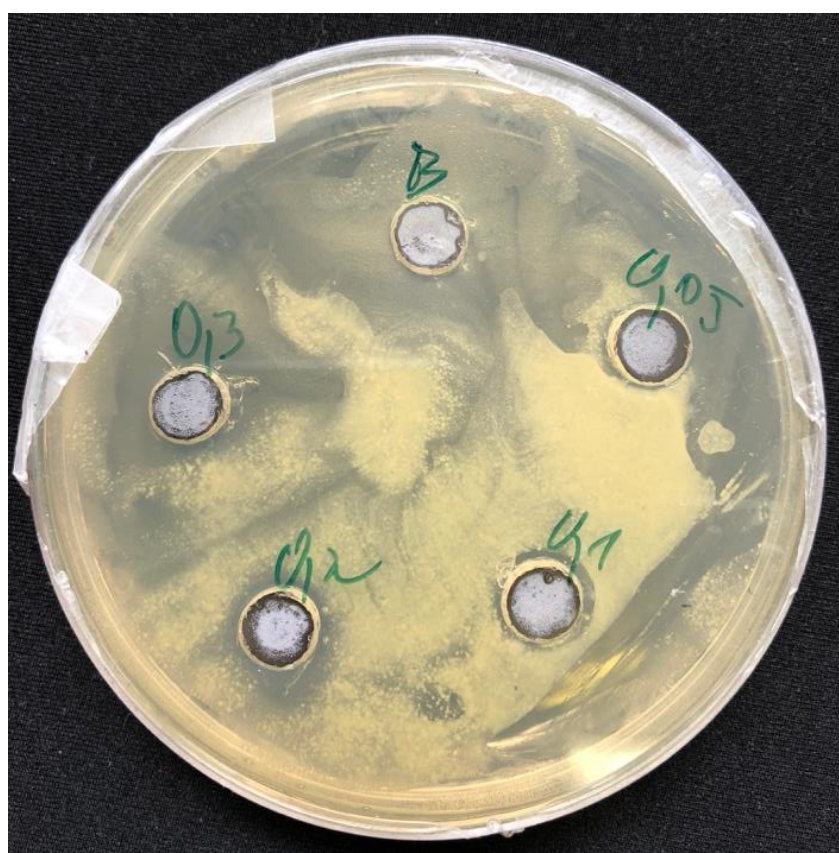
Na tento kmen byl proveden antibakteriální difúzní test, kdy byla použita koncentrační řada v rozmezí 0,005 – 0,03 g/ml vodného extraktu hlívy ústřičné (sušená), houževnatce jedlého a etanolového roztoku hlívy ústřičné (sušená). Byly pozorovány inhibiční zóny, které byly následně změřeny a zaznamenány.

Dle Tabulka 23 je zřetelné, že antimikrobiální aktivitu vykazoval pouze extrakt shiitake o koncentraci 0,01 – 0,03 g/ml. Se stoupající koncentrací se zvětšovala i inhibiční zóna. Inhibiční zóna u houževnatce jedlého o koncentraci 0,01 g/ml měřila 2 mm. U hlívy ústřičné se neprojevila žádná antimikrobiální aktivita. Je pravděpodobné, že k prokázání mikrobiální aktivity nebyly koncentrace dostatečně vysoké.



Tabulka 23 Výsledky difúzního testu na kmen *Micrococcus luteus*

<b>Micrococcus luteus</b>				
Koncentrace [g/ml]	0,005	0,01	0,02	0,03
Velikost inhibiční zóny [mm]				
Hlíva ústříčná, vodný extrakt	x	x	x	x
Hlíva ústříčná, etanolový extrakt	x	x	x	x
Houževnatec jedlý, vodný extrakt	x	2	3	4



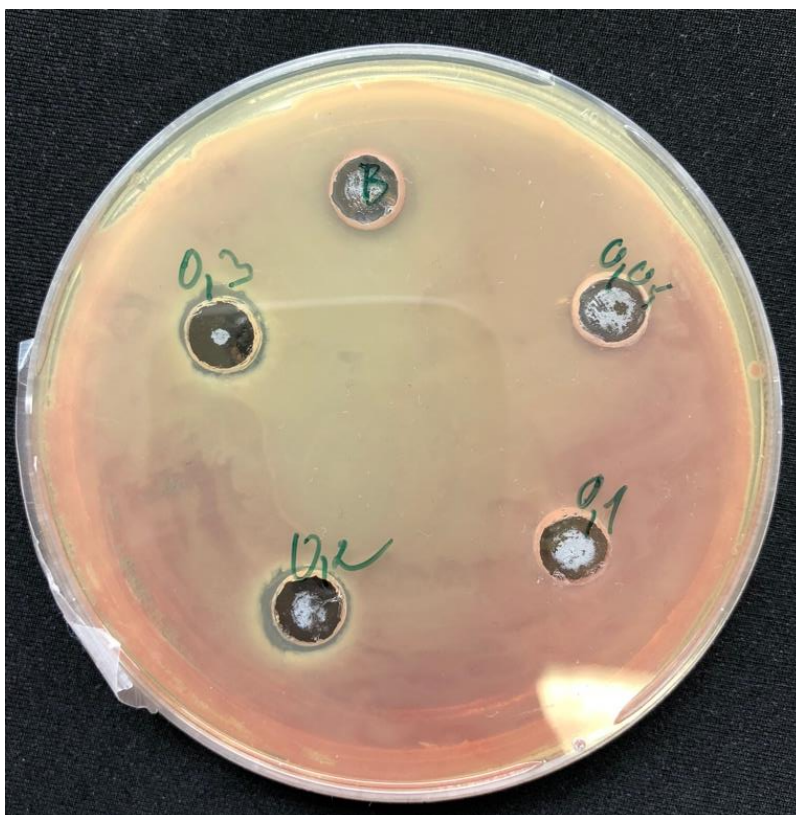
Obrázek 46 Difúzní test kmene *Micrococcus luteus*

### 5.9.2 Testy na kmeni *Serratia marcescens*

*Serratia marcescens* patří mezi gramnegativní bakterie. Byla použita stejná koncentrační řada jako u kmene *Micrococcus luteus*. Difúzní testy byly vždy provedeny dvakrát u každého kmene. Z Tabulka 24 můžeme je patrné, že jedinou antibakteriální aktivitu vykazoval pouze extrakt z shiitake, a to o koncentracích 0,02 a 0,03 g/ml. Velikost inhibičních zón byla 3 a 4 mm. U ostatních vzorků nebyla prokázána antibakteriální aktivita. Je možné, že u hlívy ústříčné nebyla použita dostatečná koncentrace k projevení antibakteriální aktivity.

Tabulka 24 Výsledky antibakteriálního difúzního testu kmene *Serratia marcescens*

Serratia marcescens				
Koncentrace [g/ml]	0,005	0,01	0,02	0,03
Velikost inhibiční zóny [mm]				
Hlíva ústříčná, vodný extrakt	x	x	x	x
Hlíva ústříčná, etanolový extrakt	x	x	x	x
Houževnatec jedlý, vodný extrakt	x	x	3	4



Obrázek 47 Difúzní test *Serratia marcescens*

### 5.9.3 Kmen *Candida glabrata*

Byl proveden difúzní test na kvasince *Candida glabrata*. Byly použity stejné koncentrační řady jako u bakterií. Test byl proveden dvakrát a byly sledovány inhibiční zóny. V Tabulka 25 můžeme vidět, že antimykotický účinek se nepotvrdil u žádných vzorků. Po 24 hodinách se na testu neobjevily žádné inhibiční zóny. Je pravděpodobné, že je potřeba více času k projevení antimykotického účinku.

Tabulka 25 Výsledky difúzního test na kvasince *Candida glabrata*

<b>Candida glabrata</b>				
Koncentrace [g/ml]	0,005	0,01	0,02	0,03
Velikost inhibiční zóny [mm]				
Hlíva ústříčná, vodný extrakt	x	x	x	x
Hlíva ústříčná, etanolový extrakt	x	x	x	x
Houževnatec jedlý, vodný extrakt	x	x	x	x

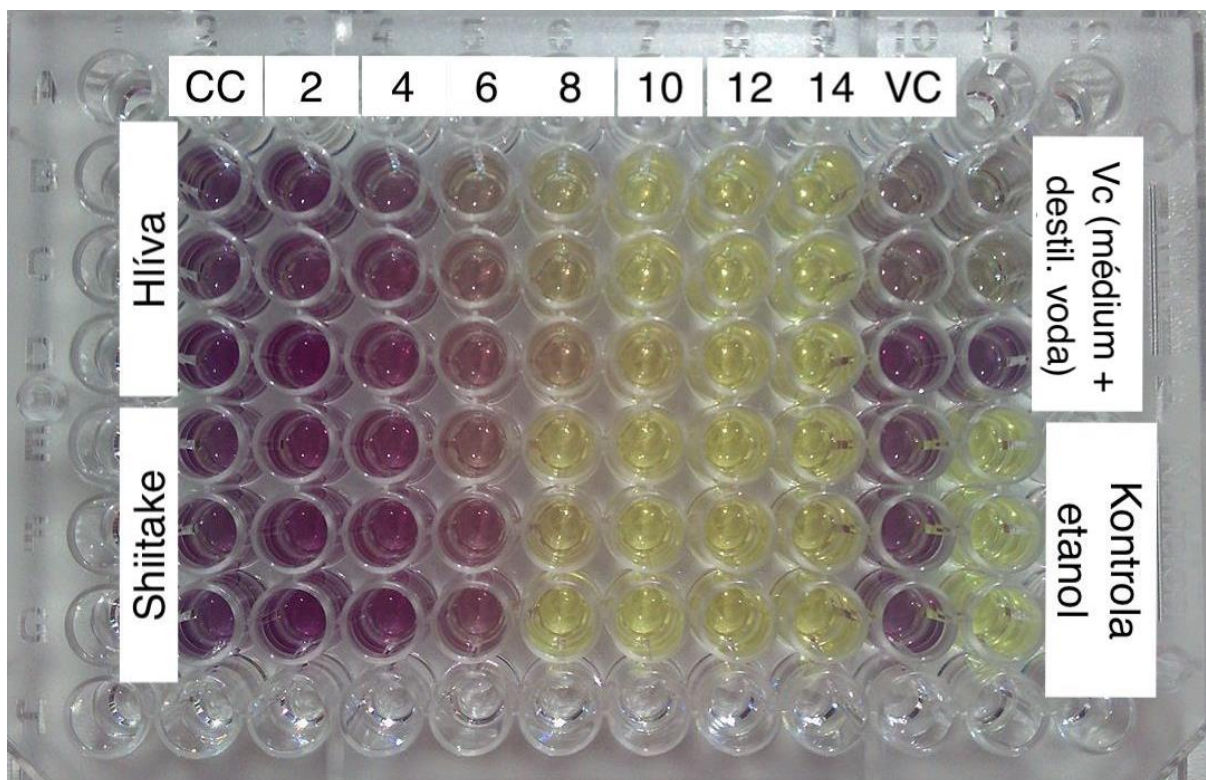
### 5.10 MTT test

Testování cytotoxicity byl proveden podle postupu kap. 4.11.2. V tabulce .

Tabulka 26 jsou uvedeny parametry MTT testu provedeného na keratinocytech HaCaT. Jako testovací vzorky byly vybrány extrakty z hlívy ústříčné (prášek) a shiitake. Vzorky byly vybrány z důvodu, že vykazovaly antimikrobiální účinek.

Tabulka 26 Parametry MTT testu

<b>MTT test cytotoxicity</b>	
Buněčná kultura	HaCat – neimortalizované keratinocyty
Médium	DME/High Glucose
Buněčná hustota	$2,5 \cdot 10^4$ buněk/ml
Objem na jamku ( $\mu$ l)	100
Čas expozice	24 hodin
Vlnová délka (nm)	540



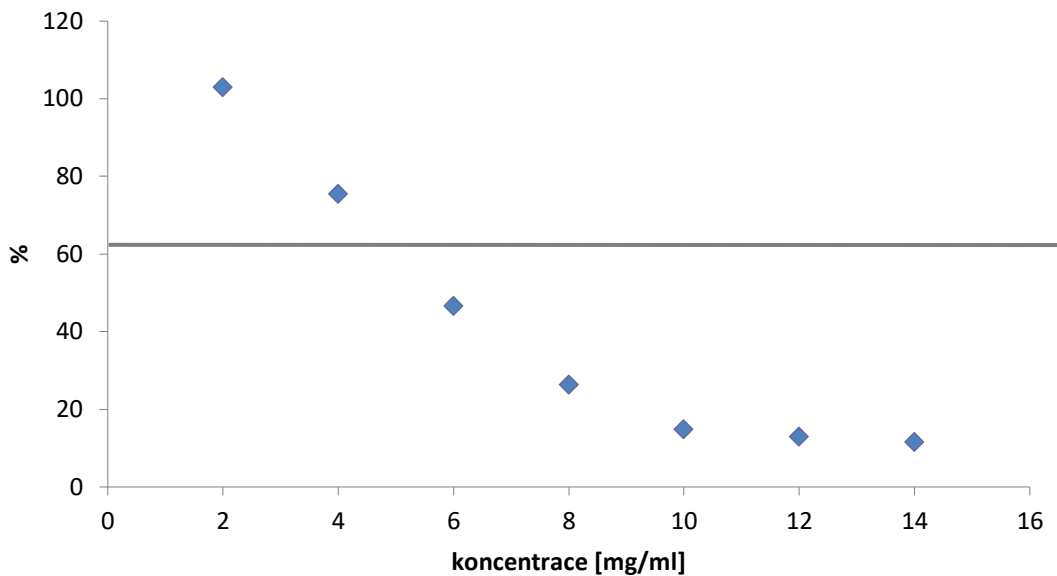
Obrázek 48 MTT test na buňkách HaCaT

Na Obrázek 48 je zřetelně vidět, že na začátku testu jsou buňky v jamkách živé. Vitální buňky redukují žluté MTT na fialový formazanový derivát, který zůstává uvnitř buňky ve formě nerozpustných krystalů. Po přidání SDS pozorujeme, jak se krystalky rozpustí a vznikne fialový roztok, který se proměří na ELISA readeru. Sloupec CC slouží jako pozitivní kontrola, kdy je přítomna viabilita buněk na 100 %.

U MTT testu na keratinocytech HaCaT můžeme pozorovat, že čím vyšší koncentrace extraktu, tím nám viabilita buněk klesá u obou analyzovaných vzorků. Na obrázku Obrázek 48 můžeme vidět okamžitou změnu zbarvení. Za hraniční hodnotu viability buněk, kdy test ještě není uznán za cytotoxický, se považuje 60 %.

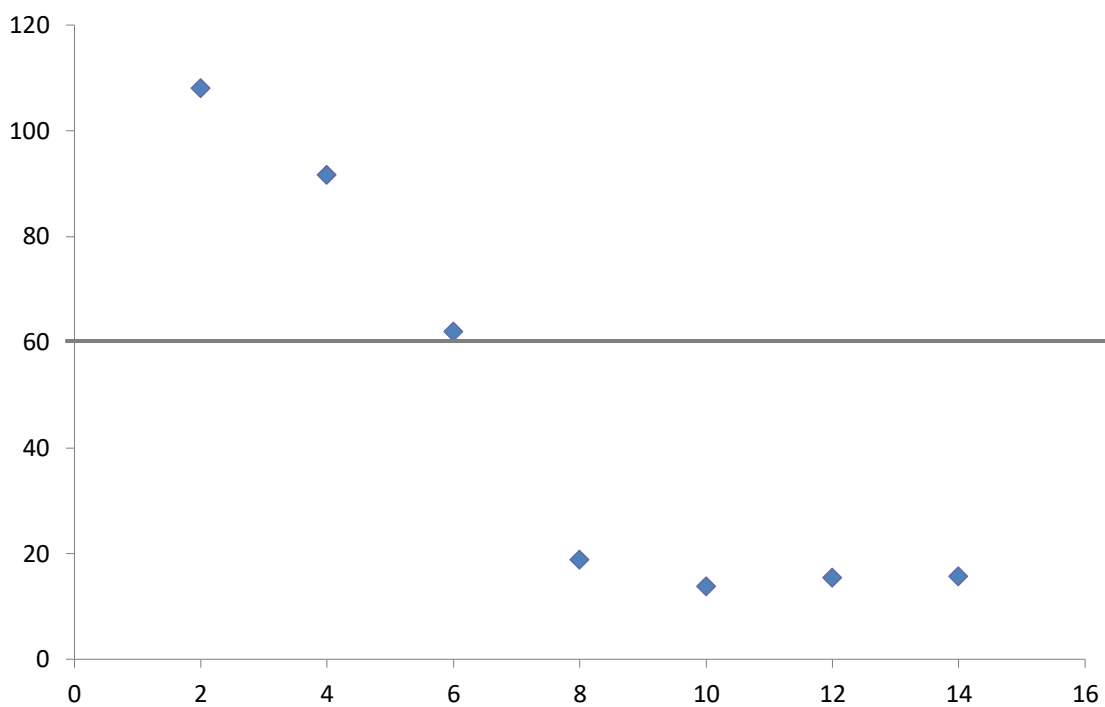
Z Graf 18 je viditelné, že viabilita buněk začíná klesat od 4 % extraktu hlívy ústříčné. Tato koncentrace je hraniční pro cytotoxicitu buněk. Můžeme si všimnout, že od 12 mg/ml viabilita buněk je pod 20 %. Zbarvení mrtvých buněk je stejné jako u kontrolního cytotoxického agens ethanolu, kde buňky jsou zcela zabity.





*Graf 18 Závislost buněk (HaCaT) na koncentraci hlívy ústříčné – MTT test*

V Graf 19 je vyhodnocen MTT test u vzorku shiitake. Hraniční koncentrací pro cytotoxicitu se považuje 6 %. Můžeme pozorovat, že u koncentrace shiitake od 8 % a výše byla viabilita velmi podobná, pohybuje se okolo 20 %. Z obrázku Obrázek 48 si můžeme všimnout, že oba extrakty mají podobný průběh při stanovení MTT. Viabilita buněk klesá s rostoucí koncentrací.



*Graf 19 Závislost buněk (HaCaT) na koncentraci shiitake – MTT test*

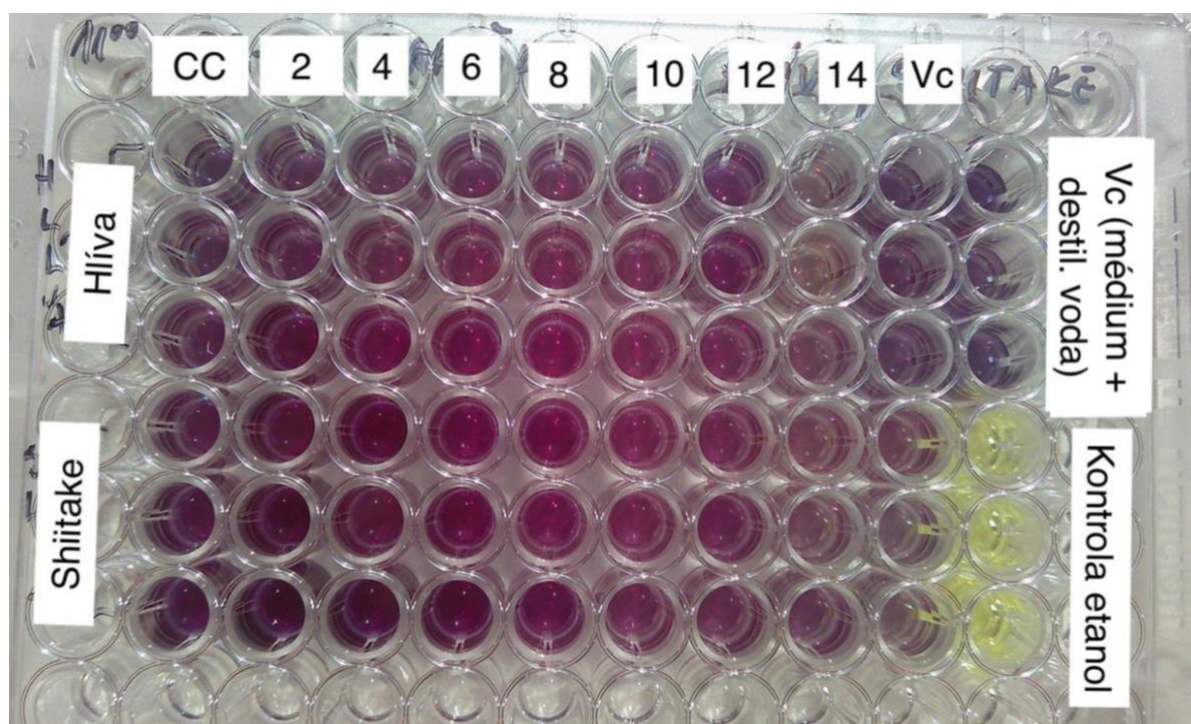
V tabulce Tabulka 27 jsou uvedeny parametry stanovení MTT testu na buněčných liniích melanomů. Byly vybrány dva stejné vzorky jako u MTT keratinocytů. Test byl proveden podle postupu viz. kap. 4.11.2.

Tabulka 27 Parametry MTT testu na melanomy B16F1

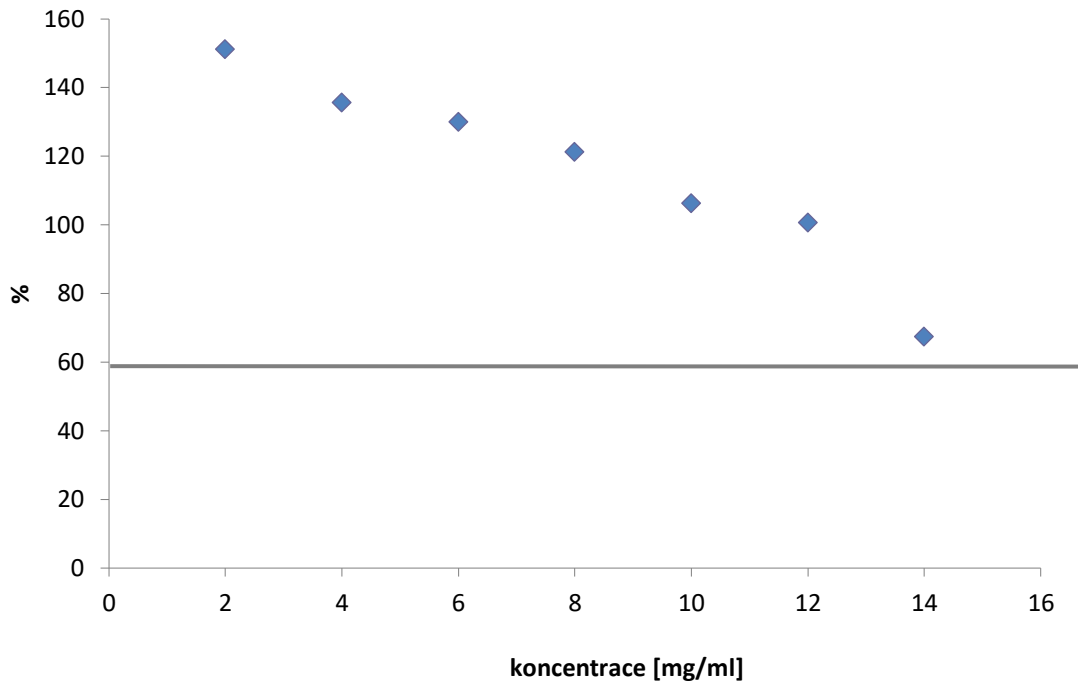
MTT test cytotoxicity	
Buněčná kultura	B16F1
Médium	DME/High Glucose
Buněčná hustota	$2,5 \cdot 10^4$ buněk/ml
Objem na jamku ( $\mu$ l)	100
Čas expozice	24 hodin
Vlnová délka (nm)	540

Na Obrázek 49 můžeme pozorovat vizuální vyhodnocení MTT testu na melanomových buňkách. Jako za vzorky byly použity vodné extrakty hlívy ústříčné a shiitake. Během testu je znatelné, že s vyšší koncentrací nám klesá viabilita buněk. Můžeme si všimnout, že u extraktu hlívy ústříčné klesá viabilita buněk rovnoměrně. U nejvyšší koncentrace hlívy je životaschopnost buněk na hodnotě 60 %.

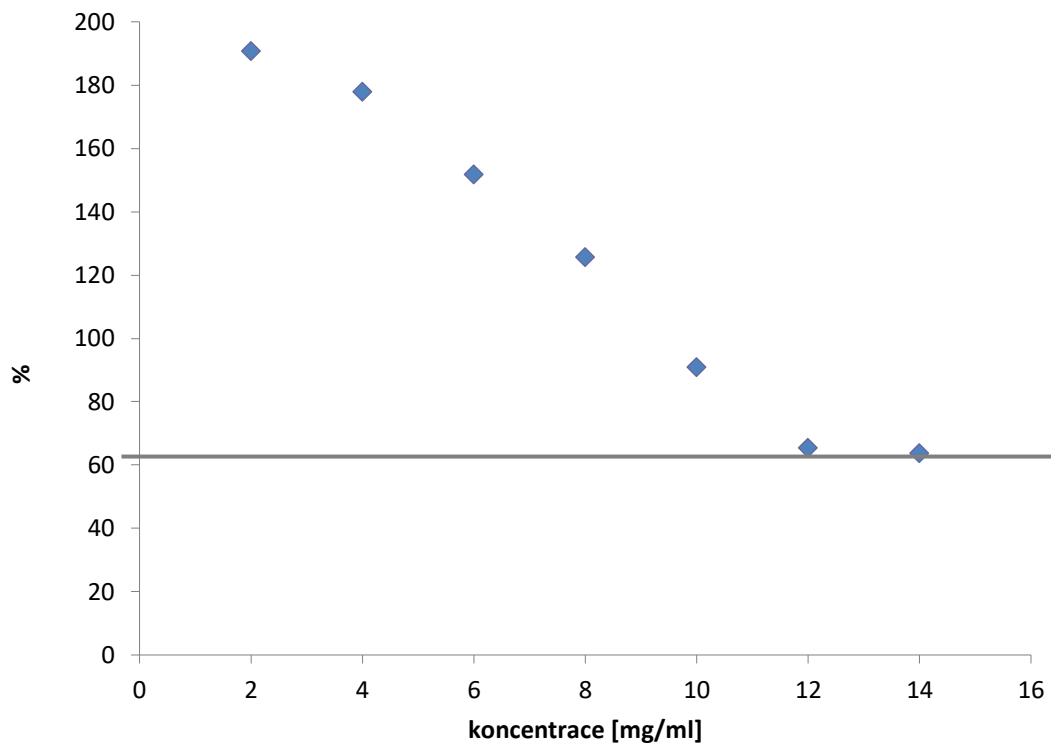
V grafu Graf 21 můžeme vidět, že při 12 % extraktu z shiitake viabilita buněk klesá na hraniční limit 60 %. Průběh výkonnosti buněk u shiitake je strmější než u hlívy. Nemáme zatím ověřené, jestli s vyšší koncentrací extraktu shiitake, by se viabilita buněk dostala pod hranici 60 %. Je pravděpodobné, že extrakty z shiitake a z hlívy s vyšší koncentrací by mohly zabít melanomy a přinést pozitivní účinky v léčbě karcinogenních onemocnění. Tato problematika bude studována v navazujících pracích.



Obrázek 49 Mikrotitrační deska se vzorky pro MTT test (B16F1)



*Graf 20 MTT test hlíva ústříčná (B16F1)*



*Graf 21 MTT test shiitake (B16F1)*

Na základě pouze provedených testů je obtížné posoudit důvod cytotoxicity extraktů hub. Výraznější efekt extraktů na HaCat buňky je zřejmě důsledkem toho, že buňky myšího melanomu rostou rychleji a jsou podstatně životaschopnější než humánní keratinocyty. Práce vyžaduje další testování.



## 5.11 ICP-OES

Při identifikaci těžkých kovů ve vzorcích hub, byla analýza provedena pomocí emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-OES). Parametry byly nastaveny podle postupu viz. kap. 4.12.2.

Tabulka 28 Výsledné koncentrace prvků ve vzorcích (mg/l)

Prvek	Al	As	Ba	Be	Cd	Co	Cr	Pb
Shiitake	0,074 1	< LOD	0,013 8	< LOD	< LOD	< LOD	0,001 3	0,003 7
Shiitake koupený	0,021 8	0,00 4	0,015 1	< LOD	0,001 9	< LOD	< LOD	0,001 0
Hlíva ústřičná	0,169 7	0,001 2	0,012 4	< LOD	0,001 3	< LOD	< LOD	< LOD
Hlíva ústřičná drcená	0,011 2	0,000 1	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
Žampion bílý	0,014 8	0,001	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
Žampion hnědý	0,034 1	< LOD	0,025 4	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	0,002 8
Jidášovo ucho	0,020 5	< LOD	0,023 3	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD

\*LOD = limitní detekce

V tabulce Tabulka 28 jsou uvedeny detekované těžké kovy a jejich koncentrace, které byly stanoveny ve vzorcích hub. Je zřetelné, že ani jeden vzorek není závažně toxický. Nalezené koncentrace jsou minimální a nemají žádný negativní vliv na lidské zdraví.

Můžeme si všimnout, že byl detekován prvek olovo v shiitake a v žampionu hnědém, tyto výrobky byly dodány firmou Hlívenka s.r.o. Množství olova je podle vyhlášky Ministerstva zdravotnictví č. 53/2002 Sb zcela v normě. Prvek kadmium se vyskytoval v shiitake a hlívě ústřičné, koncentrace tohoto prvku je rovněž zcela minimální.

Ve všech vzorcích byl detekován hliník. Nejvyšší výskyt hliníku byl v shiitake. Množství hliníku v menší míře je pro lidské tělo netoxické. V roce 2008 byl stanoven Evropským úřadem pro bezpečnost potravin (EFSA) limit hliníku pro lidský organismus 143 mg/kg. Obecně je možno říci, že těžké kovy se v analyzovaných houbách vyskytovaly v minimální koncentraci a nepřekračovaly povolené množství.

## 6 ZÁVĚR

Tato diplomová práce byla zaměřena na stanovení obsahu vybraných charakteristických bioaktivních látek ve vyšších houbách. Sledovány byly  $\beta$ -glukany, polyfenoly, flavonoidy, proteiny, mastné kyseliny, těžké kovy a rovněž vybrané biologické účinky – cytotoxický a antimikrobiální efekt.

Houby jsou známy již tisíciletí. Byly využívány už starými Egypťany, nebo v čínské tradiční medicíně. Tato skupina byla součástí říše rostlin. Díky vývoji biotechnologických metod a poznatků o houbách, byla samostatně zařazena jako říše *Fungi*. V teoretické části byla vypracována stručná rešerše o morfologii hub a jejich využití. Také byly popsány aktivní složky hub, zejména glukany a mechanismus jejich účinku na imunitní systém. Součástí teorie jsou i stručné základy metodických postupů, které byly v práci použity.

Na začátku experimentální části byly vzorky podrobeny procesu sušení. Největší podíl vody v sušině byl nalezen u vzorku hlívy ústřičné. Poté byly připraveny vodné a etanolové (5% vodný roztok etanolu) extrakty, které byly použity na stanovení metabolitů. Byly stanoveny polyfenoly, flavonoidy a antioxidační aktivita. Při stanovení polyfenolů bylo zjištěno, že nejvyšší obsah byl v žampionu hnědém (18,90 mg/g) a naopak nejnižší byla zjištěna u boltcovitky bezové (1,59 mg/g). Nejvyšší koncentrace flavonoidů byla naměřena v etanolovém roztoku žampionu hnědého (3,06 mg/g). Nejsilnější antioxidační aktivitu vykazovala hlíva ústřičná (18,40 mg/g).

Obsah glukánů byl izolován a analyzován podle doporučení výrobce kitu (Megazyme), kdy vzorky byly nejprve hydrolyzovány kyselinou sírovou a následně byl proveden enzymatický rozklad. Spektrometricky byly proměřeny absorbance celkových glukánů a  $\alpha$ -glukanů. Množství  $\beta$ -glukanů bylo vypočítáno jako rozdíl množství celkových a  $\alpha$ -glukanů. Nejvyšší obsah celkových glukánů byl stanoven u hlívy ústřičné (drcené) 29,69 % a nejnižší obsah byl v hlívě ústřičné (sušené) i u žampionu dvouvýtrusého, který měly shodně 12,65 %. Největší množství  $\beta$ -glukanů bylo stanoveno v hlívě ústřičné (drcené) 25,65 % a nejnižší množství opět bylo v hlívě ústřičné (sušená), a to 11,02 %. Možnou příčinou rozdílu může být odlišná homogemizace vzorků hlívy a jejich zpracování.

Následně bylo sledováno množství redukujících sacharidů ve vzorcích hub. Mezi tyto sacharidy patří všechny monosacharidy (glukóza, galaktóza). Charakteristickým znakem redukujících sacharidů je přítomnost volné aldehydové funkční skupiny. Nejvyšší obsah těchto sacharidů se vyskytoval v hlívě ústřičné (drcené) s koncentrací 301,14  $\mu\text{g/ml}$  a nejnižší obsah byl v žampionu dvouvýtrusém (bílý) o koncentrací 8,20  $\mu\text{g/ml}$ . Vyšší houby neobsahují pouze redukující sacharidy, většinu z celkových sacharidů tvoří právě neredukující sacharidy např. trehalóza.

Z hlediska antioxidační aktivity vynikaly spíše etanolové extrakty hub. Z jednotlivých hub vykazovala nejvyšší aktivitu hlíva ústřičná (18,40 mg/g). Nejnižší aktivita byla zjištěna u vodného extraktu shiitake (7,84 mg/g).

Pomocí plynové chromatografie byly identifikovány mastné kyseliny v houbách. Ve všech vybraných druzích hub byla přítomna v nejvyšším množství kyselina linolová, která měla největší zastoupení ze všech mastných kyselin. Kyselina linolová patří mezi polynenasycené mastné kyseliny a je běžnou součástí rostlinných olejů, což je společný znak říše rostlin a hub. Ve vzorku shiitake bylo nalezeno 6 hlavních mastných kyselin, a to kyselina linolová,

palmitová, stearová, myristoolejová, myristová a arachová. Nejvyšší koncentraci mastných kyselin ze všech zkoumaných vzorků měl žampion dvouvýtrusý (bílý) - 43,50 mg/g. Nejmenší koncentrace celkových mastných kyselin byla stanovena v boltcovitce bezové 14,13 mg/g.

Následně byla pozornost věnována studiu biologických účinků hub. Byly provedeny antimikrobiální testy vůči grampozitivnímu kmenu *Micrococcus luteus*, gramnegativnímu *Serratia marcescens* a kvasince *Candida glabrata*. Na testy byl použit vodný i etanolový extrakty z hlívy ústříčné (drcený) a shiitake. Nejvyšší antimikrobiální účinek u kmene *Micrococcus luteus* měl vodný extrakt z shiitake. Účinek se projevoval od koncentrace 0,01 g/ml, kdy velikost inhibiční zóny byla 2 mm. Shiitake také působil antimikrobiálně u kmene *Serratia marcescens*. Inhibiční zóna se vytvořila od koncentrace 0,02 g/ml. Žádný z extraktů nevykazovaly antimykotický účinek vůči kvasince *Candida glabrata*. Problematika bude dále rozvíjena v navazující práci.

Závěr diplomové práce byl věnován studiu cytotoxicity a stanovení těžkých kovů v extraktech hub. Obecně je známo, že houby dokáží kumulovat těžké kovy z prostředí. Díky tomuto poznatku byla provedena analýza prvků pomocí ICP-OES. S tím může souviset i cytotoxicita hub, kde byl proveden MTT test. V extraktech hub byl nalezen hliník, který není v menší míře pro tělo toxický. Nejvyšší koncentrace hliníku byla v žampionu bílém 0,0341 mg/l. Všechny hodnoty těžkých kovů se nachází pod limitem vyhlášky MZ č. 53/2002 Sb.

Z MTT testu lze vyhodnotit, že s vzrůstající koncentrací extraktů klesá viabilita testovaných humánních buněk, a to jak u keratinocytů HaCaT, tak u buněk myšího melanomu B16F1. S vyšší koncentrací roste cytotoxicita. Je možné pozorovat výraznější cytotoxický efekt u keratinocytů oproti buňkám melanomu. Hraniční koncentrací extraktu z hlívy pro cytotoxický efekt na keratinocyty byly 4 %. Viabilita buněk myšího melanomu se i u nejvyšší použité koncentrace extraktu udržela na hranici 60 %. Na základě provedených testů je obtížné posoudit důvod cytotoxicity extraktů hub. Výraznější efekt extraktů na HaCaT buňky je zřejmě důsledkem toho, že buňky myšího melanomu rostou rychleji a jsou podstatně životaschopnější než humánní keratinocyty.

Práce vyžaduje další testování jak obsahových látek, tak i biologických účinků hub.

## 7 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] JABLONSKÝ, I. a ŠAŠEK, V. *Pěstování hub ve velkém i v malém*. Praha 1997. ISBN 80-209-0266-5
- [2] VALÍČEK, P. *Houby a jejich léčivé účinky*. Benešov: Start, 2011. ISBN 978-80-86231-54-9.
- [3] KALINA, T., VÁŇA, J. *Sinice, řasy, houby, mechorosty a podobné organismy v současné biologii..* Karolinum, Praha 2005, ISBN 80-246-1036-1,
- [4] ROZSYPAL, S., a kol.. *Nový přehled biologie*. Scientia, spol. s.r.o., Praha 2003, ISBN 80-7183-268-5, s. 797
- [5] ERHART, J., PŘÍHODA, A., ERHARTOVÁ, M. *Houby ve fotografii*. 1. vydání. Praha: Státní zemědělské nakladatelství, 1977. 254 s.
- [6] SMOTLACHA, M., MALÝ, J. *Atlas tržních a jedovatých hub*. Praha: Státní zemědělské nakladatelství, 1989. 272 s.
- [7] GARIBOVÁ, L. V., SVRČEK, M., BAIER, J. *Houby poznáváme, sbíráme, upravujeme*. 1. vydání. Praha: Lidové nakladatelství, 1989. 304 s.
- [8] ANTONÍN, V., HAGARA, L., BAIER, J. *Houby*. Aventium nakladatelství s.r.o., Praha 2003, ISBN 80-7151-218-4, s. 416
- [9] ZICHÁČEK, V., JELÍNEK, J. *Biologie pro gymnázia*. Nakladatelství Olomouc, Olomouc 2006, ISBN 80-7182-217-5, s. 304
- [10] JANKOVSKÝ, L. *Viry, prokaryoty, řasy, houby a lišejníky*. Masarykova univerzita, Brno 1997, ISBN 80-210-1555-1, s. 154
- [11] SVRČEK, M. *Houby*. 4 vydání. Praha: Aventinum, 2002. ISBN 80-7151-202-8, 279 s.
- [12] KOVÁŘ, L. *Praktický houbař*. 1. vydání. Praha 2010. ISBN 978 80-7363-298-4, 174 s
- [13] BIELLI, E. *Houby: obsáhlý rádce pro určování a sběr hub*. 1. vydání. Praha: 2001. 224 s. ISBN 80-242-0548-3
- [14] SEMERDŽIEVA, M., VESELOVSKÝ, J. *Léčivé houby dříve a nyní*. Praha: Nakladatelství československé Akademie věd, 1986. 180 s.
- [15] VÁŇA, P. *Léčivé houby podle bylináře Pavla*. Nakladatelství Eminent, Praha 2004, ISBN 80-7281-113-4, s. 185
- [16] KOVÁŘ, L. *Břevíř o houbách*. 1. vydání. Praha: OLYMPIA, 1999. 160 s. ISBN 80-7033-593-9
- [17] ZEKOVIĆ, Djordje B , et al. *Natural and Modified (1→3)-β-D-Glucans in Health Promotion and Disease Alleviation. Critical Reviews in Biotechnology*, 2005, roč. 25, č. 4, s. 205-231.
- [18] NOVAK, M. a VETVICKA, V. *B-Glucans, History, and the Present: Immunomodulatory Aspects and Mechanisms of Action. Journal of Immunotoxicology*. 2008, vol. 5, issue 1, s. 47-57. DOI: 10.1080/15476910802019045. Dostupné [http://www.betaglukan.cz/data/citace\\_100.pdf](http://www.betaglukan.cz/data/citace_100.pdf)
- [19] YADOMAE, T.. *Structure and biological activities of fungal beta-1,3-glucans*. Yakugaku Zasshi – Journal of the Pharmaceutical Society of Japan 2000, 120 (5): 413 - 431

- [20] OHNO, N., et al. *Resistance of highly branched 1,3-beta-D-glucans to formolysis*. Chemical and Pharmaceutical Bulletin 1995, 43 (6): 1057 - 1060
- [21] VĚTVIČKA, V. *Beta Glukan: tajemství přírody*. Brno: Gynpharma, 2011, 126 s. ISBN 978-80-254-9143-0.
- [22] FOŘT, P.: *Zdraví a potravní doplňky*. Euromedia Group, Ikar, 1. vydání, Praha 2005, str. 400, ISBN 80-249-0612-0
- [23] *Toronto research chemicals* [online]. [cit. 2018-04-18]. Dostupné z: <https://www.trc-canada.com/product-detail/?E600100>
- [24] KRS, V. *Imunostimulační látky v kosmetice*. [online] [cit. 18. 3. 2018], Dostupné také z: <http://www.kosmetologie.cz/>
- [25] FM PERFUME. *FM Perfume store* [online]. [cit. 11.4.2018]. Dostupný z: <http://www.fmperfumestore.co.uk/active-beta-glucan-collection/>
- [26] READER'S DIGEST VÝBĚR, spol. s.r.o.. *Houby*. Reader's Digest Výběr, spol. s.r.o., Praha 2003, ISBN 80-86196-71-2, s. 448
- [27] VOLK, R. a VOLK, F. *Houby v přírodě a na talíři*. Euromedia Group, k.s., Praha 2004, ISBN 80-242-1136-X, s. 191
- [28] [online]. [cit. 2018-04-18]. Dostupné z: <https://www.lekarna.cz/hliva-ustricna-800mg-s-rakytником-a-echinaceou-imunit-120-60tob/>
- [29] [online]. [cit. 2018-04-18]. Dostupné z: <https://www.lekarna.cz/hliva-ustricna-800mg-s-rakytником-a-echinaceou-imunit-120-60tob/>
- [30] Dřevokazné houby: ATLAS SAPROFYTICKÝCH A PARAZITICKÝCH DŘEVOKAZNÝCH HUB [online]. [cit. 2018-03-29]. Dostupné z: <http://ohoubach.blogspot.cz/>
- [31] SOLOMON, P. *Shiitake (Lentinus edodes)*. *Encyklopedia of Dietary Supplements*, Marcel Dekker, New York 2005, 653-664.
- [32] [online]. [cit. 2018-04-18]. Dostupné z: <https://www.vitalia.cz/clanky/shii-take-houzevnatec-je-jedla-houba-s-lecivymi-ucinky/>
- [33] [online]. [cit. 2018-04-18]. Dostupné z: <http://ohoubach.blogspot.cz/2008/01/auricularia2.html>
- [34] [online]. [cit. 2018-04-18]. Dostupné z: <https://www.mycomedica.cz/eshop-shiitake.html>
- [35] [online]. [cit. 2018-04-18]. Dostupné z: <http://ksang.vn/san-pham/kem-duong-trang-da-bach-moc-nhi/>
- [36] JABLONSKÝ, I., ŠAŠEK, V. a SRB, A.. *Pěstování jedlých hub*. Praha: Státní zemědělské nakladatelství, 1985. Rostlinná výroba. Dostupné také z: <http://www.digitalniknihovna.cz/mzk/uuid/uuid:5bfd83a0-fb60-11e3-9789-005056827e52>
- [37] *Naše výživa* [online]. [cit. 2018-04-18]. Dostupné z: <http://www.nasevyziva.cz/sekce-houby/clanek-zampion-zahradni-a-hortensis-a-zampion-dvouvytrusy-a-bisporus-732.html>
- [38] TEPLÍKOVÁ J., *Houby známé a exotické*. 1. vyd. Praha 2004: Vyšehrad., ISBN 80-7021-762-6

- [39] GARIBOVÁ, L.V., *Houby*, Lidové nakladatelství Praha, Praha 1985, 1. vydání, 304 str., ISBN 26-052-85/13-34
- [40] FRIEDERICH U, FISCHER B, LUTHY J, HANN D, SCHLATTER C, WURGLER FE. *The mutagenic activity of agaritine--a constituent of the cultivated mushroom Agaricus bisporus--and its derivatives detected with the Salm*
- [41] [online]. [cit. 2018-04-18]. Dostupné z: <http://www.chemgapedia.de/vsengine/vlu/vsc/de/ch/8/bc/vlu/biotoxine/mykotoxine.vlu/Page/vsc/de/ch/8/bc/biotoxine/gi.vscml.html>
- [42] NIKOLAI V. TKACHENKO. *Optical Spectroscopy Methods and Instrumentations*. Burlington: Elsevier, 2006. ISBN 978-008-0461-724.
- [43] PERTILE, E., ČABLÍK, V.: *Instrumentální metody analýzy*. Ostrava: VŠB – Technická univerzita Ostrava, 2006. 238 s. ISBN 80-248-1049-2
- [44] NĚMCOVÁ, I.; ČERMÁKOVÁ, L.; RYCHLOVSKÝ, P. *Spektrometrické analytické metody*. 2. Praha: Karolinum, 2004. 166 s. ISBN 80-246-0776-X.
- [45] KLOUDA, P. *Moderní analytické metody*. 2. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 2003, 132 s. ISBN 80-86369-07-2.
- [46] EDER, K. *Gas Chromatographic Analysis of Fatty Acid Methyl Esters*. *Journal of Chromatography B*. 1995, vol. 671, pp. 113–131. ISSN 1570-0232.
- [47] SHANTHA, N.C. *Journal of chromatography*. Gas chromatography of fatty acids. 1992, č. 624.
- [48] SOMMER, Lumír. *Základy analytické chemie II*. Vyd. 1. V Brně: Vutium, 2000, ISBN 80-214-1742-0.
- [49] ČÁSLAVSKÝ, J. *Analytická chemie II: Přednáška č. 8 – Plynová chromatografie*. FCH VUT Brno, 2013
- [50] TROGL. *NÁVODY PRO CVIČENÍ Z MIKROBIOLOGIE*. 2008. Dostupné z: <http://fzp.ujep.cz/~trogl/NavodyMikrobiologie.pdf>
- [51] VODRÁŽKA, Z., *Biochemie*. 2. opr. vyd. Praha: Academia, 1996. ISBN 80-200-0600-1. Dostupné také z: <http://www.digitalniknihovna.cz/mzk/uuid/uuid:7f94b340-1c5f-11e4-8f64-005056827e52>
- [52] HEJAZI, A., F. R. FALKINER. *Serratia marcescens*. *Journal of Medical Microbiology* [online]. 1997, vol. 46, issue 11, s. 903-912 [cit. 2018-04-08]. DOI:10.1099/00222615-46-11-903
- [53] ŠILHÁNKOVÁ, L.: *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnologii*. 2. vyd. Praha: Victoria Publishing, a.s., 1995. 361 s. ISBN 80-85605-71-6.
- [54] *Elektronická učebnice* [online]. [cit. 2018-04-18]. Dostupné z: <https://eluc.kr-olomoucky.cz/verejne/lekce/21> *Miniatlas mikroorganismů* [online]. [cit. 2018-04-18]. Dostupné z: <http://old.vscht.cz/obsah/fakulty/fpbt/ostatni/miniatlas/serr.htm>
- [55] *Miniatlas mikroorganismů* [online]. [cit. 2018-04-18]. Dostupné z: <http://old.vscht.cz/obsah/fakulty/fpbt/ostatni/miniatlas/serr.htm>
- [56] *Micrococcus: Pathogen safety data sheet - infectious substances*. 2011. *Public health agency of Canada* [online]. [cit. 2017-04-02]. Dostupné z: <http://www.phacaspc.gc.ca/lab-bio/res/psds-ftss/micrococcus-eng.php>

- [57] MEE S.C., SUNG C.K., SANG H.C., JUN H.W. (2007): *The molecular structures and function of the yeast Saccharomyces cerevisiae cell wall*. Korean J. Med. Mycol. 12: 129-138.
- [58] BETHEA, E. K., B. J. CARVER, A. E. MONTEDONICO a T. B. REYNOLDS. *The inositol regulon controls viability in Candida glabrata*. Microbiology. 2010-02-04, vol. 156, issue 2, s. 452-462. DOI: 10.1099/mic.0.030072-0. Dostupné z: <http://mic.sgmjournals.org/cgi/doi/10.1099/mic.0.030072-0>
- [59] BALOUIRI M., SADIKI M., IBNSOUDA S. K. (2016): Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. Journal of Pharmaceutical Analysis 6, s. 71-79.
- [60] OUZOUNI, P. K. et al. *Determination of metal content in wild edible mushroom species from regions of Greece*. Journal of Food Composition and Analysis. Greece: 2007, č. 6, s. 480-86.
- [61] BOROVIČKA, J. *Houby a stopové prvky*. Vesmír: přírodovědecký časopis Akademie věd České republiky. 2007, č. 8, s. 508-11. ISSN 0042-4544.
- [62] Základy toxikologie: Prof. RNDr. Patočka, J., DrSc. Toxikology.cz [online]. České Budějovice: Zdravotně sociální fakulta, Jihočeská univerzita, 2005 [cit. 2018-04-24]. Dostupné z: <http://www.toxicology.cz/modules.php?name=News&file=print&sid=10>
- [63] CIBULKA, J. *Pohyb olova, kadmia a rtuti v biosféře..* Praha: Academia, 1991, 427 s.. ISBN 8020004017.
- [64] HOU X. and JONES T. BRADLEY, *Inductively Coupled Plasma/Optical Emission Spectrometry*, Encyclopedia of Analytical Chemistry R.A Meyers (Ed.) pp. 9468-9485, 2002. Dostupné z: [http://www.unil.ch/idyst/files/live/sites/idyst/files/shared/Labos/Hou%26Jones\\_2000.pdf](http://www.unil.ch/idyst/files/live/sites/idyst/files/shared/Labos/Hou%26Jones_2000.pdf)
- [65] VOLKA, K. *Analytická chemie II*. 1. vyd. Praha: VŠCHT, 1995, 236 s. ISBN 807080-227-8.
- [66] PROKEŠ, J. *Základy toxikologie: obecná toxikologie a ekotoxikologie..* Praha: Galén, 2005, 248 s.. 807262301X.
- [67] BEHL, B., KLOS, M., SERR, M., EBERT, U., JANSON, B., DRESCHER, K., GROSS, G., SCHOEMAKER, H.. *An ELISA-based method for the quantification of incorporated BrdU as a measure of cell proliferation in vivo*. Journal of Neuroscience Methods. 2006, 158(1), 37-49. DOI: 10.1016/j.jneumeth.2006.05.011. ISSN 01650270. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165027006002391>
- [68] *Hlívenka* [online]. [cit. 2018-04-18]. Dostupné z: <https://www.obchod.mpvp.cz/>
- [69] *Non Lá* [online]. [cit. 2018-04-18]. Dostupné z: <http://nonla.cz/>
- [70] CAUVAIN, S. P., YOUNG, L. S., 2009: *The ICC Handbook of Cereals, Flour, Dough & Product Testing: Methods and Applications*. Lancaster DEStech Publications. ISBN: 978-1-932078-99-2
- [71] PAULOVÁ, H., BOCHOŘÁKOVÁ H. a TÁBORSKÁ E. *Metody stanovení antioxidační aktivity přírodních látek in vitro.*:Chemické listy. 2004. Dostupné z: [http://chemicke-listy.cz/docs/full/2004\\_04\\_03.pdf](http://chemicke-listy.cz/docs/full/2004_04_03.pdf)



- [72] COWAN, M. M. *Plant products as microbial agents*. *Clin. Microbiol. Reviews*. 1999, 12 (4), 564 – 582.
- [73] ČOPÍKOVÁ, J. *Chemie a analytika sacharidů*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 1997, 104 s. ISBN 80-708-0306-1.
- [74] CIAPETTI, G., E. CENNI, L. PRATELLI, A. PIZZOFERRATO, Bodo JANSON, Karla DRESCHER, Gerhard GROSS a Hans SCHOEMAKER. *In vitro evaluation of cell/biomaterial interaction by MTT assay*. *Biomaterials*. 1993, 14(5), 359-364. DOI: 10.1016/0142-9612(93)90055-7. ISSN 01429612. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0142961293900557>
- [75] MANZI, P., PIZZOFERRATO, L.. Beta-glucans in edible mushrooms. *Food Chemistry* 2000, 68 (3): 315 - 318
- [76] "Lexicon of lipid nutrition (IUPAC Technical Report)". *Pure and Applied Chemistry* 73 (4): 685–744. 2001.doi:10.1351/pac200173040685
- [77] *Celostní medicína* [online]. [cit. 2018-05-02]. Dostupné z: <https://www.celostnimedicina.cz/rakovina-prsu-a-preventivni-ucinek-jedlych-hub.htm>
- [78] VELÍŠEK J.: *Chemie potravin*. Osis Tábor 1999, *Základy výživy*. Svoboda Servis, Praha 2002. 207 s.

## 8 SEZNAM ZKRATEK

A absorbance

$\lambda$  vlnová délka

m hmotnost

V objem

ABTS<sup>•+</sup> 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonová kyselina)

nm nanometr

GC plynová chromatografie

FID plamenově ionizační detektor

UV oblast – ultra fialová oblast

MIC minimální inhibiční koncentrace

TEAC Trolox Equivalent Antioxidant Capacity

ICP-OES emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem

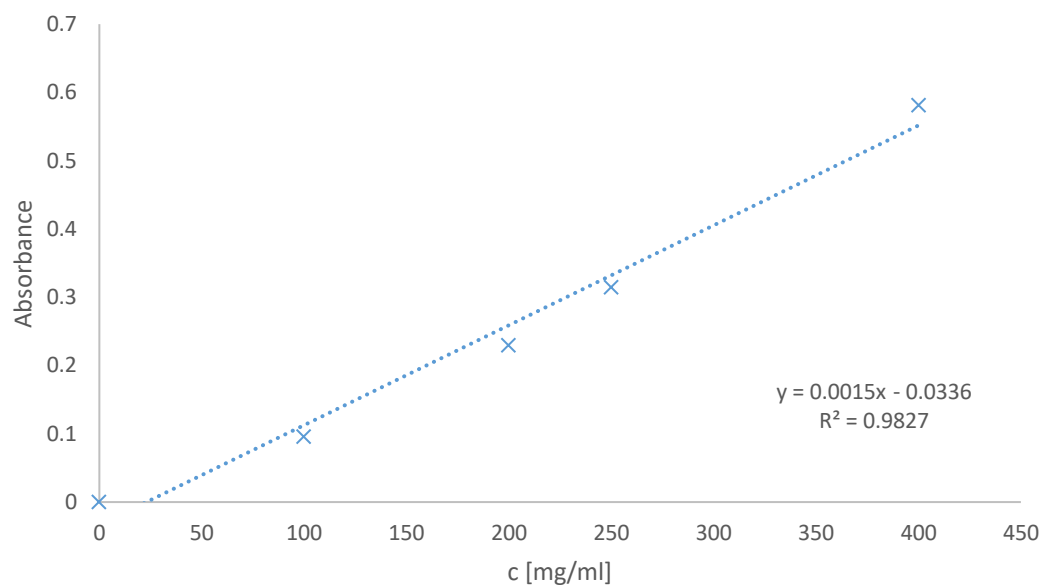
MTT 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyltetrazolium bromid)

SDS dodecylsírán sodný

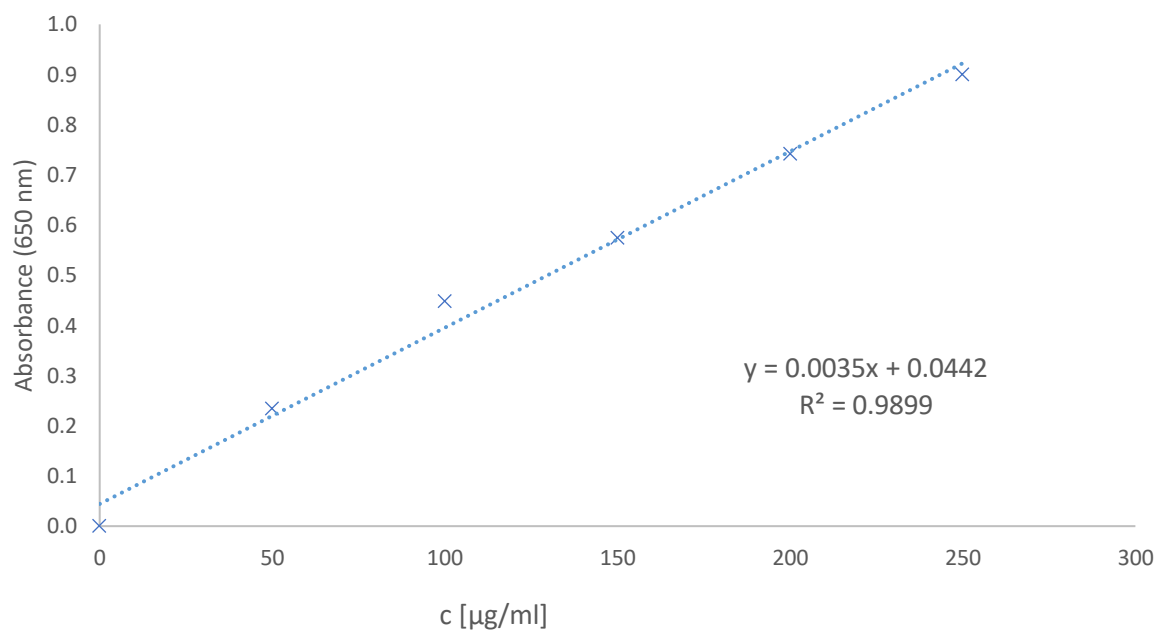
MK mastné kyseliny

## 9 PŘÍLOHY

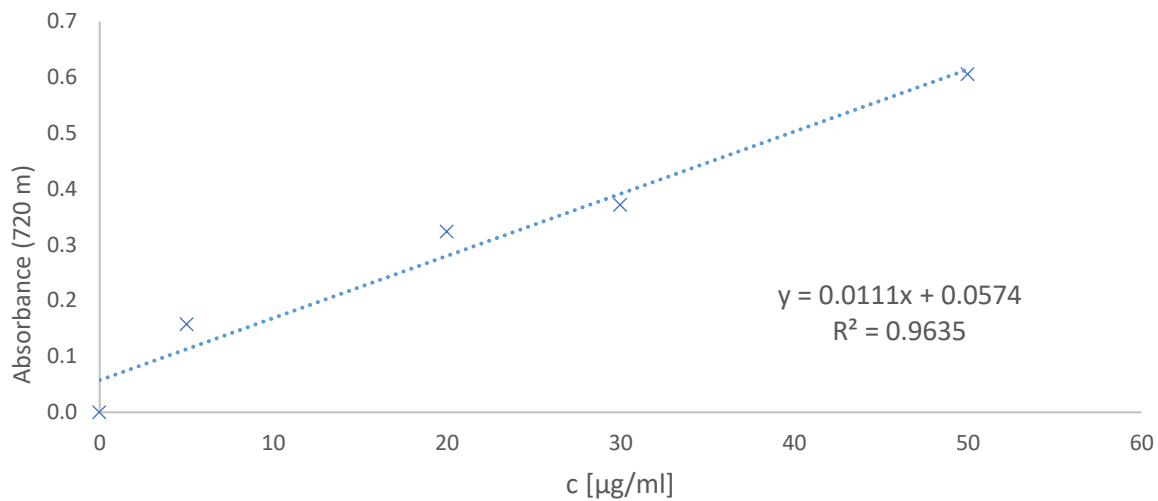
### Příloha 1 : Kalibrační křivky



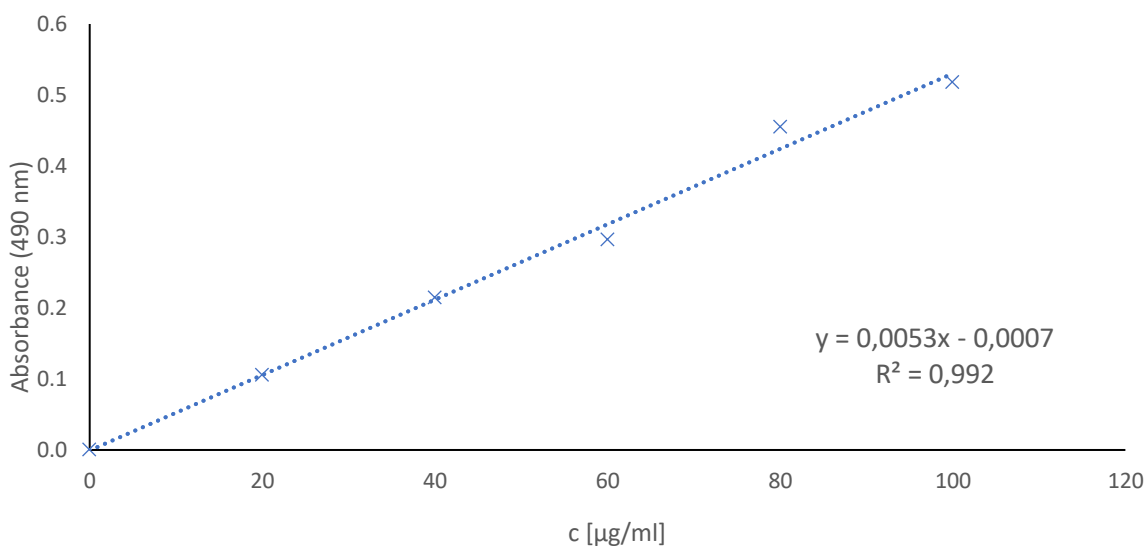
*Graf 22 Kalibrační křivka Trolox*



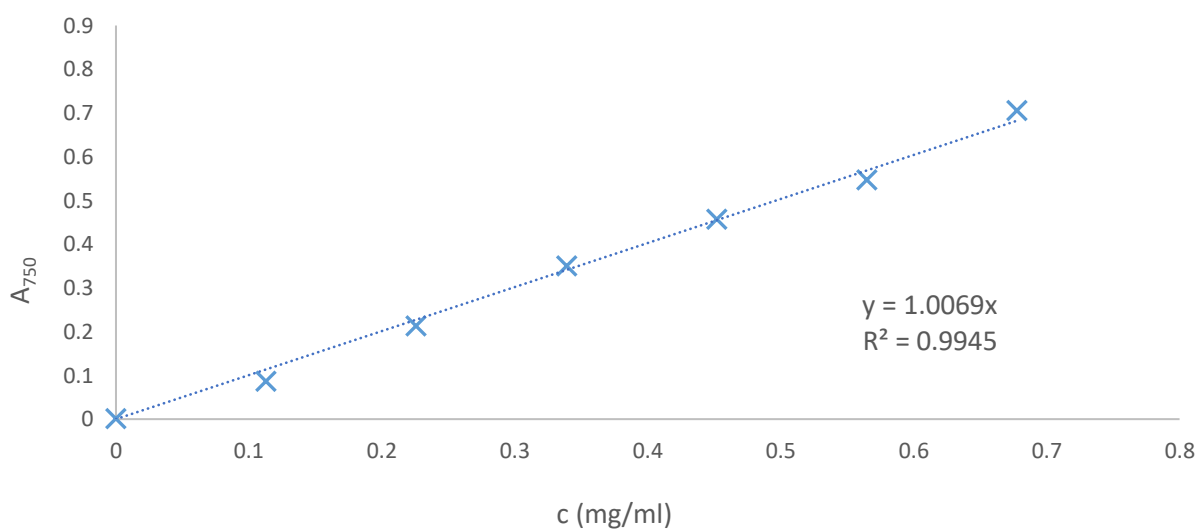
*Graf 23 Kalibrační křivka albuminu*



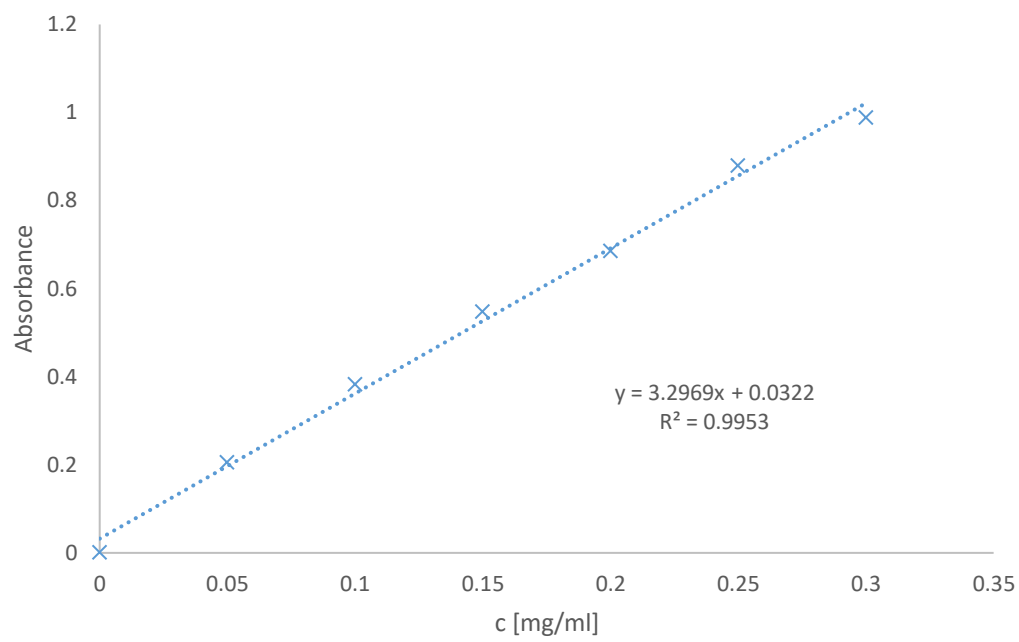
*Graf 24 Kalibrační křivka glukózy - Somogyi*



*Graf 25 Kalibrační křivka glukózy - Duboise*



*Graf 26 Kalibrační křivka kyseliny gallové*



*Graf 27 Kalibrační křivka katechinu*

## Příloha 2: Postup pro výpočet obsahu glukanů od výrobce kitu Megazyme

**CALCULATIONS:**

$$\begin{aligned} \text{Total Glucan (\% w/w)} &= \Delta E \times F \times \frac{100}{0.1} \times \frac{1}{1000} \times \frac{100}{W} \times \frac{162}{180} \\ &= \Delta E \times F/W \times 90 \\ \alpha\text{-Glucan (\% w/w)} &= \Delta E \times F \times 1000 \times \frac{1}{1000} \times \frac{100}{W} \times \frac{162}{180} \\ &= \Delta E \times F/W \times 90 \text{ (final volume 100 mL)} \\ &= \Delta E \times F/W \times 9.27 \text{ (final volume 10.3 mL)} \end{aligned}$$
$$\beta\text{-Glucan} = \begin{array}{ccc} \text{Total Glucan} & - & \alpha\text{-Glucan} \\ \text{(+ oligomers etc.)} & & \text{(+ oligomers etc.)} \end{array}$$

**where:**

- $\Delta E$  = reaction absorbance – blank absorbance.  
F = a factor to convert absorbance to  $\mu\text{g}$  of D-glucose.  
= 100 ( $\mu\text{g}$  of the D-glucose standard)  
GOPOD absorbance for 100 $\mu\text{g}$  of D-glucose standard.