

# **Analýza vybraných látek z houby hlívy ústříčné (*Pleurotus ostreatus*) chromatografickými metodami**

Bc. Jana Holubová

---

Diplomová práce  
2009



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická

---

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav potravinářského inženýrství

akademický rok: 2008/2009

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Jana HOLUBOVÁ**

Studijní program: **N 2901 Chemie a technologie potravin**

Studijní obor: **Technologie, hygiena a ekonomika výroby potravin**

Téma práce: **Analýza vybraných látek z houby *Pleurotus ostreatus* chromatografickými metodami**

Zásady pro vypracování:

### I. Teoretická část

- Z obsahových látek hub *Pleurotus ostreatus* vytipujte skupiny vhodné pro chromatografickou analýzu.
- Zaměřte se zejména na metody plošné a kolonové chromatografie.

### II. Praktická část

- Proveďte analýzu vytipovaných skupin látek za použití chromatografických metod vhodných k provozní kontrole zpracování.
- Získané výsledky vyhodnoťte dostupnými metodami, jak z hlediska kvantitativního, tak i kvalitativního.
- Dosažené výsledky statisticky zpracujte a proveďte diskuzi.

Rozsah práce:

Rozsah příloh:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná/elektronická**

Seznam odborné literatury:

[1] DAVÍDEK, J. a kolektiv: Laboratorní příručka analýzy potravin, SNTL – Nakladatelství technické literatury, Praha 1977

[2] DEAN, John A.: Chemické dělicí metody, Praha, SNTL – Nakladatelství technické literatury, 1974

[3] JABLONSKÝ, Ivan. ŠAŠEK, Václav: Jedlé a léčivé houby, pěstování a využití, Vydavatelství Brázda 2006.

[4] GASPARIČ, Jiří: Papírová a tenkovrstvá chromatografie organických sloučenin : laboratorní příručka, Státní nakladatelství technické literatury, Praha 1981

Vedoucí diplomové práce:

**Ing. Pavel Valášek, CSc.**

Ústav potravinářského inženýrství

Datum zadání diplomové práce:

**18. února 2009**

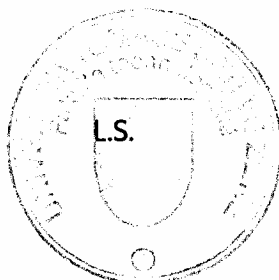
Termín odevzdání diplomové práce:

**31. května 2009**

Ve Zlíně dne 31. května 2009

doc. Ing. Petr Hlaváček, CSc.

*děkan*



prof. Ing. Ignác Hoza, CSc.

*vedoucí katedry*

## **ABSTRAKT**

Teoretická část diplomové práce je zaměřena na charakterizaci houby *Pleurotus ostreatus* z botanického i chemického hlediska. Důraz je kladen na její významné obsahové látky, na jejich vlastnosti a to jak z chemického, tak farmakologického aspektu. Praktická část naplňuje cíl diplomové práce, kterým bylo pomocí chromatografických metod analyzovat vybrané skupiny látek houby *Pleurotus ostreatus*. Analýza je soustředěna na metody plošné a kolonové chromatografie a především na metody, které jsou vhodné k provozní kontrole při průmyslovém zpracování. Získané výsledky jsou vyhodnoceny dostupnými metodami a to jak z hlediska kvalitativního, tak kvantitativního. Dále jsou výsledky statisticky zpracovány a na závěr celkově vyhodnoceny.

**Klíčová slova:** Hlíva ústříčná (*Pleurotus ostreatus*),  $\beta$ -glukany, vláknina, chromatografie

## **ABSTRACT**

The theoretical part of the dissertation is focused on characterization of mushroom *Pleurotus ostreatus* from both botanical and chemical point of view. Emphasis is laid on the important substances contained in it and its properties with consideration of both chemical and pharmacological aspects. The aim of the whole dissertation is the practical part; it consists in analysing suitable groups of mushroom *Pleurotus ostreatus* using chromatographic methods. The analysis is focused on the methods of area and column chromatography and in particular on the methods that are suitable for operational monitoring during industrial processing. The results obtained are assessed using the methods available from both qualitative and quantitative point of view. The results are also processed statistically and evaluated generally in the conclusion.

**Keywords:** *Pleurotus ostreatus*,  $\beta$ -glucans, fiber, chromatography

Na tomto místě bych chtěla poděkovat svému vedoucímu diplomové práce, panu Ing. Pavlu Valáškovu, CSc., za cenné odborné rady a čas, který mi věnoval při realizaci této práce. Další poděkování patří panu Ing. Františku Buňkovi, Ph.D., panu doc. Ing. Pavlu Mokrejšovi, Ph.D. a především paní laborantce Jaroslavě Řemenovské za pomoc v laboratoři.

Prohlašuji, že jsem na bakalářské/diplomové práci pracoval(a) samostatně a použitou literaturu jsem citoval(a). V případě publikace výsledků, je-li to uvedeno na základě licenční smlouvy, budu uveden(a) jako spoluautor(ka).

Ve Zlíně

.....

Podpis diplomanta

# OBSAH

<b>ÚVOD</b> .....	<b>9</b>
<b>I TEORETICKÁ ČÁST</b> .....	<b>10</b>
<b>1 HLÍVA ÚSTRÍČNÁ Z BOTANICKÉHO HLEDISKA</b> .....	<b>11</b>
1.1 ANATOMICKÁ STAVBA .....	12
1.2 PĚSTOVÁNÍ.....	13
1.2.1 Pěstování na slámě .....	14
1.2.2 Pěstování na dřevě.....	14
1.2.3 Pěstování ze substrátu .....	16
<b>2 HLÍVA ÚSTRÍČNÁ Z CHEMICKÉHO HLEDISKA</b> .....	<b>19</b>
2.1 SACHARIDY .....	19
2.1.1 $\beta$ -glukany.....	20
2.1.1.1 Charakteristika $\beta$ -glukanů.....	20
2.1.1.2 Mechanismus působení $\beta$ -glukanů.....	24
2.2 LOVASTATIN.....	25
2.3 TERPENY .....	26
2.4 VLÁKNINA.....	26
2.5 LIPIDY A MASTNÉ KYSELINY .....	27
2.6 BÍLKOVINY A AMINOKYSELINY .....	28
2.7 MINERÁLNÍ LÁTKY A STOPOVÉ PRVKY.....	28
2.8 VITAMINY .....	29
2.9 OSTATNÍ DUSÍKATÉ LÁTKY .....	29
<b>3 ÚČINKY HLÍVY ÚSTRÍČNÉ NA ORGANISMUS</b> .....	<b>30</b>

3.1	RAKOVINA.....	30
3.2	VIRUS.....	31
3.3	CHOLESTEROL.....	31
3.4	ATEROSKLERÓZA.....	31
3.5	ČUKROVKA.....	32
3.6	ALKOHOL.....	32
3.7	OSTEOPORÓZA.....	32
3.8	ARTRÓZA.....	33
3.9	BOLESTI ZAD.....	33
3.10	NADVÁHA.....	33
3.11	BRADAVICE.....	33
3.12	FUNKCE STŘEV.....	33
3.13	PRŮMYSLOVÉ ZPRACOVÁNÍ HLÍVY ÚSTRÍČNÉ.....	33
<b>4</b>	<b>ANALYTICKÉ METODY VYUŽITÉ PRO STANOVENÍ VYBRANÝCH LÁTEK HLÍVY ÚSTRÍČNÉ.....</b>	<b>35</b>
4.1	STANOVENÍ SUŠINY.....	35
4.2	EXTRAKCE METODOU DLE SOXHLETA.....	36
4.3	STANOVENÍ NEUTRÁLNĚ DETERGENTNÍ VLÁKNINY (NDF).....	37
4.4	STANOVENÍ OBSAHU AMINOKYSELIN METODOU IONTOVĚ VÝMĚNNÉ KAPALINOVÉ CHROMATOGRAFIE S NINHYDRINOVOU DETEKČÍ.....	37
4.5	PAPÍROVÁ CHROMATOGRAFIE (PC).....	38
4.6	TENKOVSTVÁ CHROMATOGRAFIE (TLC).....	39
4.7	DENZITOMETRIE.....	39
<b>5</b>	<b>STATISTICKÉ ZPRACOVÁNÍ VÝSLEDKŮ.....</b>	<b>41</b>
5.1	ARITMETICKÝ PRŮMĚR.....	41
5.2	SMĚRODATNÁ ODCHYLKA.....	41
5.3	KORELAČNÍ KOEFICIENT.....	42
<b>II</b>	<b>PRAKTICKÁ ČÁST.....</b>	<b>43</b>
<b>6</b>	<b>VZORKY K ANALÝZE VYBRANÝCH LÁTEK.....</b>	<b>44</b>
<b>7</b>	<b>METODY.....</b>	<b>49</b>

7.1	STANOVENÍ SUŠINY A VODY .....	49
7.2	EXTRAKCE VZORKŮ V SOXHLETOVĚ EXTRAKTORU .....	50
7.3	EXTRAKCE VZORKŮ PŘI LABORATORNÍ TEPLOTĚ .....	50
7.4	STANOVENÍ NEUTRÁLNĚ-DETERGENTNÍ VLÁKNINY (NDF) .....	50
7.5	ANALÝZA AMINOKYSELIN METODOU IONTOVÝMĚNNÉ KAPALINOVÉ CHROMATOGRAFIE.....	52
7.5.1	Příprava vzorků pro stanovení volných aminokyselin .....	52
7.5.2	Příprava vzorků pro stanovení sirných aminokyselin .....	53
7.6	PAPÍROVÁ CHROMATOGRAFIE (PC) .....	54
7.6.1	Dělení sacharidů a $\beta$ -glukanů .....	54
7.7	TENKOVSTVÁ CHROMATOGRAFIE (TLC) .....	55
7.7.1	Dělení sacharidů .....	56
7.7.2	Dělení terpenů .....	56
<b>8</b>	<b>VÝSLEDKY A DISKUZE .....</b>	<b>57</b>
8.1	STANOVENÍ SUŠINY A VODY JEDNOTLIVÝCH VZORKŮ.....	57
8.2	STANOVENÍ NEUTRÁLNĚ DETERGENTNÍ VLÁKNINY (NDF) .....	58
8.3	ANALÝZA AMINOKYSELIN POMOCÍ IONTOVÝMĚNNÉ KAPALINOVÉ CHROMATOGRAFIE.....	59
8.4	STANOVENÍ VYBRANÝCH SKUPIN LÁTEK HLÍVY ÚSTRÍČNÉ METODOU PAPÍROVÉ CHROMATOGRAFIE .....	62
8.4.1	Dělení sacharidů .....	62
8.5	STANOVENÍ VYBRANÝCH SKUPIN LÁTEK HLÍVY ÚSTRÍČNÉ METODOU TENKOVSTVÉ CHROMATOGRAFIE .....	63
8.5.1	Dělení sacharidů .....	63
8.5.2	Dělení terpenů .....	65
8.5.3	Denzitometrické vyhodnocení.....	69
	<b>ZÁVĚR .....</b>	<b>71</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....</b>	<b>73</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK .....</b>	<b>78</b>
	<b>SEZNAM OBRÁZKŮ .....</b>	<b>79</b>
	<b>SEZNAM TABULEK.....</b>	<b>80</b>
	<b>SEZNAM PŘÍLOH.....</b>	<b>82</b>



## ÚVOD

Archeologické výzkumy dokládají, že houby znali a konzumovali již předchůdci člověka před více než 30 000 lety. Houby patří k nejstarším formám života na naší planetě. Houby tvoří součást lidské potravy už od pradávna. Léčivé vlastnosti se houbám připisují již tisíce let. Snad nejstarší zprávou o použití hub k léčení je recept z Indie, datovaný 3000 let před Kristem.

Houby poskytují široké spektrum biologicky aktivních látek, které posilují fyziologický stav našeho organismu. Jejich léčivé účinky a principy příznivého působení se nyní intenzivně studují především v Japonsku a v Číně.

Hlíva ústříčná, latinsky *Pleurotus ostreatus*, je v současnosti velmi sledovaná houba. Obsahuje důležité polysacharidy,  $\beta$ -glukany, které vykazují imunostimulační a protirakovinný efekt. Protože obranyschopnost organismu stále klesá, začíná se ve světě imunitě věnovat čím dál větší pozornost a všechny látky, které imunitu budou zvyšovat, budou čím dál důležitější.

Výživná hodnota hlívy ústříčné je blízká výživné hodnotě zeleniny, čímž ji můžeme zařadit mezi dietetické potraviny. Je cenným zdrojem bílkovin a aminokyselin, minerálních látek a důležité vlákniny.

Celosvětový výzkum poukazuje na blahodárné účinky obsahových látek hlívy ústříčné při léčbě civilizačních chorob, jakož jsou rakovina, HIV, ateroskleróza, cukrovka, osteoporóza, nadváha, aj.. Hrají významnou roli v metabolismu cukrů, tuků a ve snižování hladiny cholesterolu v krvi.

Hlíva ústříčná a vliv jejích obsahových látek na lidský organismus jsou nyní předmětem zkoumání v řadě laboratoří po celém světě.

## **I. TEORETICKÁ ČÁST**

## 1 HLÍVA ÚSTŘIČNÁ Z BOTANICKÉHO HLEDISKA

Hlíva ústřičná (lat. *Pleurotus ostreatus*, ang. Oyster Mushroom, White Oyster, Oyster Shelf, jap. Hiratake) je velmi hojný druh. [1] Pochází z Číny. V dnešní době je rozšířena od tropů až po polární pásmo. [2] Je to dřevokazná houba z čeledi hlívovitých. [3] Plodnice se objevují nejčastěji v říjnu a v listopadu.

V teplejších oblastech roste na podzim, zatímco v chladných oblastech (např. na horách) i v létě. Najdeme ji v druhotných smíšených lesích, parcích, stromořadích a porostlých říčních březích na nevápenatých půdách, v ochuzených kyselých nížinných bučinách. Roste na živých nebo odumřelých listnatých stromech [1] (pozn.: nejčastěji na bucích, lípách, topolech, kaštanech a vrbách) [2], vzácně na jehličnanech. [1] Často se hovoří o tom, zda může být hlíva nebezpečná pro živé stromy. Bylo prokázáno, že hlíva naočkovaná na zdravé stromy se dále nešíří. [4] Kůra zdravých stromů obsahuje velké množství suberinu (známe v krajní podobě jako korek), který je pro hlívu neproniknutelný. [2] Kalamitní výskyt hlívy byl pozorován pouze na stromech silně oslabených. [4] Pokud na druhově vhodném stromě vznikne nějaké poranění kůry (mrazová puklina, odření kůry, odlomení větve), pak se výtrusy hlívy dostanou až na dřevo, zde při vhodné vlhkosti a teplotě vyklíčí a začínají vytvářet jemné podhoubí (mycelium). Podobně výtrusy osídlují čerstvé pařezy a čerstvě ulomené nebo vyvrácené ležící kmeny listnáčů. Mycelium působí bělavé trouchnivění dřeva. [1]

Hlíva ústřičná se vyskytuje jednotlivě nebo střečovitě nad sebou v trsech. [4]

<b>Říše:</b>	<i>Fungi</i> - houby
<b>Oddělení:</b>	<i>Eucomycota</i> - houby pravé
<b>Třída:</b>	<i>Homobasidiomycetes</i> - stopkovýtrusé
<b>Podtřída:</b>	<i>Agaricomycetidae</i> - houby rouškaté
<b>Řád:</b>	<i>Agaricales</i> - lupenotvaré
<b>Čeleď:</b>	<i>Pleurotaceae</i> - hlívovité
<b>Rod:</b>	<i>Pleurotus</i> - hlíva
<b>Druh:</b>	<i>ostreatus</i> - ústřičná

Tab. 1 Taxonomie *Pleurotus ostreatus*

## 1.1 Anatomická stavba

Klobouky jsou 5 až 15cm, vzácně až 25cm široké. [2] Silně masitý klobouk je zpočátku vyklenutý, později plochý až vmáčklý a vždy škeblovitý či vějířovitý. [5] Pokožka klobouku je hladká a lysá. Jen v místě, kde se klobouk zužuje a přirůstá k substrátu je povrch plstnatě chlupatý. [3] Barva klobouku se pohybuje mezi tmavošedou s fialovým odstínem přes šedohnědou až ke světle kožovité hnědé barvě starších hub. [5]

Široké a husté lupeny jsou často vidličnatě větvené a daleko sbíhají po třeni. [5] Jsou bledé, bělavé až okrové, někdy s nádechem barvy klobouku. [2] Na lupenech se vytváří obrovské množství výtrusů, které mohou ulpívat na povrchu níže posazených klobouků v podobě bílého [2] až fialově bílého prášku. [5]

Dužnina u mladých hub je měkká, později tuhá. [5] Je bílá, neměnná, příjemně houbově vonná, bez chuti. [3]

Třeň je postranní, až 3 cm dlouhý, 1 až 2 cm široký, někdy zcela chybí. [2] Často se rozšiřuje směrem vzhůru a je vatovitě chlupatý. [5] Je bělavý a obvykle trsnatý. [6]



Obr. 1: *Pleurotus ostreatus*



Obr. 2: Lupeny *Pleurotus ostreatus*

Hlíva ústříčná je mezi houbaři známým druhem, který se u nás běžně pěstuje i uměle a často se prodává v obchodech. Pěstované hlívy se však od přírodních barevně liší. Většinou jsou světle našedlé nebo okrově zbarvené. Hlívy rostoucí v přírodě jsou většinou tmavěji šedé, často s šedomodrým až šedozelenavým nádechem a plodnice jsou masitější a větších rozměrů. [7]

## 1.2 Pěstování

Pěstování hlívy je poměrně jednoduché a potřeby k němu jsou snadno dostupné. Lze využít velmi jednoduchých postupů i postupů složitějších, pěstitelský výnos je jistější při použití těch modernějších.

Je potřebné dodržet několik nutných podmínek – připravit pěstební substrát tak, aby jej neobsadily jiné druhy hub než hlívy, a při kultivaci podhoubí zabránit vysychání substrátu. Dále je nutné zachovat tepelný režim jednotlivých pěstebních kroků tak, jak to požaduje pěstovaný druh hlívy. Je vhodné dodržet potřebné koncentrace oxidu uhličitého při prorůstání mycelia a při nasazování a tvorbě plodnic, tedy vhodný větrací režim. [4]

Hlíva ústříčná je houba citlivá na teplotu. Fruktifikuje (tvoří plodnice) v případě, že je teplota nižší než 15°C. Je-li teplota trvale jen o málo vyšší, nedojde ani k tvorbě primordií (zárodků plodnic). K zahájení tvorby plodnic však stačí, aby v průběhu noci klesla teplota pod 10-12°C. Ve dne pak může dosáhnout i 20°C a v těchto podmínkách pak již vývoj plodnic pokračuje. Optimální hodnota pH během růstu podhoubí hlívy ústříčné je v rozmezí 5,5 až 6,5. Pro normální vývoj plodnice je nezbytná nízká koncentrace oxidu uhličitého a dostatečné osvětlení. Z hlavních fyzikálních faktorů je jednoznačná pouze otázka vzdušné vlhkosti. Pro tvorbu a dokonalý vývoj plodnic je nezbytná vysoká relativní vlhkost vzduchu (v rozmezí 80-90 %). [4]

Hlíva ústříčná pro svou ochranu uvolňuje plynnou látku methoxybenzaldehyd, který potlačuje růst grampozitivních i gramnegativních bakterií a hub. Zastavuje klíčení a růst podhoubí z výtrusů konkurenčních hub. Plodnice však tuto látku nevyklučují, místo ní obsahují oktenol, který zabezpečuje protibakteriální ochranu plodnice a tím umožňuje dostatečně dlouhý čas pro dozrávání a uvolňování výtrusů. [4]

Hlívu pěstujeme intenzivním a extenzivním způsobem. Pro intenzivní pěstování se ve světě jako substrát využívá sláma a další lignocelulóзовé odpady (řepková, rýžová a kukuřičná sláma, hrachovina, kukuřičná vřetena, piliny, bagasa, bavlníkový odpad, papír, zelená hmota z vodního hyacintu, kokosová vlákna apod.). Extenzivní pěstování hlívy je velmi jednoduchým způsobem pěstování na dřevě.. Výhodou je dlouhodobé plození. Nevýhodou je, že kultura nejvíce plodí v době, kdy rostou houby v přírodě. Venkovní podmínky také způsobují sníženou kvalitu plodnic. [4]

### 1.2.1 Pěstování na slámě

Na jednu jednotku sadby potřebujeme cca 20 kg suché slámy, což odpovídá jednomu malému balíku. Slámu je potřeba nadrtit nebo nařezat na kousky do 5 cm, uloží se do igelitového pytle a prolije se dvěma vědry vařící vody (1 vědro 12 l). Toto se nechá do druhého dne vychladnou s tím, že se pytel 2x otočí, tak aby se promočila všechna sláma v pytli.

Druhý den se vypustí zbývající voda, která se nevsákla do slámy tak, že se do spodních rohu pytle udělají díry. Pak se sláma v pytli promíchá rovnoměrně s dodanou sadbou. Sláma se co nejvíce v pytli utlačí a do igelitu se udělají otvory v průměru 1,5-2 cm v počtu 10-12 rovnoměrně po obvodu pytle.

Nechá se prorůstat v teple cca 20-24°C. Po 14 dnech je lépe pytel umístit do chladu 14-18°C. Je vhodné mít dostatečnou vlhkost v místnosti alespoň 90 % . Hlíva ke svému růstu potřebuje světlo, ale ne přímé sluneční, lépe rozptýlené. Pokud pytel dobře proroste, můžeme čekat první sběr za 1,5 měsíce.



*Obr. 3: Pěstování hlívy ústříčné na slámě*

### 1.2.2 Pěstování na dřevě

Hlíva jako saprofytická houba se rozrůstá na špalcích, oslabených a mrtvých dřevěch, ležících nebo stojících kládách. V amatérských podmínkách je nejjednodušší pěstování v jeho přirozených podmínkách a to na dřevě.

Nejlepším materiálem na kterém roste hlíva je dřevo topolu, buku, jasanu, kaštanu, olše, břízy, jabloně a hruška a jiných pěstovaných ovocných stromů. Na měkkém dřevě (topol, vrba, bříza) se hlíva rozrůstá velice rychle ale nasazování plodnic je méně častější než

na tvrdém dřevě. Doba pěstování na měkkém dřevě je podstatně kratší než na tvrdém dřevě ze vzhledu na rychlý rozklad dřeva podhoubím hlívy.

Dřevo určené na pěstování hlívy musí být zdravé a nenapadené jinými houbami. Nejlepší je použít dřevo čerstvě poražené obsahující dostatečné množství vody- ne méně než 50 %. Optimální jsou kmeny o průměru 15-30 cm, které se řežou na špalky o délce kolem 30 cm. Špalky se ukládají 3 na sebe, mezi které se vkládá vrstva sadby (podhoubí) hlívy ústříčné. Tento sloupek by se měl ustavit na venkovní místo zbavené na zemi od drnů a zbytků rostlin. Místo by mělo být v závětrí a bez přímého slunečního záření. Nejlépe na místě ve stínu dřev nebo na severní straně přístřešku nebo budovy. Sloupek složený z několika špalků rozdělený sadbou hlívy se zakrývá černou fólií a kraje se přisypávají hlínou. Dřevo se osazuje sadbou v dubnu až v květnu a v polovině listopadu se odkryje fólie a sloupek se do poloviny výšky se zakope do hlíny. Rozteč špalků by měla být 50x30 cm.

Jiným jednodušším způsobem je pěstování hlívy na větvích dřeva umístěných přímo v místě kde bude hlíva plodit. Špalky se řežou na délku 30-35 cm. Z jednoho konce se uřízne několik centimetrů špalku. Mezi uříznutý talíř a špalek se vkládá vrstva sadby asi 1 cm. Sadba se přikryje zbytkem špalku a připevní se hřebíkem. Špalek se zakope do hlíny až po vrstvu sadby. Špalek přes léto a podzim prorůstá a když se projeví teploty vhodné k růstu plodnic (12-18 °C) objevují se první plodnice hlívy. Nasazení plodnic způsobí nízké noční teploty (6-8 °C) v období podzimu, vlhkost a intenzivní nepřímé světlo. Špalky dřeva lze umístit ve sklepě nebo v jiných prostorech s vysokou vlhkostí vzduchu. Ležící jeden na druhém, kdy se mezi každý špalek vkládá 1 cm vysoká vrstva sadby hlívy. Výška takto vytvořené stěny se může pohybovat až do 2 m. Tyto bloky se pak přikrývají perforovanou fólií, která zajistí dostatečnou vlhkost vzduchu a stabilní teplotu. Pod takovým zakrytím je dostatečný přísun vzduch až do doby růstu plodnic. V případě suchého počasí se musí fólie polívat. Vlhkost vzduchu se musí udržovat mezi 80-90 %. Nejlépe je osazovat dřevo sadbou na jaře kdy se bez zvláštních podmínek udržuje vhodná teplota pro růst podhoubí tj. 15-20 °C. Podhoubí proroste dřevem za 2 až 3 měsíce. V té době je možné rozmístit dřevo to prostoru a zajistit dostatek světla. Dřevo můžeme rovněž přenést na venkovní místa kde je dostatečně vysoká vlhkost a není tam přímé slunečné záření např. v remízcích nebo u lesní paseky. Doporučuje se dřevo zasypat zeminou do výšky 10 cm.



*Obr. 4: Špalky prorůstající hlívou ústříčnou*

### 1.2.3 Pěstování ze substrátu

Substrát je osázen hlívoovým podhoubím ovšem není tímto myceliem prorostlý. Teplota prorůstání substrátu je optimální mezi 18 až 22 °C. Rychlost prorůstání závisí na teplotě čím vyšší tím rychleji. Spodní hranice není nijak omezena. Mycelium roste i při teplotách pod bodem mrazu ovšem velmi pomalu. Při vyšších teplotách je nebezpečí napadení zelenými plísněmi, které jsou všude přítomny a rozvíjejí se velmi dobře nad 20 °C na úkor hlívového mycelia. Pytle jsou naděrovány, aby docházela alespoň minimální výměna vzduchu uvnitř pytle. Prorostlý pytel se pozná, když je sláma uvnitř porostlá bílým podhoubím. V tomto okamžiku je vhodné pytel nařezat na 5-10 místech po obvodu řezy dlouhými cca 7 cm. V těchto místech je přístup vzduchu a začínají se tvořit zárodky plodnic. V průběhu prorůstání není nijak potřeba vlhčit ovšem po nařezání by se měla vlhkost udržovat nad 90 %, aby nedocházelo k osychání substrátu v nařezaných místech. To by se mělo provádět políváním stěn a podlah tak, aby byly stále vlhké. Hlíva roste v širokém rozmezí teplot od 0 do 20 °C ovšem rychlost růstu je závislá na této teplotě. K růstu potřebuje hlíva určité množství světla. Nejlépe přirozeného a rozptýleného. Toto světlo je důležité jak pro tvorbu plodnic, tak k růstu. Pokud je světla málo, projevuje se to deformací plodnic do tvaru kvěťáku nebo nesprávným zbarvením. Správná barva by měla být světle hnědá, až sytě šedá.



Potřeba světla je také závislá na teplotě. Čím je teplota vyšší tím by intenzita osvětlení měla být vyšší a délka osvětlení delší.

První sběr lze očekávat 1-2 měsíce od osetí. Při nízkých teplotách se tato doba může prodloužit až na 4 měsíce. Plodnice se začnou tvořit v místech kde je fólie nařezaná. Plodnice může stále růst pokud okraje jsou podvinuté směrem dolů. Pokud se začnou okraje narovnávat nebo vlnit je to stádium, kdy je plodnice už přezralá. [8]



Obr. 5: Pěstování ze substrátu

Hlíva vytváří plodnice zpravidla na jaře a na podzim, po dobu maximálně 5 let, v závislosti na tvrdosti dřeva (čím tvrdší dřevo, tím lépe). V letních měsících a v případě sucha špalky vydatně zaléváme.

Plodnice hlívy ústříčné sklízíme v celých trsech a čerstvé. Nečekáme než narostou všechny plodničky, protože se tak nestane. Jakmile tedy začnou největší plodnice zasychat, respektive měnit svůj čerstvý vzhled, je třeba z pytle či ze špalku trs vykroutit i s malými plodničkami. Trsy vždy vykrucujeme, v případě že bychom hlívu odřezávali, postupně by nám zbylé části trsu zahnívaly. [9] Ve velkých pěstírnách by měly osoby používat helmy vybavené ventilátorem a filtrem. Hlíva ústříčná je druh houby, která v průběhu celého vývoje plodnice postupně vytváří spory. U citlivých osob se pak po vdechnutí spor dostaví alergická reakce. Odborně se onemocnění, kdy spory pronikly u vnímavých osob do plicních sklípků, nazývá alergická alveolitida. Projevuje se charakteristickými příznaky, a to zpravi-

dla 6-8 hodin po vystavení uvedenému prostředí, kdy se dostaví suchý kašel, bolesti hlavy, zvýšená teplota a obvyklé chřipkové příznaky (ztráta chuti, nevolnost až zvracení). [4]

Již se podařilo vyšlechtit takový kmen hlívy, který výtrusy neprodukuje, bohužel výnos bezsporových kmenů je o 10 % nižší. Pro samotné pěstování hlívy absence výtrusů nevadí, protože houba se pro produkci plodnic množí vegetativně pomocí napěstovaného podhou-  
bí. [1]

Houby, které rostou v přírodě na dřevě (mezi něž patří většina pěstovaných a léčivých hub jako i hlíva ústříčná), mají unikátní enzymatické vybavení, které jim umožňuje rozkládat a k životu využívat dřevní hmotu. Dvěma hlavními složkami dřeva jsou celulóza a lignin. Zatímco celulózu dovedou rozkládat různé houby a bakterie, úplného rozkladu ligninu jsou schopné pouze tzv. houby bílé hniloby. Ty přednostně ze dřeva odstraňují ligninovou složku a hnilobivé dřevo získává bělavou barvu v důsledku převahy celulózy. [4]

## 2 HLÍVA ÚSTŘIČNÁ Z CHEMICKÉHO HLEDISKA

Výživová hodnota hub je blízká výživné hodnotě zeleniny. Jsou cenným zdrojem bílkovin a aminokyselin, minerálních látek a vlákniny. V celém moderním světě se stávají stále významnější složkou potravy a jejich výroba se zvyšuje. Nyní mají větší podíl na produkci pěstovaných hub houby dřevokazné, které přinášejí kromě vhodného dietetického složení mnoho preventivních a léčivých látek pro civilizační onemocnění.

Houby jsou ideální složkou stravy, protože obsahují velmi málo tuků a cukrů a jsou energeticky málo vydatné. Energetická hodnota 100 g váhy sušiny hlívy ústříčné je velmi nízká a byla stanovena v průměru na 340 kcal (=1423 kJ). [2] Řadíme ji proto mezi dietetické potraviny. [10] Plodnice hlívy podobně jako jiných hub obsahují přibližně 85 až 95 % vody. Podíl sušiny se tak pohybuje kolem 10 %. [2] Při sušení se většina vody odpaří a váha hub se sníží až 10-ti násobně. [11]

Ze 100 g čerstvých hub získáme přibližně 10 g sušiny, která obsahuje 2,5 g bílkovin, přes 5g sacharidů, pouze 0,1 – 0,2 g tuků a 0,6 – 1 g minerálních látek, hlavně draslíku a fosforu. [12]

Ve 100 g čerstvé hlívy se nachází 15% denní dávky vitamínu C a 40% denní dávky vitamínu B (niacin, riboflavin, thiamin). Převažující složky hlívy ústříčné jsou kyselina olejová (až 40%), kyselina linoleová (až 55%), rostlinné steroly, které aktivně snižují hladinu cholesterolu v krvi, a má nízký podíl nasycených mastných kyselin (méně než 10%). [13]

Kvalita vypěstovaných plodnic hlívy je stejně jako u ostatních pěstovaných hub ovlivněna kvalitou substrátu, na kterém se pěstují, a podmínkami sklizně a uložením plodnic.

Dosud byly z hlívy izolovány dvě skupiny účinných látek. První skupinu představuje lovastatin (též nazývaný mevinolin, monakolin K, levastacin nebo mevastacin), účinný v metabolismu cholesterolu. Druhou skupinu představuje beta-glukan nazvaný Pleuran, který je významný pro posílení imunitního systému a má protirakovinné účinky. [1]

### 2.1 Sacharidy

Rezervní rozpustné sacharidy obsažené v plazmě hub jsou glykogen, galaktany, trehalosa, ribosa a glukosa. Jsou doprovázeny cukernými alkoholy (mannitol, volemitol, sorbitol,

erythrinol, arabitol). V čertsvé hlívě ústříčné se vyskytuje méně než 1 % pro člověka přijatelných sacharidů.

Hlavními obsahovými látkami jsou však polysacharidy, ve vodě nerozpustné i rozpustné, které mají výraznou biologickou aktivitu. Základní složkou nerozpustných polysacharidů je komplex složený z chitinu (polysacharid tvořený aminocukry, zejména poly-N-acetylglukosaminem), chitosanu a některých glukánů, který je podstatou stromatu buněčné stěny hub. [3] Spolu s polysacharidy (chitinem, glukany a mannany) v buněčné stěně je v čertsvé houbě celkem asi 7 % (čerstvé hmoty) sacharidů. V hlívě ústříčné bylo rozpustných cukrů nalezeno nejméně. Nejvíce zastoupenými cukry v hlívě je glukosa (10,6 mg/g sušiny), mannitol (3,6 mg/g sušiny) a trehalosa (2,8 mg/g sušiny). [1]

### 2.1.1 $\beta$ -glukany

#### 2.1.1.1 Charakteristika $\beta$ -glukanů

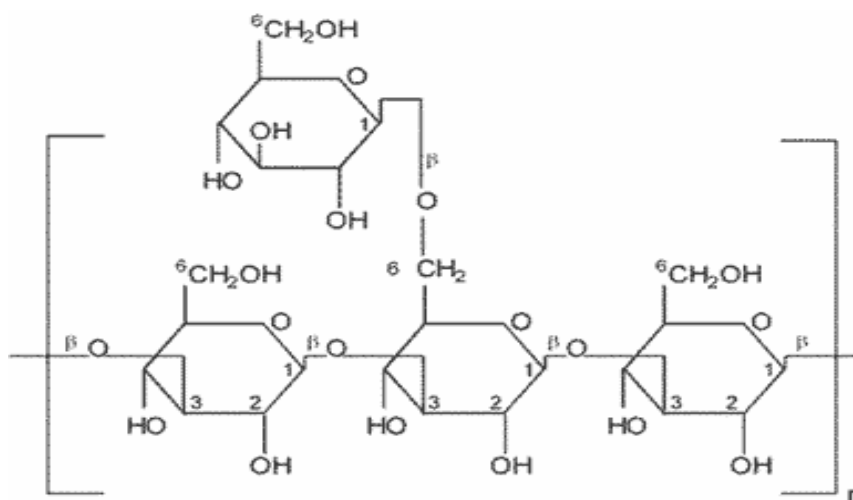
$\beta$ -glukan je chemické označení polymeru  $\beta$ -glukosy. Významnou vlastností  $\beta$ -glukanů a důvodem, proč jim je věnováno tolik pozornosti, jsou jejich fyziologické účinky.  $\beta$ -glukany patří do skupiny fyziologicky účinných látek, které se souborně označují jako modifikátory biologické odpovědi (biological response modifiers, BRMs). V přírodě se  $\beta$ -glukany vyskytují v různých zdrojích, ovšem nejčastěji byly a jsou připravovány z buněčných stěn hub.  $\beta$ -glukan se nalézá také v mořských řasách, produkují jej kvasinky i bakterie a je obsažen rovněž v obilovinách.

Buněčná stěna tvoří podstatnou část hmotnosti fungálních buněk. Výzkum buněčné stěny různých druhů hub nevedl přímočaře k jasnému modelu její struktury a představy o jejím uspořádání prošly určitým vývojem. V nedávné době publikoval Grün model buněčné stěny askomycet a basidiomycet, podle něž se buněčná stěna většiny hub skládá z pěti hlavních složek: (1 $\rightarrow$ 3)-  $\beta$ -D-glukanu, (1 $\rightarrow$ 6)-  $\beta$ -D-glukanu, (1 $\rightarrow$ 3)-  $\alpha$ -D-glukanu, chitinu a glykoproteinů. I když se různé modely buněčné fungální stěny poněkud liší, shodují se v tom, že (1 $\rightarrow$ 3)-  $\beta$ -D-glukan neleží přímo na povrchu stěny, ale je do ní více méně vnořen. Z toho vyplývá významná skutečnost, týkající se jak imunologického výzkumu, tak farmaceutického využití  $\beta$ -glukanů.

V makroorganismu  $\beta$ -glukany fungují především jako markery fungální invaze, tedy aktivita preparátů se vzhledem k lokalizaci  $\beta$ -glukanů bude zvyšovat se stupněm obnažení glukonových fibril, zde se projeví efektivnost různých způsobů izolace a purifikace. [14]

$\beta$ -glukany jsou polysacharidy s dlouhým řetězcem, kde jedinou strukturální jednotkou je glukosa. [15]

Na Slovensku izolovali účinnou látku hlívy – pleuran. Pleuran chemicky patří do skupiny beta-1,3-glukanů [1] (přesněji se jedná o poly-beta-1,3-d-glukopyrózu). [16]



Obr. 6: Základní molekulární vzorec  $\beta$ -glukanu vyskytujícího se

v houbách

Yoshioka a spolupracovníci zjistili v neutrální polysacharidové frakci ( $A_3$ ) vodného extraktu houby *Pleurotus ostreatus* přítomnost dvou sloučenin:  $\beta$ -glukanu (HA  $\beta$ -glukan) a  $\alpha$ -glukanu, které vykazují protinádorový účinek. Autoři zjistili, že HA  $\beta$ -glukan je značně rozvětvený 1 $\rightarrow$ 3- $\beta$ -glukan, má strukturu z pentasacharidových částí skládajících se z jedné neredukující koncové jednotky, jednoho 3,6-di-O-substituovaného zbytku s třech 3-mono-O-substituovaných  $\beta$ -D-glukopyranózových zbytků. [17]

Makromolekulární struktura glukanů závisí na zdroji a metodě izolace. Přírodní 1 $\rightarrow$ 3- $\beta$ -glukany jsou charakterizovány primární strukturou, rozpustností, stupněm větvení, molekulární hmotností, nábojem polymeru, konformací v roztoku. Tyto vlastnosti hrají významnou roli v biologické aktivitě  $\beta$ -glukanů. [18] V houbách se nacházejí  $\beta$ -glukany jako nerozpustné ve vodě nebo ve vodorozpustné formě. Nerozpustné jsou  $\beta$ -glukany vázané

na proteiny. [19] Přitom vodopropustná forma  $\beta$ -glukanů vykazuje mnohem vyšší biologickou aktivitu při působení na imunitní systém člověka i zvířat. [20]

Tab. 2 Obsah  $\beta$ -glukanů a poměr jejich vodorozpustné a ve vodě nerozpustné frakce [20]

Obsah $\beta$ -glukanů [mg/100 g sušiny]	38
Množství vodorozpustných $\beta$ -glukanů z jejich celkového množství [%]	37,8
Množství ve vodě nerozpustných $\beta$ -glukanů z jejich celkového množství [%]	62,2

Existují glukany s různým stupněm větvení (degree of branching, DB). Nejvyšší biologickou aktivitu vykazují glukany se stupněm větvení DB v intervalu 0,20 až 0,33. [13] Pleuran (HA glukan) z hlívy ústříčné má DB 0,25. Primární hlavní řetězec má vazbou (1 $\rightarrow$ 3) spojené  $\beta$ -D-glukopyranosylové jednotky, podél nichž se náhodně rozvětvují vedlejší řetězce z  $\beta$ -D-glukopyranosylových jednotek napojených 1 $\rightarrow$ 6 vazbou. Tyto (1 $\rightarrow$ 3, 1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -glukany jsou obvykle vysoce větvené. Často se vyskytují jako inertní vrstva buněčné stěny a občas jsou kovalentně spojené s ostatními polymery buněčné stěny, například s chitinem. [21]

Konformace 1 $\rightarrow$ 3- $\beta$ -glukanů je činitel, který významně přispívá k biologické aktivitě glukanů. Studie struktury neporušených buněčných stěn metodou nukleární magnetické rezonance určila, že 1 $\rightarrow$ 3- $\beta$ -glukany mají konformaci šroubovice. Tyto šroubovice jsou buď jednoduchý polysacharidový řetězec nebo tři řetězce spojené vodíkovými můstky (triplehelix).

Doposud nebyla vyřešena otázka týkající se biologicky aktivní formy glukanů. Některé studie naznačují, že trojitá šroubovice je více biologicky aktivní konformace, ale další studie tvrdí, že jednoduchá šroubovice je více účinná. Konformace trojitého helixu je stabili-

zována vodíkovými můstky mezi –OH skupinami. Je možné přeměnit formu trojitě šroubovice glukanu na jednoduchý helix použitím hydroxidu sodného, po kterém následuje neutralizace a dialýza proti vodě. Vodíkové můstky mohou být snadno narušeny vyšší teplotou, vysokým pH nebo použitím dipolárních rozpouštědel. Formy jednoduchého helixu se v roztoku vrací do stabilnější konformace trojitě šroubovice. Tento fakt může hrát významnou roli v rozporuplnosti experimentálních výsledků studií, které nebyly prováděny za standardizovaných podmínek. [21]

Obsah  $\beta$ -glukanů může být kromě druhu houby ovlivněn i dalšími faktory jako jsou podmínky za jakých jsou houby vypěstovány (poměr uhlíku a dusíku, pH, inkubační teplota, různý stupeň zralosti plodnice a další.) [22]

Ukazuje se že,  $\beta$ -glukany mají bioaktivní a léčivé účinky jakými jsou imunomodulační, imunostimulační, protizánětlivé, antimikrobiální, protinádorové, protifibrotické, antidiabetické, hepatoprotektivní působení, snižují cholesterol a snižují glykémii.[21] V poslední době se rovněž prokázalo, že  $\beta$ -glukan může mít významný efekt při profylaxi následků použití biologických zbraní, především nákazy anthraxem. [14]

Beta-glukany jsou silným antioxidantem. Neutralizují volné radikály poškozující lipidy buněčných membrán a genetický materiál v buňkách. V dnešním světě je několik forem záření, kterým se nelze vyhnout: rentgenové paprsky, ultrafialové paprsky ze slunečního záření, mobilní telefony, obrazovky počítačů, vedení vysokého napětí, běžné mammografy, cestování letadly.  $\beta$ -glukan aktivuje makrofágy, aby byly schopné zachytávat zbytky a poškozené buňky způsobené radiací. [16]

Vhodně působí při infekcích, celkové únavě organismu, stresu, nachlazení a rekonvalescenci po chirurgickém zákroku. Je tu však jedno omezení, kdy se glukany nesmí užívat, a to je po transplantaci orgánů (např. ledviny, srdce). Tělo by se je pak snažilo vypudit. To však neplatí pro implantáty (kloubní náhražky). [23]

Příznivé účinky se projevují zejména u stárnoucích lidí, kterým navrací pocit svěžesti a vitality, lidí pracujících pod fyzickým nebo emocionálním stresem a u kohokoliv, kdo nerespektuje zásady zdravého způsobu života a principy zdravé výživy. [24] Jsou tedy velmi prospěšné sportovcům, těžce fyzicky pracujícím, ale i manažerům, podnikatelům, studentům a všem, kteří žijí pod vlivem stresu. [23]  $\beta$ -glukany aktivují přímo buňky imunitního

systemu, proto nenastává problém rezistence, který je běžný u obecně používaných antibiotik. Navíc se jedná o přírodní látku, která působí aniž by bylo tělo zaplavováno chemickými látkami. [24]  $\beta$ -glukany díky tzv. synergickému efektu urychlují nejrůznější způsoby léčení a násobí účinky jednotlivých léčebných metod, zlepšují vstřebávání vitaminů a minerálů. [23]

### **2.1.1.2 Mechanismus působení $\beta$ -glukanů**

Mechanismus působení beta-glukanů spočívá v tom, že podporují všechny systémy organismu – nervový, imunitní i hormonální. I když princip účinku  $\beta$ -glukanů není ještě zdaleka známý, biologická aktivita pravděpodobně spočívá v interakci se specifickými  $\beta$ -glukopyranosovými receptory na leukocytech. Posilují částice imunitního systému tím, že urychlují tvorbu lymfocytů v kostní dřeni, zvyšují aktivitu leukocytů první linie imunity – makrofágů a stimulují fagocytózu. Dále stimulují aktivitu leukocytů druhého pásma imunity (T-lymfocytů) a udržují rovnováhu mezi leukocyty (Th-1 a Th-2). [4]

V projevech biologické aktivity  $\beta$ -glukanů se nejvíce uplatňují makrofágy, které jsou považovány za základní výkonné buňky v obraně hostitele proti bakteriím, prvokům, virům, vícebuněčným parazitům, nádorovým buňkám a chybným vlastním buněčným klonům. Makrofágy jsou součástí nespecifického, evolučně staršího imunitního systému, který kromě fagocytů, tj. buněk pohlcujících mikroorganismy, zahrnuje složitou soustavu sérových proteinů zvaných souhrnně komplement a celou řadu dalších rozpustných rozpoznávacích a ejektorových molekul. [25]

Glukany jsou rozpoznávány leukocyty pomocí specifických receptorů. V závislosti podle toho, který receptor je zapojený, leukocyt reaguje. Obvykle se jedná o receptory, které rozlišují jednotlivé sacharidové jednotky. Receptory vznikají v kostní dřeni a vyskytují se na membráně makrofágů pravděpodobně už od počátků zrání těchto buněk i v průběhu jejich diferenciaci. [26] Spojením makrofágu s  $\beta$ -1,3-D-glukanem se makrofág aktivuje. [17]

$\beta$ -glukany dokáží makrofágy stimulovat k maximální aktivitě, pomáhají nastartovat obranu našeho těla od samého počátku proti napadení mikroorganismy. Mají-li buňky obranných schopností dostatečné množství glukanů, jsou živější, odolnější vůči infekcím, rychleji se množí. [23]  $\beta$ -glukan makrofágy aktivuje a ty potom pohlcují a ničí infekční organismy, ale hlavně nádorové buňky. Na ně má beta-glukan přímý cytostatický účinek, působící ale



selektivně, tj. ničí jen buňky nádorové na rozdíl od klasické chemoterapie, která ničí vše, tj. i mladé zdravé buňky. [16]

Po navázání  $\beta$ -glukanu na makrofág dojde k:

- zvýšení schopnosti makrofágu pohlcovat cizorodé částice
- uvolňování primárních i sekundárních cytokinů
- uvolňování kolonizačních stimulačních faktorů GM-CSF (faktor stimulující tvorbu kolonií granulocytů a monocytů) [27] a interferonů [16]
- aktivace buněk specifického imunitního systému: T a B buňky

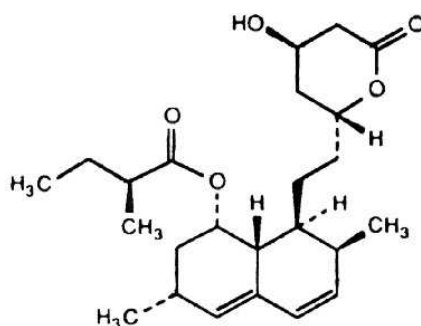
Aktivované makrofágy spolu s uvolněnými cytokiny se podílí na nespecifikované imunitě:

- zvýšení schopnosti makrofágu pohlcovat cizorodé částice – viry, bakterie, paraziti, plísně
- snížení hladiny přebytečných látek z výživy (cholesterol apod.)
- snížení hladiny přebytečných hormonů (fyzická či psychická zátěž)
- při léčbě onemocnění imunitního systému a zhoubných nádorů [16]

## 2.2 Lovastatin

Lovastatin (též nazývaný mevinolin, monakolin K, levastacin nebo mevastacin) je účinný v metabolismu cholesterolu. [1] Chilští a japonští vědci studovali obsah lovastatinu v plodnicích hlívy. Lovastatin patří do skupiny statinů, které aktivně působí při odbourávání cholesterolu. Statiny patří do skupiny inhibitorů HMG-CoA reductasy. Cholesterol je organická látka, která se u teplotokrevných živočichů vyskytuje v játrech, žlučníku, v nadledvinkách a v mozku a zasahuje do metabolismu tuků. Cholesterol je v buňce syntetizován pomocí specifického koenzymu (3-hydroxy-3-methylglutaryl-koenzym A, angl. zkratka HMG-CoA). Nadměrné množství cholesterolu provází poruchy metabolismu tuků a je příčinou vzniku onemocnění cév – zejména aterosklerózy [4] Statiny snižují výskyt mozkových příhod a brzdí i nástup demence. Statiny se staly hlavní skupinou hypolipemik, a v této základní indikaci jsou dnes široce užívány. Při tom opakovaně překvapily svými neočekávanými dodatkovými účinky. Ukázalo se, že léčba statiny chrání před infarktem myokardu i ty pacienty, kteří mají normální hladinu cholesterolu v plazmě, a u nichž

protektivní působení nemůže být založeno na snížení lipidů. Statiny snižují zánětlivou reakci cévní stěny a brání odtržení aterosklerotických plátů. Statiny jsou chemické látky inhibující důležitý enzym (HMG-CoA reductázu), jehož prostřednictvím organismus syntetizuje cholesterol. Běžně se používají při léčbě kardiovaskulárních chorob. Blokují endogenní syntézu cholesterolu a zvyšují odbourávání LDL-cholesterolu z krevního oběhu. Stimulují endotelový enzym nitric-oxid-syntázu, který rozšiřuje cévy, ale zřejmě také (svými antioxidačními, protizánětlivými a protisrážlivými účinky) stabilizují aterosklerotické pláty. Kromě toho se ukazuje příznivý vliv statinů ve stále nových oblastech. Například podle epidemiologických studií je výskyt Alzheimerovy choroby u pacientů léčených statiny až o 70 % nižší než v kontrolní skupině. [28]



Obr. 7 : Lovastatin

### 2.3 Terpeny

Další zajímavou skupinou aktivních látek jsou terpeny s antibiotickou a protirakovinnou aktivitou, které houba syntetizuje. Jedním z nich je pleurotin, který byl také uměle syntetizován. [4] Terpeny, isoprenoidy nebo terpenoidy, jsou rozsáhlá skupina biomolekul, strukturně odvozená od isoprenu. Tvoří skupinu nezmýdelnitelných lipidů. [29]

### 2.4 Vlákna

Plodnice jsou významným zdrojem potravní vlákniny, jejich sušina obsahuje kolem 26 % nerozpustné a zhruba 1 % rozpustné frakce. Vlákna hub se liší výrazně od vlákniny ovoce, zeleniny a obilnin. Zatímco u poslední jmenované skupiny potravin je její hlavní součástí celulóza, hemicelulózy a pektiny, tedy biopolymery kyselého charakteru, tvoří podstatnou část vlákniny hub bazické polymery chitin a chitosan, které se v rostlinné říši prakticky nevyskytují. Bylo shledáno, že asi 10 % aminoskupin je volných. Z uvedeného vyplý-

vá, že rostlinné vlákniny mohou fungovat jako katex, vláknina potravních hub jako anex. [3] Vláknina podporuje činnost a čištění střev. [1] Chitin je polymer, ve kterém se váží navzájem převážně N-acetyl- $\beta$ -D-glukosamin a  $\beta$ -D-glukosamin  $\beta(1\rightarrow4)$ -glykosidovou vazbou. Základní stavební jednotkou tohoto disacharidu je chitobióza, která je složena zedvou molekul N-acetyl- $\beta$ -D-glukosaminu. [19]

Ve vodě je nerozpustný a poměrně odolný vůči chemickým činidlům. Rozkládá se pouze bakteriálními enzymy chitinasami, enzymem lysozymem a koncentrovanými kyselinami. [30] Alkalickou hydrolyzou chitinu vzniká chitosan. Ten se částečně rozpouští v kyselém prostředí, tedy i v žaludeční šťávě, jeho volné primární aminoskupiny se protonizují a vzniklá látka dává takto obměněnému chitosanu vlastnosti blízké cholestyraminu. Cholestyramin (styren-divinyl-benzenový kopolymer) váže jako neresorbovatelný anex v tenkém střevě žlučové kyseliny (těm se přisuzuje karcinogenní účinek na tlusté střevo) [31], narušuje jejich enterohepatální oběh a snižuje tak hladinu cholesterolu v plazmě. [3] Chitin a další složky stěny (beztvaré složité cukry – glukany a mannany) ve svých molekulách obsahují značné množství vazebných míst pro kovy, které se mohou v houbové vláknině uvolňovat anebo pevně vázat. [1]

Houby jsou pro člověka jen částečně stravitelné, protože lidský organismus není zcela schopen štěpit chitin.[30]

## 2.5 Lipidy a mastné kyseliny

Lipidy tvoří v hlívě většinou méně než 1 hmot. % z čerstvé hmoty. Mají rezervní a ochrannou funkci. Patří k nim polyglyceridy, glykolipidy, lipoproteidy, fosfolipidy a steroidy. Jsou důležitou součástí všech buněčných membrán. [1]

Hlíva ústříčná obsahuje velké množství kyseliny olejové (až 40 %) a kyseliny linolenové (až 55 %). [2] Při sledování lipidické frakce plynovou chromatografií byl nalezen následující poměr mastných kyselin  $C_{14:0}$  (kyselina myristová) 1,1 %,  $C_{16:0}$  (kyselina palmitová) 23,0 %,  $C_{16:1}$  (kyselina palmitolejová) 10,4 %,  $C_{18:0}$  (kyselina stearová) 2,1 %,  $C_{18:1}$  (kyselina olejová) 36,2 %,  $C_{18:2}$  (kyselina linolová) 27,2 % a  $C_{18:3}$  (kyselina linolenová) 46,2 %. [3]

## 2.6 Bílkoviny a aminokyseliny

Bílkoviny a jejich stavební kameny – aminokyseliny jsou přítomny v čerstvých houbách v malém množství (0,3 – 3,5 % čerstvé hmoty). Hlívy vypěstované na substrátu s vyšším obsahem dusíku a bílkovin (např. na odpadu při výrobě piva s přidavkem pšeničných otrub) mohou obsahovat i 53 % bílkovin v sušině (tj. asi 5 % v čerstvé houbě), z toho 65 % volných aminokyselin. Volné aminokyseliny jsou důležitou složkou výživy a navíc patří k látkám, které podmiňují chuť hub. [1]

Aminokyseliny byly izolovány z ethanolového extraktu. Celkem bylo nalezeno 18 volných aminokyselin. Poměrně vysoké jsou hladiny leucinu, isoleucinu, argininu, valinu a lysinu, z neesenciálních byly ve vyšší koncentraci nalezeny kyselina glutamová, kyselina asparagová, alanin a serin. [3] V houbách jsou ale i takové druhy aminokyselin, které lidské tělo nevyužívá. Některé z nich zřejmě mohou vyvolávat alergické reakce. [11]

Z plodnic hlívy byly izolovány glykopeptidy zvané lektiny, použitelné ve směsi s ionty vápníku jako koagulační faktor, mající antibiotické a antifungální vlastnosti. [4]

## 2.7 Minerální látky a stopové prvky

Minerální látky jsou součástí popelovin, které tvoří u hub asi 5 až 10 hmot. % sušiny. V pěstovaných dřevokazných houbách bylo zjištěno 5,27 až 7,59 hmot. % popelovin v sušině. V hlívě ústříčné jich bylo nejvíce. [2] Sušina plodnic obsahuje kolem 4 hmot. % draslíku, 1,4 % hmot. fosforu, 0,18 hmot. % hořčíku, 0,014 hmot. % vápníku, 0,01 hmot. % železa, 0,007 hmot. % zinku, 0,0015 hmot. % mědi a 0,0007 hmot. % manganu, především v kloboucích. [3] Narozdíl od draslíku je koncentrace sodíku v hlívě nízká (až 0,0014 hmot. % v sušině). Z tohoto hlediska je požívání hlívy vhodné pro lidi, kteří mají vysoký tlak a nemocné srdce. V jídle z hlívy získá člověk vhodné množství potřebných minerálních látek, ale ne nepotřebný sodík, jehož nadbytek zatěžuje ledviny.

Z hygienického hlediska je nutné v pěstovaných houbách sledovat obsah stopových toxických kovů, hlavně kadmia, rtuti, olova [1], arzenu [3], vanadu, chromu a berylia. [32] V přírodě může obsah rtuti a kadmia dosáhnout závažných koncentrací, které při vyšší konzumaci mohou zatížit lidský organismus. Obsah toxických prvků v hlívách a dřevokazných houbách je obecně nižší, protože ve dřevě je nahromaděno takových kovů z prostředí

jen velmi málo. Houby vypěstované v pěstírnách, kde se kvalita pěstebního substrátu kontroluje, by měly být z hlediska obsahu toxických kovů bezpečné. [2]

## 2.8 Vitaminy

Z biologicky aktivních látek byly v plodnicích hlívy prokázány vitaminy skupiny B: ve významnějším množství vitamin B<sub>3</sub> (niacin – 90 mg ve 100 g sušiny), vitamin B<sub>2</sub> (riboflavin – 3,6 mg ve 100 g sušiny), vitamin B<sub>1</sub> (thiamin – 1,9 mg ve 100 g sušiny), dále vitamin B<sub>5</sub> (kyselina panthotenová) a biotin [1], vitamin B<sub>6</sub> (pyridoxin), kyselina folová (kyselina listová). [3] Byl zjištěn i obsah kyanokobalaminu (vitamin B<sub>12</sub>) v množství 0,5 mg ve 100 g čerstvé hlívy. [2] Z lipofilních vitaminů byl v suchých plodnicích detegován vitamin D<sub>2</sub>. [3] Při analýze lipofilních vitaminů byl nalezen v nezmýdelnitelném podílu tukové frakce vysoký obsah sterolů. Tento podíl je představován světle žlutou, měkkou hmotou a podíl sterolů v něm činil 20,7 %, z toho obsah  $\delta$ -sterolů dosahoval hodnoty 18,8%. Hlavním steroidem této směsi byl ergosterol. Obsah některých dalších vitaminů, hlavně C a K, je velmi malý. [3]

## 2.9 Ostatní dusíkaté látky

V plodnicích byly identifikovány betain, histamin, adenin, ethanolamin, ethylamin a močovina. [3]

### 3 ÚČINKY HLÍVY ÚSTŘIČNÉ NA ORGANISMUS

Léčebné a preventivní účinky hlívy jsou v Číně známé již pár století. Tradičně se používá k posílení cévního systému, uvolnění kloubů a napětí ve svalech. Na přelomu 60. a 70. let minulého století se výzkumem hlívy a dalších hub s prokazatelně léčivými účinky začali zabývat vědci nejprve v Japonsku a během dalších dvaceti let se zapojily i další země po celém světě. [23]

Tak, jak se postupně rozvíjely techniky studia různých organických sloučenin obsažených v různých rostlinách, lišejnících a houbách, se účinné látky z hub izolovaly a chemicky popisovaly. Kromě toho začali vědci zkoumat účinky samotných hub anebo izolovaných složek na procesy, spojené s různými nemocemi člověka. Zkoušky se provádějí na teplokrevných živočiších, především na potkanech, křečcích nebo na králících. Vědci objevují stále nové působení hlívy nebo z ní izolovaných účinných látek na teplokrevné živočichy. Ukazuje se, že hlíva, i když se jí už věnovalo hodně pozornosti, přináší v tomto oboru nová překvapení. [1]

#### 3.1 Rakovina

Výzkum protirakovinného působení hub se zkoumá po desetiletí. Japonští badatelé (Ikeka-wa a kol. 1969) zkoumali protirakovinné účinky vodných výluhů z hub. Jiný kolektiv Japonců (Kurashige a kol. 1997) našel pozitivní účinky hlívy ústřičné při protinádorové léčbě. V Japonsku izolovali Wang a kol. v roce 2000 nový lektin z hlívy ústřičné, který má výrazný vliv na potlačení vývoje určitých typů nádorů u myší (sarkom S-180, hematom H-22, to jsou typy nádorů, které lze standardně myším voperovat). Studium protirakovinných účinků hlívy ústřičné pokračuje také na Slovensku ve známé skupině odborníků z Výzkumného ústavu výživy v Bratislavě (Bobek, Galbavý a Ozdin, 1998). Zjistili, že hlíva ústřičná ve stravě snížila množství nádorů v tlustém střevě u pokusných potkanů, jejichž vznik byl uměle vyvolán podáváním jedovaté karcinogenní látky dimethylhydrazinu. Výzkum na Slovensku pokročil v izolaci účinné látky z hlívy – pleuranu. Bobek a Galbavý v roce 1999 zkoušeli jeho vliv na vývoj rakovinných změn v tlustém střevě potkanů, vyvolávaných podáváním karcinogenního dimethylhydrazinu. Podávání 10 % pleuranu snížilo výskyt předrakovinných lézí v tlustém střevě o 50 % ve srovnání s kontrolními potkany, kteří v dietě dostávali pouze karcinogenní látku. Pleuran také ovlivnil aktivitu

několika antioxidačních enzymů v játrech, které regulují výskyt volných oxidujících radikálů v organismu (např. konjugovaných dienů), které vyvolávají rakovinné změny v buňkách. [1]

### 3.2 Virus

Experimentálně se vědci zabývají izolací látky, která by mohla pomoci nositelům viru HIV.[14] V roce 2000 byl izolován z plodnic hlívy ústříčné glykoprotein, který inhibuje translaci určitých úseků ribonukleové kyseliny (RNA). Tento glykoprotein potlačoval transkriptázu viru-1, který způsobuje nedostatečnou imunitu člověka. [1]

### 3.3 Cholesterol

Skupina vědců ze Slovenska (Bobek a kol. 1991) ve Výzkumném ústavu výživy v Bratislavě prokázala, že přídavek 5 % hlívy do potravy u potkanů snižuje hladinu cholesterolu, přestože se v potravě podávaly dávky cholesterolu v množství 0,3 % z celkového množství potravy. Podanou dávkou hlívy se potlačilo hromadění cholesterolu v játrech a zvýšil transport cholesterolu v lipoproteinech. Rozklad a vylučování cholesterolu z organismu v podobě žlučových kyselin se působením hlívy urychlil. [1] Po podání vysokotukové cholesterolové diety křečkům, která obsahovala 2% přísadu suchých mletých plodnic hlívy byl nalezen výrazný protektivní efekt. Snížily se koncentrace potenciálně aterogenních lipoproteinů při nezměněné hladině HDL. [3] Při této dietě obsah cholesterolu poklesl. [4]

### 3.4 Ateroskleróza

Další slovenský výzkum (P. Bobek a S. Galbavý 1999) [1] se týkal jednoho z důsledků vysoké hladiny cholesterolu v krvi – aterosklerózy. [33] Ateroskleróza je dlouhodobý proces, při němž dochází k tuhnutí cévní stěny a zužování jejího průsvitu. Důsledkem tohoto zúžení je nedostatečné prokrvení orgánu, ke kterému daná céva míří. Příčinou aterosklerózy je ukládání tukových látek – především cholesterolu - do stěny našich cév. Hlavní podmínkou tvorby těchto změn je zvýšený příjem cholesterolu v potravě a následně jeho vyšší hladina v krvi. [34] Samcům králíků byly podávány vyšší dávky cholesterolu, některým v kombinaci s hlívou. Výskyt aterosklerotických ložisek byl u diety s hlívou nižší, a pokud se tato ložiska objevila, pak měla menší rozměry. Mimo to dieta s hlívou vedla k menšímu poškození věnčitých tepen a méně častým poškozením srdečního svalu. [33]

### 3.5 Cukrovka

Zajímavý byl výsledek pokusu s potkany, kteří měli cukrovku. [1] Příčina, kdy vznikne cukrovka, je nedostatek inzulínu, látky, která se normálně tvoří ve slinivce břišní. Jeho absolutní nedostatek, způsobený tím, že se ve slinivce přestal vytvářet, je příznačný jako cukrovka 1. typu. Naproti tomu relativní nedostatek inzulínu, charakteristický jako cukrovka 2. typu, je vyvolán poruchou jeho uvolňování ze slinivky nebo jeho sníženou účinností. [35] Skupina slovenských vědců (Chorváthová a kol. 1993) jim podávala v potravě hlívu ústřičnou a cholesterol. Po dvou měsících zjistili, že u těchto potkanů kromě snížení cholesterolu v krvi došlo také k významnému snížení glykémie – hladiny cukru v krvi, aniž by se změnila hladina inzulínu. [1]

### 3.6 Alkohol

Bratislavští vědci (Bobek a kol. 1991, Bobek a kol. 1997) [1] se rozhodli provést výzkum procesu hromadění tukových látek v játrech při dlouhodobém požívání alkoholu. Zjistili, že u skupiny syrských křečků, u nichž alkohol hladinu cholesterolů a triacylglycerolů v játrech zvyšuje, při souběžném podávání alkoholu a hlívy ke zvýšení obsahu tukových látek v játrech vůbec nedošlo. [33]

### 3.7 Osteoporóza

Osteoporóza je jedna z největších obav starších žen. [33] Osteoporóza je nemoc charakterizovaná úbytkem (prořídnutím) kostí, poruchami funkce a struktury kostní tkáně. Důsledkem je zvýšená náchylnost kostí ke zlomeninám. Jsou časté bolesti v zádech, objevuje se zvětšení předklonu - kulacení zad, snižuje se tělesná výška. V ČR trpí touto nemocí 428 000 žen a 195 000 mužů nad 50 let to je 13-18% žen a 4- 8% mužů. [37] Ženy, které užívají  $\beta$ -glukany delší dobu, mají hustotu kostí v normě, některé dokonce lepší než odpovídá příslušnému věkovému průměru. U zlomenin dochází k rychlejšímu srůstání, a tím se zkracuje doba potřebná k úplnému uzdravení.



### 3.8 Artróza

$\beta$ -glukany získané z hlívy ústříčné dokážou natolik nastartovat regeneraci organismu, že nastupující artróza (v některých případech i pokročilá) je řešitelná a pacientovi může navrátit původní pohyblivost. Dokonce lze zvrátit výměnu kloubu (totální endoprotézu).

### 3.9 Bolesti zad

$\beta$ -glukany mají blahodárný vliv jak na artrózu a osteoporózu, tak i na nejrůznější blokace zad. Jsou zaznamenány případy uzdravení nejen velmi běžného ischiasu, ale např. vybočených plotének. [36]

### 3.10 Nadváha

V Japonsku izolovala skupina vědců (Kawagishi a kol. 2000) zvláštní lektin, který způsoboval, že potkani nechtěli přijímat potravu, která obsahovala hlívu ústříčnou. Dieta, která obsahovala 0,1 % izolovaného lektinu, snížila příjem potravy o 50 % a způsobila pokles váhy pokusných zvířat. . [1]

### 3.11 Bradavice

Klinickými zkouškami byl zjištěn zajímavý efekt hlívy ústříčné – odstraňování bradavic virového původu a zastavení jejich opakovaného růstu. [38]

### 3.12 Funkce střev

$\beta$ -glukany mají pozitivní účinky na funkci střev. Zvyšují odolnost stěn střevní sliznice proti zánětům [39] a inhibují tvorbu vředů na střevní sliznici. [40] Mechanismus jakým chrání pleuran sliznice není dosud znám. [41] Pleuran snižuje množství konjugovaných dienuů ve střevech, v játrech a erytrocytech. [42]

### 3.13 Průmyslové zpracování hlívy ústříčné

Hlíva ústříčná je ceněna zejména pro své organoleptické vlastnosti. Je k dostání jako čerstvá, sušená, mražená nebo sterilovaná.

V poslední době se využívá jejích léčivých účinků ve farmacii. V obchodech se zdravou výživou nebo v lékárnách najdeme volně prodejný sortiment potravních doplňků ve formě tablet, kapslí, extraktů, sirupů až po krémy. [4]

## 4 ANALYTICKÉ METODY VYUŽITÉ PRO STANOVENÍ VYBRANÝCH LÁTEK HLÍVY ÚSTŘIČNÉ

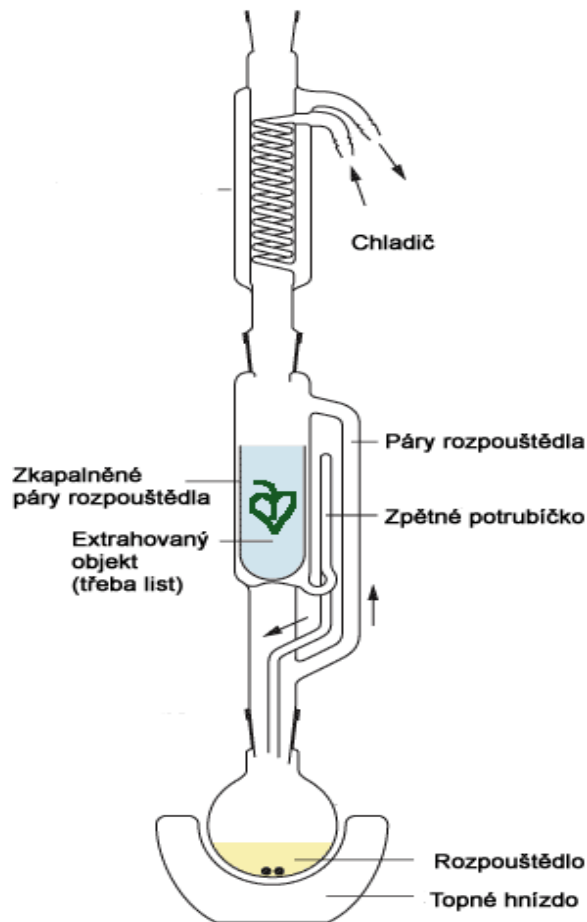
K analýze vybraných látek Hlívy ústřičné je možno využít celou řadu metod. Pokud se ale máme zaměřit na metody, které jsou vhodné k provozní kontrole při průmyslovém zpracování a které jsou nenáročné na technické a provozní vybavení, pak se jako vhodné jeví následující analytické metody:

- stanovení sušiny do konstantního úbytku hmotnosti,
- izolace analyzovaných látek extrakční metodou dle Soxhleta,
- stanovení neutrálně detergentní vlákniny (NDF),
- stanovení obsahu aminokyselin metodou iontově výměnné kapalinové chromatografie s ninhydrinovou detekcí,
- papírová chromatografie (PC),
- tenkovrstvá chromatografie (TLC),
- denzitometrie.

### 4.1 Stanovení sušiny

Voda je převládající složkou nebo tvoří podstatný podíl celkové hmotnosti suroviny. Z analytického hlediska je důležitá forma vazby vody v potravíně, která je buď volná nebo vázaná. S obsahem vody souvisí množství sušiny. Tímto pojmem se označuje souhrn všech organických i anorganických složek obsažených v potravíně, kromě vody. Nejpoužívanější metodou na stanovení sušiny a vody je sušení do konstantního zbytku, kde se využívá proces difúze, tj. transport vody z vnitřních vrstev na povrch vyvolaný koncentračním spádem. rychlost sušení je ovlivněná povahou vzorku, tvarem částic, množstvím navážky, teplotou, vlhkostí, rychlostí a směrem proudění sušícího média. [43]

## 4.2 Extrakce metodou dle Soxhleta



Obr. 8: Soxhletův extraktor

Používá se zejména k dělení organických látek. Je to metoda kontinuální extrakce. Analyt z tuhého vzorku je selektivně extrahován do vhodného rozpouštědla. [44] Do střední části přístroje se vkládá papírová extrakční patrona, která má válcový tvar a kulaté dno a která se naplní vzorkem. Baňka se naplní vhodným rozpouštědlem, v němž se dobře rozpouští složka, kterou chceme oddělit. Baňka se zahřívá k varu rozpouštědla a jeho páry stoupají postranní trubičkou kolem střední části extraktoru do chladiče, kde kondenzují. Rozpouštědlo kape na vzorek obsažený v papírové patroně. Střední část extraktoru se postupně plní z kondenzovaným rozpouštědlem, jehož hladina stoupá i v tenké přepadové trubičce. Stoupne-li hladina rozpouštědla ve střední části extraktoru k nejvyšší části přepadové trubičky, přeteče roztok do destilační baňky, z níž se těkavé rozpouštědlo znovu destiluje. Nakonec se získá roztok jedné nebo více složek v destilační baňce, z níž po ukončené ex-

trakci rozpouštědlo vydestilujeme. V baňce tak zůstane jen izolovaná složka, popř. složky. [45] Takto připravené roztoky dále použijeme pro chromatografii.

### 4.3 Stanovení neutrálně detergentní vlákniny (NDF)

Hodnota NDF zahrnuje všechny složky buněčné stěny, tedy hemicelulózu, celulózu, lignin a popel. Vzorek se v prostředí neutrálního roztoku (pH 7) účinné látky laurylsulfátu sodného hydrolyzuje a nehydrolyzované složky se stanoví vážkově. [46]

### 4.4 Stanovení obsahu aminokyselin metodou iontově výměnné kapalinové chromatografie s ninhydrinovou detekcí

V dnešní době se k analýze aminokyselin využívá automatických analyzátorů. Vzorek se vede na začátek kolony, promývá se pufrujícími roztoky s rozdílnými hodnotami pH a rozdílnou iontovou silou. Z kolony postupně vycházejí jednotlivé aminokyseliny, které se vedou do vyhřátého reaktoru (121°C), do něhož se přivádí ninhydrinová směs. Proběhne reakce ninhydrinu s aminokyselinami a iminokyselinami. Ninhydrin je silné oxidační činidlo, které reaguje s  $\alpha$ -aminoskupinami, uvolňuje amoniak, oxid uhličitý, aldehyd a redukovanou formu ninhydrinu hydrindantin. Uvolněný amoniak pak reaguje s hydrintaninem a další molekulou ninhydrinu a dává purpurovou substanci (Ruhemanova červeň). Hydrindantin přítomný v detekčním činidle zabraňuje vedlejší reakci, která by redukovala vznikající Ruhemanovu červeň. Sekundární aminokyseliny vytvářejí různé chromofory. Ruhemanova červeň má absorpční maximum při 570 nm. Tato absorbance je lineární funkcí množství přítomných  $\alpha$ -aminoskupin. Reakce je vhodným základem pro stanovení všech organických sloučenin obsahujících aminokyseliny. Reakce ninhydrinu se sekundárními aminokyselinami má absorpční maximum při 440 nm. [47]



Obr. 9: Analyzátor aminokyselin AAA 400 (Ingos, Praha)

Automatický analyzátor aminokyselin je určen pro stanovení aminokyselin v hydrolyzátech bílkovin, peptidů, pro stanovení volných aminokyselin ve fyziologických roztocích a extraktech a pro stanovení biogenních aminů. Díky tomu nachází analyzátor uplatnění v základním biochemickém výzkumu bílkovin, výzkumu výživy lidí a zvířat, v lékařské diagnostice, při kontrole léčiv a potravin. [48]

#### 4.5 Papírová chromatografie (PC)

Papírová chromatografie (paper chromatography, PC) je analytická metoda. Je jednoduchá a dostupná, umožňuje práci s mikrogramovými kvanty, dovoluje zkoumat chemickou povahu látek i ve směsích, má schopnost dělit homology a lze jí využít pro strukturní analýzu a pro studium reakční kinetiky. [49]

Vzorek se nanese ve formě malé kulaté skvrnky na papír nebo tenkou vrstvu a poté se mobilní fáze nechá vzlínat póry papíru nebo tenké vrstvy. Chromatogram se vyvíjí v uzavřené chromatografické komoře, která je dobře nasycena parami mobilní fáze. Mobilní fáze unáší dělené látky ze vzorku, které se více či méně zpožďují interakcí (rozpuštění nebo adsorpce) se stacionární fází, a tím se vzájemně dělí. Vyvíjení se ukončí vybráním chromatogramu z vyvíjecí komory, když čelo mobilní fáze dosáhne téměř protilehlého okraje papíru či tenké vrstvy. Čelo mobilní fáze se označí měkkou tužkou. Chromatogram se vysuší a skvrny nebarevných analytů je třeba před vyhodnocováním chromatogramu detekovat použitím vhodné detekční metody.

Stacionární fází pro papírovou chromatografii je většinou voda zachycená na papíře. Jako mobilní fáze se používají organická rozpouštědla nebo jejich směsi, které se s vodou nemísí nebo mísí omezeně. Chromatogramy lze vyvíjet sestupně, radiálně popř. vzestupně. Jednotlivé separované analyty se charakterizují tzv. retardačním faktorem ( RF ). [50] Je to poměr vzdálenosti středu (těžiště) skvrny od startu a vzdálenosti čela rozpouštědla od startu. To znamená, že se hodnoty RF pohybují od 0 do 1; pro látky u startu se blíží nule, pro látky u čela se blíží jedné. Hodnoty RF by sice měly být při přesném dodržování experimentálních podmínek reprodukovatelné, avšak ovlivňuje je tolik faktorů (teplota, změny ve složení mobilní fáze, způsobené chybami v odměřování nebo jejím stárnutím, obsah zakotvené fáze v papíře, vzdálenost startu od hladiny rozpouštědla, druh papíru, stupeň sycení komory, způsob vyvíjení, přítomnost dalších látek ve směsi atd.), že při praktickém provádění chromatografie vždy kolísají. Proto je nikdy nelze považovat za konstanty. [51]

#### 4.6 Tenkovrstvá chromatografie (TLC)

Moderní chromatografické metody, které způsobily mohutný rozvoj organické a biochemické analýzy i preparativního dělení, jsou dnes nemyslitelné bez chromatografie na tenké vrstvě. Tato chromatografie, označovaná zkratkou TLC (thin-layer chromatography), spočívá v dělení látek v tenké vrstvě pevné fáze-sorbentu za použití mobilní fáze. [52] Jako stacionární fáze se používají prakticky všechny stacionární fáze jako pro kolonovou chromatografii se zrnitostí 5 až 40  $\mu\text{m}$ .- oxid hlinitý, silikagel, celulóza, iontoměniče, polyamid a silikagel s -C18, -NH<sub>2</sub> nebo -CN skupinami - naneseny na skleněných deskách nebo hliníkových fóliích. Tenké vrstvy mohou obsahovat fluorescenční indikátor UV254 k usnadnění detekce analyzovaných látek. Jako mobilní fáze se používá cyclohexan, toluen, chloroform, dichlormetan, aceton, ethanol, methanol, voda, amoniak, kyselina octová a jejich směsi. [50] TLC umožňuje poměrně výkonné dělení ve velmi krátké době s jednoduchým a nenákladným zařízením. Způsob práce s TLC je obdobný jako u papírové chromatografie. Jednotlivé separované analyty se charakterizují tzv. retardačním faktorem ( RF ) (viz. kapitola 4.5). [52]

#### 4.7 Denzitometrie

Denzitometrie se zabývá měřením optické hustoty. K vyhodnocení hustoty zbarvení v plošném uspořádání se používá optických denzitometrů. Jedná se o postup podobný fotomet-

rickému měření, liší se v uspořádání. Měřením intenzity záření odraženého od neprůhledné podložky (používá se např. v tenkovrstvé chromatografii) se zabývá reflexní denzitometrie. Hodnotí se poměr intenzity dopadajícího světla a světla odraženého od barevné plochy. Druhou variantou denzitometrie je měření intenzity záření procházejícího průhlednou plochou (např. při hodnocení elektroforeogramu). Při přímé denzitometrii se získává grafický záznam fotometrovaného úseku, jednotlivé frakce dělené směsi tvoří na záznamu v ideálním případě souměrné křivky zvonovitého tvaru. Plocha těchto píků připadajících jednotlivým frakcím je úměrná relativnímu zastoupení jednotlivých frakcí v dělené směsi. [53]



## 5 STATISTICKÉ ZPRACOVÁNÍ VÝSLEDKŮ

### 5.1 Aritmetický průměr

Aritmetický průměr je součet hodnot znaku zjištěných u všech jednotek souboru, dělený počtem všech jednotek souboru.

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i$$

kde

$\bar{x}$  je aritmetický průměr,

$x_i$  jsou měřené hodnoty,

$n$  je počet měřených hodnot.

### 5.2 Směrodatná odchylka

Jedná se o kvadratický průměr odchylek hodnot znaku od jejich aritmetického průměru. Směrodatná odchylka vyjadřuje rozptyl hodnot kolem střední hodnoty, tj. vypovídá o tom, jak se hodnoty od této střední hodnoty (průměru) liší.

$$s_x = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

kde

$\bar{x}$  je aritmetický průměr,

$x_i$  jsou měřené hodnoty,

$n$  je počet měřených hodnot. [54]

### 5.3 Korelační koeficient

Korelační analýza se zabývá mírou závislosti náhodných dat. Korelační koeficienty slouží jako míry vyjádření “těsnosti lineární vazby”. Korelační analýza popisuje lineární vztahy mezi veličinami.[55]

$$v_x = \frac{s_x}{\bar{x}} \cdot 100 \quad [\%]$$

kde

$s_x$  je aritmetický průměr,

$\bar{x}$  je aritmetický průměr.

## **II. PRAKTICKÁ ČÁST**

## 6 VZORKY K ANALÝZE VYBRANÝCH LÁTEK

### VZOREK 1

**Hlíva ústříčná sušená**, původ Čína, koupeno v prodejně Zdravá linie ve Vsetíně



*Obr.10: Vzorek 1*

### VZOREK 2

**Hlíva ústříčná sušená**, původ Praha, firma Samyco, koupeno ve Zlíně



*Obr. 11: Vzorek 2*

## VZOREK 3

**Hlíva ústříčná čerstvá**, původ Soběslav, firma České houby a.s., koupeno v hypermarketu Kaufland ve Vsetíně



*Obr. 12: Vzorek 3*

## VZOREK 4

**Hlíva ústříčná čerstvá**, původ Čeladná, pěstovaná na slámě, koupeno na tržnici ve Zlíně



*Obr. 13: Vzorek 4*

## STANDARD

Beta Glucan 120 tbl. 30, 120 mg/tableta, výrobce NATURES s.r.o. SR



Obr. 14: Standard

Před použitím vzorků k analýze byly vzorky 3 a 4 nakrájeny nadrobno a sušeny při 50 °C do konstantní hmotnosti. Jako standardy byly použity tablety Beta-glucanu, které byly před extrakcí rozdrceny na prášek.

Tab. 3 Vzorky použité pro stanovení sušiny, NDF a aminokyselin

Číslo vzorku	Klasifikace vzorku
1	vzorek 1, komerčně získaná sušená Hlíva ústříčná, pro účely experimentu byla dosušena při 50°C do konstantního úbytku
2	vzorek 2, komerčně získaná sušená Hlíva ústříčná, pro účely experimentu byla dosušena při 50°C do konstantního úbytku
3	vzorek 3, sušený při 50°C do konstantního úbytku
4	vzorek 4, sušený při 50°C do konstantního úbytku

Tab.4 Vzorčky použité pro papírovou a tenkovrstvou chromatografii (extrakty v ethanolu)

<b>Číslo vzorku</b>	<b>Klasifikace vzorku</b>
<b>1a</b>	ethanolový extrakt vzorku 1 za laboratorní teploty
<b>1b</b>	ethanolový extrakt vzorku 1 za teploty varu rozpouštědla
<b>2a</b>	ethanolový extrakt vzorku 2 za laboratorní teploty
<b>2b</b>	ethanolový extrakt vzorku 2 za teploty varu rozpouštědla
<b>3a</b>	ethanolový extrakt vzorku 3 za laboratorní teploty
<b>3b</b>	ethanolový extrakt vzorku 3 za teploty varu rozpouštědla
<b>4a</b>	ethanolový extrakt vzorku 4 za laboratorní teploty
<b>4b</b>	ethanolový extrakt vzorku 4 za teploty varu rozpouštědla
<b>S1</b>	ethanolový extrakt standardu za laboratorní teploty
<b>S2</b>	ethanolový extrakt standardu za teploty varu rozpouštědla

Tab. 5 Vzorčky použité pro papírovou a tenkovrstvou chromatografii (extrakty v methanolu)

<b>Číslo vzorku</b>	<b>Klasifikace vzorku</b>
<b>1c</b>	methanolový extrakt vzorku 1 za laboratorní teploty
<b>1d</b>	methanolový extrakt vzorku 1 za teploty varu rozpouštědla
<b>2c</b>	methanolový extrakt vzorku 2 za laboratorní teploty
<b>2d</b>	methanolový extrakt vzorku 2 za teploty varu rozpouštědla
<b>3c</b>	methanolový extrakt vzorku 3 za laboratorní teploty
<b>3d</b>	methanolový extrakt vzorku 3 za teploty varu rozpouštědla
<b>4c</b>	methanolový extrakt vzorku 4 za laboratorní teploty

Číslo vzorku	Klasifikace vzorku
<b>4d</b>	methanolový extrakt vzorku 4 za teploty varu rozpouštědla
<b>S3</b>	methanolový extrakt standardu za laboratorní teploty
<b>S4</b>	methanolový extrakt standardu za teploty varu rozpouštědla



## 7 METODY

Zde budou popsány jednotlivé postupy použité při stanovení vybraných látek z hlívy ústřičné.

### 7.1 Stanovení sušiny a vody

#### Princip:

Zhomogenizovaný vzorek o známé hmotnosti se suší při teplotě 50°C do konstantního úbytku hmotnosti. [56]

#### Postup:

Petriho miska se předsuší v sušárně při teplotě 105°C půl hodiny, poté se kleštěmi vloží do exsikátoru a po vychladnutí se miska zváží na analytických vahách s přesností na desetinu mg. Do misky se naváží s přesností na desetinu mg homogenizovaný vzorek, vloží se do sušárny a suší při 50°C do konstantního úbytku hmotnosti.

Stanovení bylo provedeno paralelně 2x vedle sebe.

#### Výpočet:

a) *Obsah sušiny v hmot.% se vypočte podle vzorce:*

$$S = \frac{m_2 - m_0}{m_1 - m_0} \cdot 100$$

kde

$m_2$  hmotnost Petriho misky se vzorkem po vysušení [g].

$m_1$  hmotnost Petriho misky s navážkou vzorku před vysušením [g],

$m_0$  hmotnost vysušené prázdné Petriho misky [g],

b) *Obsah vlhkosti v hmot.% se vypočte podle vzorce:*

$$V = 100 - S$$

## 7.2 Extrakce vzorků v Soxhletově ekstraktoru

### Princip:

Jedná se o extrakci tuhé látky kapalinou za použití Soxhletova extraktoru. Analyt z tuhého vzorku je selektivně extrahován do vhodného rozpouštědla. K extrakci byly použity vzorky z tabulky 4 a standard. [44]

### Postup:

Extrahovanou látkou, důkladně rozmělněnou se plní papírová extrakční patrona, a poté se vkládá do střední části přístroje. Varná baňka (250 ml) se naplní rozpouštědlem (100 % methanol nebo ethanol v množství asi 80ml), přidají se varné střípky, baňka se nasadí na extraktor, otevře se ventil od přívodu vody do chladiče a zapne se topné hnízdo. Páry rozpouštědla vroucího v baňce kondenzují v chladiči, stékají na extrahovaný vzorek a přetéka zpět do varné baňky (doba extrakce přibližně dvě hodiny). Získané extrakty převedeme do skleněných lékovek a takto nachystané použijeme k analýze.

## 7.3 Extrakce vzorků při laboratorní teplotě

Předem vysušené vzorky se nasekají nadrobno. Do 50 ml plastových vialek je vždy naváženo cca 5g vzorku a k němu přidáno 45 ml rozpouštědla, a to buď methanolu nebo ethanolu. Vialky umístíme na 2 hodiny na třepačku. Poté obsahy vialek zfiltrujeme přes filtr 390 a převedeme do skleněných lékovek a takto nachystané extrakty použijeme k analýze. K extrakci byly použity vzorky z tabulky 4 a standard.

## 7.4 Stanovení neutrálně-detergentní vlákniny (NDF)

### Princip:

Neutrálně-detergentní vláknina, jako zbytek buněčných stěn rostlinných pletiv, se stanoví vážkově po hydrolýze vzorku v prostředí neutrálního roztoku laurylsulfátu sodného. [57]

### Roztoky:

1. Roztok NDČ (Neutrálně detergentní činidlo obsahující – disodnou sůl kyseliny ethylen-diamintetraoctové, tetraboritan sodný dekahydrát, hydrogenfosforečnan sodný a laurylsulfát sodný):

Do 2 l destilované vody se rozpustí 120 g činidla, 20 ml trietylenglykolu. Roztok má mít pH v rozmezí 6,9-7,1.

2. Pracovní roztok NDC (laurylsulfát sodný v neutrálním prostředí):

Do 2 l NDC se přidá siřičitan sodný v množství 1 g / 100 ml NDC a  $\alpha$ -amylázy v množství 0,2 ml/100 ml NDC.

3. Aceton – o čistotě p.a.

### **Postup:**

Filtrační sáčky vypereme v acetonu a po odvětrání v digestoři zvážíme ( $m_1$ ). Pro označování sáčků je nutné použít popisovač na textil. Do sáčku navážíme 0,5g vzorku s přesností 0,0001g ( $m_2$ ) Po zatavení sáčku poklepáním vzorek rozprostřeme na celou plochu uzavřeného sáčku. jeden prázdný sáček zatavíme a ponecháme pro stanovení korekcí ( $c_1$ ,  $c_2$ ). Všechny sáčky umístíme do zavěšovače po třech do jednoho oddílu. Poslední oddíl zůstává prázdný, slouží jako víko a položí se na něj závaží. Zavěšovač se vzorky umístíme do analyzátoru vlákniny (ANKOM technology Fiber analyzer). Do přístroje nalijeme pracovní roztok NDC v množství 100 ml/sáček. Zapneme míchání (Agitation) a topení (Heat). Zavřeme přístroj, utěsníme víko a zapneme start. Po 75 minutách vypneme míchání a ohřev. Opatrně otevřeme vypouštěcí ventil a otevřeme víko. Po vypuštění NDC roztoku uzavřeme vypouštěcí kohout a nalijeme 2l horké (85-90°C) vody a přidáme 4 ml  $\alpha$ -amylázy. Zavřeme víko, ale neutahujeme. Zapneme míchání a topení. Po 4 minutách vypustíme vodu. Toto opakujeme dvakrát. Při třetím propláchnutí použijeme vodu bez  $\alpha$ -amylázy. Po vypuštění vody vytáhneme zavěšovač z přístroje, vyjmeme sáčky a jemně vymačkáme vodu pomocí filtračního papíru. Sáčky vložíme do kádinky a přelijeme acetonem. necháme ponořené 3 minuty. Po vyjmutí jemně vytlačíme aceton pomocí filtračního papíru, rozprostřeme a necháme vyvětrat aceton v digestoři. sáčky se vysuší při 105°C po dobu 3 hodin. po vysušení vložíme sáčky do exsikátoru a po vychladnutí zvážíme( $m_3$ ). Spálíme v muflové peci při 550°C po dobu 5 hodin. Po ochlazení v exsikátoru sáčky zvážíme ( $m_4$ ).

Výpočet:

$$V = \frac{(m_3 - m_1 c_1) - (m_4 - m_1 c_2)}{m_2} \cdot 100$$

kde

V obsah NDF (%)

$m_1$  hmotnost sáčku (g)

$m_2$  hmotnost navážky vzorku (g)

$m_3$  hmotnost vysušeného sáčku s rezidui vzorku po hydrolýze (g)

$m_4$  hmotnost popela po spálení vysušeného sáčku s rezidui vzorku po hydrolýze (g)

$c_1$  korekce hmotnosti sáčku po hydrolýze (g)

$c_2$  korekce hmotnosti sáčku po spálení (g)

Vypočet korekcí:

$$c_1 = \frac{m_S}{m_1} \qquad c_2 = \frac{m_P}{m_1}$$

kde

$m_S$  hmotnost vysušeného sáčku po hydrolýze (g)

$m_P$  hmotnost popela sáčku (g)

## 7.5 Analýza aminokyselin metodou iontovýměnné kapalinové chromatografie

### 7.5.1 Příprava vzorků pro stanovení volných aminokyselin

Odváží se 0,1 g usušeného a zhomogenizovaného vzorku s přesností na 0,0001 g. Kyselá hydrolýza se provede ve varných baňkách (250 ml) bez uzavření pod zpětným vzdušným chladičem. Navážka vzorku se kvantitativně převede do hydrolyzační baňky, přidá se dostatečný objem kyseliny chlorovodíkové ( $c = 6 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ), tj. asi 150 až 250 ml na 1g na-

vážky a kroužením se obsah promísí. Hydrolýza pod zpětným chladičem probíhá na topném hnízdě, aby se obsah baňky vařil, což odpovídá bodu varu azeotropní směsi voda – kyselina chlorovodíková, asi 110°C. Hydrolýza probíhá 23 hodin při teplotě 110 – 115°C (po dosažení teploty). Po ukončení hydrolýzy se obsah hydrolyzační baňky kvantitativně převede kyselinou chlorovodíkovou ( $c = 0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ) přes filtrační papír (390) do odměrné baňky (250 ml) a doplní se kyselinou chlorovodíkovou ( $c = 0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ). Z filtrátu se odebere alikvotní část (25 ml), která se odpaří na rotační vakuové odparce (RVO 400, Ingos, Praha) za použití vývěvy do sirupovité konzistence při teplotě max. 50°C. Sirupovitý odparek se rozmíchá v několika ml destilované vody a znovu odpaří – opakovat ještě jednou. Odparek se kvantitativně převede do odměrné baňky (10 ml) tlumivým roztokem o pH 2,2 a použije k analýze aminokyselin v automatickém analyzátoru AAA 400 (Ingos, Praha), přičemž před samotnou analýzou je nutné vytěsnit ze vzorku kyslík pomocí plynu argonu. Stanovení se provádí 3x vedle sebe.

Tab. 6 Navážky vzorků pro stanovení volných aminokyselin

Stanovení	Vzorky [g]			
	1	2	3	4
I.	0,1021	0,1087	0,1543	0,1477
II.	0,1065	0,1022	0,1534	0,1565
III.	0,1024	0,1060	0,1538	0,1534

### 7.5.2 Příprava vzorků pro stanovení sirných aminokyselin

Sirné aminokyseliny se oxidují směsí peroxidu vodíku (30 %) a kyseliny mravenčí (85 %) v poměru 1 : 9. Směs se po smísení nechá stát při pokojové teplotě 2 hodiny a poté umístí do chladničky při teplotě 0°C na dobu 15 minut. Odváží se 1,5 g vzorku s přesností na 0,0001 g a kvantitativně převede do varné baňky. Ke vzorku se přidá 15 ml oxidační směsi a po opatrném rozmíchání se umístí do chladničky při teplotě 0 – 4°C na dobu 16 hodin. K oxidovanému vzorku se přidá nejprve 1 ml koncentrované kyseliny chlorovodíkové a po vyšumění dalších 100 – 150 ml kyseliny chlorovodíkové ( $c = 6 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ). Kyselá hydrolýza se provede ve varných baňkách bez uzavření pod zpětným vzdušným chla-

dičem 23 hodin při teplotě 110 °C (po dosažení teploty). Po ukončení hydrolýzy se obsah hydrolyzační baňky kvantitativně převede kyselinou chlorovodíkovou ( $c = 0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ) přes filtrační papír (390) do odměrné baňky (250 ml) a doplní se kyselinou chlorovodíkovou ( $c = 0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ). Z filtrátu se odebere alikvotní část (25 ml), která se odpaří na rotační vakuové odparce za použití vývěvy do sirupovité konzistence při teplotě max. 50°C. Sirupovitý odparek se rozmíchá v několika ml destilované vody a znovu odpaří – opakovat ještě jednou. Odparek se kvantitativně převede do odměrné baňky (10 ml) tlumivým roztokem o pH 2,2 a použije k analýze aminokyselin v automatickém analyzátoru AAA 400 (Ingos, Praha), přičemž před samotnou analýzou je nutné vytěsnit ze vzorku kyslík pomocí plynu argonu.

Tab. 7 Navážky vzorků pro stanovení sirných aminokyselin

Stanovení	Vzorky [g]			
	1	2	3	4
I.	1,4520	1,5012	1,5050	1,5151
II.	1,5400	1,5021	1,5106	1,5181

## 7.6 Papírová chromatografie (PC)

Pro dělení jednotlivých skupin látek byl použit chromatografický papír Whatman 1. Skvrny byly dále detekovány pomocí UV lampy při 254 nm. Každý vzorek byl nanesen pomocí injekční stříkačky.

### 7.6.1 Dělení sacharidů a $\beta$ -glukanů

Tab. 8 Soustavy pro dělení sacharidů a  $\beta$ -glukanů na papíře

	Vyvíjecí soustava	Poměr chemikálií
I.	butanol : benzen : pyridin : voda	4 : 3 : 3 : 2
II.	butanol : benzen : pyridin : voda	4 : 3 : 2 : 1

	Vyvíjecí soustava	Poměr chemikálií
III.	ethylacetát : pyridin : voda	60 : 35 : 10
IV.	ethylacetát : pyridin : voda	15 : 4 : 1
V.	ethylacetát : pyridin : voda	2 : 1 : 2
VI.	butanol : kyselina octová : voda	4 : 1 : 5
VII.	ethylacetát : pyridin : voda	4 : 1 : 2
VIII.	ethylacetát : pyridin : voda	4 : 1 : 1
IX.	ethylacetát : kyselina octová : voda	3 : 1 : 3
X.	ethylacetát : kyselina octová : voda	3 : 2 : 1
XI.	butanol : pyridin : voda	6 : 4 : 3
XII.	ethylacetát : pyridin : benzen	2 : 1 : 2
XIII.	butanol : ethanol	4 : 2
XIV.	butanol nasycený vodou	2 : 1

## 7.7 Tenkovrstvá chromatografie (TLC)

Na rozdělení jednotlivých skupin látek byly použity chromatografické desky ALUGRAM SIL G/UV254 . Skvrny byly dále detekovány pomocí UV lampy při 254 nm a vyhodnocovány pomocí denzitometru při 366 nm. Každý vzorek byl nanesen pomocí injekční stříkačky.

### 7.7.1 Dělení sacharidů

Tab. 9 Soustavy pro dělení sacharidů na tenké vrstvě

	Vyvíjecí soustava	Poměr chemikálií
I.	ethylacetát : isopropanol : voda	3 : 2 : 1
II.	ethylacetát : isopropanol : voda	8 : 3 : 1
III.	ethylacetát : isopropanol : voda	10 : 1 : 1
IV.	hexan : ethylacetát	3 : 1
V.	cyklohexan : ethylacetát	4 : 1

### 7.7.2 Dělení terpenů

Tab. 10 Soustavy pro dělení terpenů na tenké vrstvě

	Vyvíjecí soustava	Poměr chemikálií
I.	benzen : methanol : voda	10 : 5 : 5
II.	petrolether : methanol : voda	10 : 8 : 2
III.	toluen : ethylacetát : methanol : voda	9 : 1 : 5 : 5
IV.	toluen : methanol : voda	10 : 5 : 5



## 8 VÝSLEDKY A DISKUZE

### 8.1 Stanovení sušiny a vody jednotlivých vzorků

Sušina byla stanovena pouze u vzorků 3 a 4. Stanovení bylo pro každý vzorek provedeno paralelně 2x vedle sebe.

Tab. 11 Výsledky stanovení sušiny a vody u vzorku 3

vzorky	$m_0$ [g]	$m_1$ [g]	$m_2$ [g]	S [hmot. %]	V [hmot. %]
$2_1$	86,3640	91,3676	86,7962	8,6	91,4
$2_2$	85,8675	90,9647	86,3253	9,0	91,1
			$\emptyset$	<b>8,8± 0,2</b>	<b>91,2± 0,2</b>

Tab. 12 Výsledky stanovení sušiny a vody u vzorku 4

vzorky	$m_0$ [g]	$m_1$ [g]	$m_2$ [g]	S [hmot. %]	V [hmot. %]
$3_1$	87,5162	92,5236	87,9688	9,0	91,0
$3_2$	83,5538	88,6180	84,0014	8,8	91,2
			$\emptyset$	<b>8,9± 0,1</b>	<b>91,1± 0,1</b>

Průměrný obsah sušiny ve vzorku 2 :  $S = 8,8$  hmot.%, směrodatná odchylka  $s_x = 0,2$

Průměrný obsah vlhkosti ve vzorku 2 :  $V = 91,2$  hmot.%, směrodatná odchylka  $s_x = 0,2$

Průměrný obsah sušiny ve vzorku 3 :  $S = 9,0$  hmot.%, směrodatná odchylka  $s_x = 0,1$

Průměrný obsah vlhkosti ve vzorku 3 :  $V = 91,1$  hmot.%, směrodatná odchylka  $s_x = 0,1$

Stanovení sušiny bylo provedeno paralelně 2x vedle sebe u vzorků 3 a 4 dle metodiky popsané v kapitole 6.1. Průměrný obsah sušiny u vzorku 2 byl 8,8 hmot.% ± 0,2, u vzorku 3 byl 9,0 hmot.% ± 0,1. Průměrný obsah vody u vzorku 2 byl 91,2 hmot.% ± 0,2 a u vzorku 3 byl 91,1 hmot.% ± 0,1. Podle literatury obsahují plodnice hlívy podobně jako jiné houby

přibližně 85 až 95 % vody a podíl sušiny se tak pohybuje kolem 10 %, což se touto laboratorní metodou potvrdilo.

## 8.2 Stanovení neutrálně detergentní vlákniny (NDF)

Neutrálně-detergentní vláknina byla stanovena postupem dle kapitoly 6.4. Pro stanovení byly použity vzorky z tabulky 3. Každý vzorek byl stanoven 3x vedle sebe.

Tab. 13 Hodnoty prázdného filtračního sáčku

Prázdny sáček	
$m_1$ [g]	0,4739
$m_s$ [g]	0,4776
$m_p$ [g]	0,0012

Tab. 14 Výsledky stanovení NDF u vzorku č.1

Stanovení	$m_1$ [g]	$m_2$ [g]	$m_3$ [g]	$m_4$ [g]	$c_1$	$c_2$	NDF %
I.	0,4528	0,5073	0,6078	0,0055	1,0548	0,0027	30,7
II.	0,4558	0,5014	0,6173	0,0066	1,0478	0,0026	27,4
III.	0,4602	0,5065	0,6156	0,0055	1,0378	0,0026	31,4
							Ø 29,8 % ± 1,7

Tab. 15 Výsledky stanovení NDF u vzorku č.2

Stanovení	$m_1$ [g]	$m_2$ [g]	$m_3$ [g]	$m_4$ [g]	$c_1$	$c_2$	NDF %
I.	0,4568	0,5028	0,6530	0,0062	1,0455	0,0026	33,9
II.	0,4637	0,5013	0,6630	0,0065	1,0300	0,0026	35,9
III.	0,4726	0,5007	0,6706	0,0056	1,0106	0,0025	37,7
							Ø 34,5 % ± 1,5

Tab. 16 Výsledky stanovení NDF u vzorku č.3

Stanovení	m <sub>1</sub> [g]	m <sub>2</sub> [g]	m <sub>3</sub> [g]	m <sub>4</sub> [g]	c <sub>1</sub>	c <sub>2</sub>	NDF %
I.	0,4535	0,5023	0,6394	0,0057	1,0531	0,0026	31,3
II.	0,4596	0,5029	0,6478	0,0056	1,0392	0,0026	33,0
III.	0,4557	0,5034	0,6442	0,0057	1,0481	0,0026	32,2
							Ø 32,2 % ± 0,7

Tab. 17 Výsledky stanovení NDF u vzorku č.4

Stanovení	m <sub>1</sub> [g]	m <sub>2</sub> [g]	m <sub>3</sub> [g]	m <sub>4</sub> [g]	c <sub>1</sub>	c <sub>2</sub>	NDF %
I.	0,4504	0,5013	0,6835	0,0078	1,0604	0,0027	39,8
II.	0,4350	0,5067	0,6748	0,0086	1,0979	0,0028	37,5
III.	0,4517	0,5014	0,6857	0,0072	1,0573	0,0027	40,3
							Ø 39,2 % ± 1,2

Z výsledků uvedených v tabulkách 14 – 17 bylo zjištěno, že nejvyšší průměrný obsah neutrálně detergentní vlákniny (NDF) byl u vzorku 4, a to 39,2 % ± 1,2 (3,5 hmot. % v sušině). Druhý nejvyšší obsah NDF byl zaznamenán u vzorku 2, a to 34,5 % ± 1,5 (2,8 hmot. % v sušině). U vzorku 3 byl průměrný obsah NDF 32,2 % ± 0,7 (2,8 hmot. % v sušině) a 29,8 % ± 1,7 (2,5 hmot. % v sušině) u vzorku 1. Obsah vlákniny nebyl u vzorků signifikantní. Zřejmě bude záviset na způsobu zpracování hlívy.

### 8.3 Analýza aminokyselin pomocí iontovýměnné kapalinové chromatografie

Před vlastním stanovením bylo nutné provést hydrolýzu vzorků. Před stanovením volných aminokyselin byla provedena kyselá hydrolýza a před stanovením sirmých aminokyselin oxidativní hydrolýza.

Tab. 18 Výsledky stanovení aminokyselin pomocí analyzátoru AAA 400

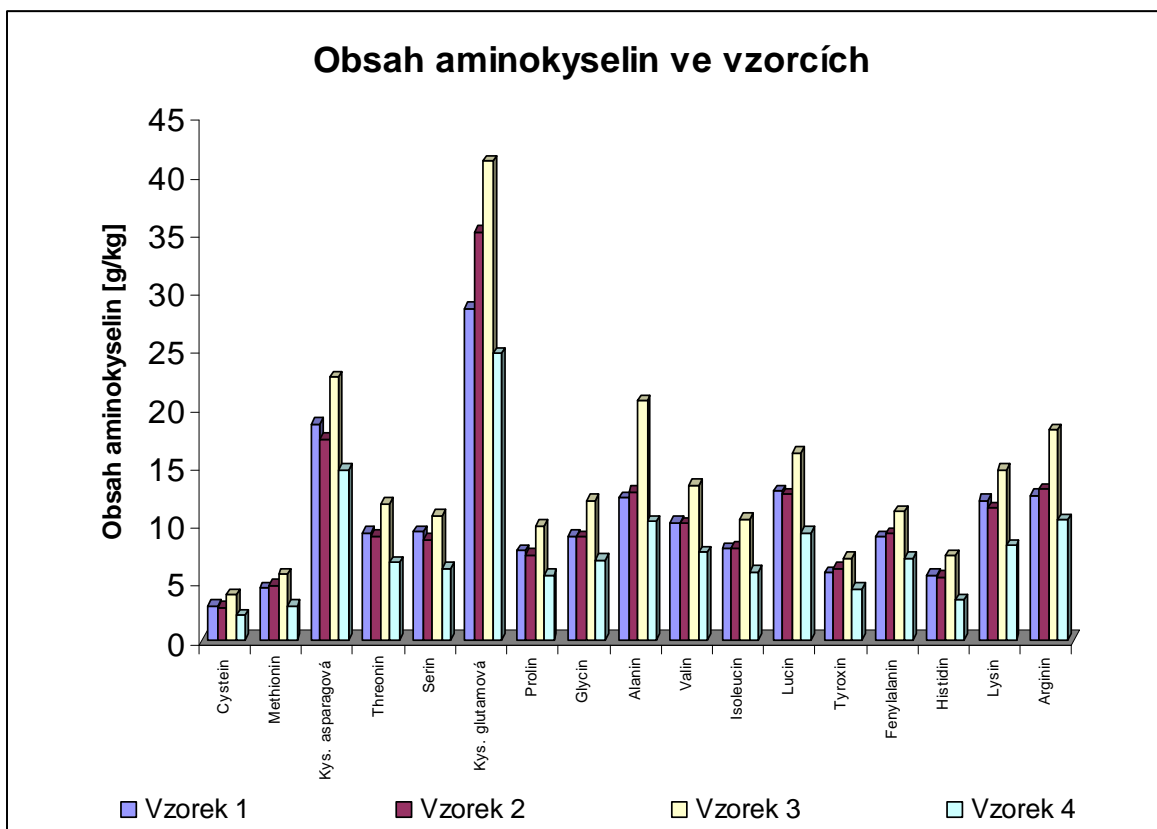
Aminokyselina	Obsah aminokyselin [g.kg <sup>-1</sup> ]											
	1			2			3			4		
	Mean	S.D.	CV[%]	Mean	S.D.	CV[%]	Mean	S.D.	CV	Mean	S.D.	CV[%]
cystein	2,90	0,060	2,1	2,11	0,087	4,1	3,88	0,036	0,9	2,75	0,016	0,6
Methionin	4,50	0,118	2,6	2,92	0,164	5,6	5,61	0,015	0,3	4,65	0,042	0,9
Kys. asparagová	18,54	0,986	5,3	14,65	0,652	4,5	22,56	0,682	3,0	17,22	0,846	4,9
Threonin	9,18	0,416	4,5	6,68	0,313	4,7	11,73	0,366	3,1	8,92	0,425	4,8
Serin	9,30	0,501	5,4	6,18	0,356	5,8	10,68	0,376	3,5	8,65	0,399	4,6
Kys. glutamová	28,47	1,434	5,0	24,60	1,392	5,7	41,12	1,669	4,1	35,03	1,822	5,2
Prolin	7,67	0,371	4,8	5,59	0,330	5,9	9,79	0,246	2,5	7,31	0,347	4,7
Glycin	8,93	0,451	5,1	6,85	0,358	5,2	12,02	0,288	2,4	8,85	0,429	4,9
Alanin	12,22	0,832	6,8	10,17	0,296	2,9	20,54	0,573	2,8	12,75	0,590	4,6
Valin	10,05	0,533	5,3	7,50	0,400	5,3	13,33	0,337	2,5	10,02	0,494	4,9
Isoleucin	7,81	0,435	5,6	5,83	0,324	5,6	10,41	0,231	2,2	7,88	0,503	6,4
Lucin	12,78	0,625	4,9	9,19	0,525	5,7	16,09	0,377	2,3	12,52	0,373	5,4
Tyroxin	5,79	0,299	5,2	4,43	0,097	2,2	7,00	0,161	2,3	6,15	0,204	3,3
Fenylalanin	8,83	0,570	6,5	7,04	0,170	2,4	11,07	0,192	1,7	9,15	0,454	5,0
Histidin	5,60	0,241	4,3	3,47	0,130	3,7	7,22	0,190	2,6	5,43	0,265	4,9
Lysin	11,99	0,616	5,1	8,11	0,307	3,8	14,61	0,362	2,5	11,35	0,558	4,9
Arginin	12,46	0,781	6,3	10,28	0,180	1,8	18,02	0,387	2,1	12,93	0,586	4,5
<b>Součet</b>	<b>177,03</b>			<b>135,61</b>			<b>235,67</b>			<b>181,55</b>		

kde

mean průměrný obsah v  $\text{g.kg}^{-1}$

S.D. směrodatná odchylka

CV korelační koeficient



Obr. 15: Graf znázorňující obsah aminokyselin ve vzorcích v  $\text{g.kg}^{-1}$

Analýza aminokyselin byla provedena na přístroji AAA (AAA 400, Ingos, Praha). Stanovení se provádělo u volných aminokyselin vždy 3x vedle sebe a u sirných aminokyselin 2x vedle sebe. Pro analýzu byly použity vzorky 1 až 4 z tabulky 3. Z výsledků, uvedených v tabulce 18 a grafu 15 můžeme pozorovat, že největší zastoupení ve všech čtyřech vzorcích měla kyselina glutamová a dále kyselina asparagová. V nezanedbatelném množství se nacházely aminokyseliny arginin, alanin, leucin, lysin a valin. Nejméně se ve vzorcích nacházely sirné aminokyseliny cystein a methionin. Nejvíce aminokyselin, co do obsahu, bylo pozorováno u vzorku 3, kde součet všech nalezených aminokyselin byl  $235,67 \text{ g.kg}^{-1}$ . Nao-

pak nejméně aminokyselin bylo pozorováno u vzorku 2, kde součet všech nalezených aminokyselin byl  $135,61 \text{ g.kg}^{-1}$ . Z výsledků můžeme tvrdit, že větší množství aminokyselin bylo nalezeno ve vzorcích (3 a 4), které byly kupované čerstvé a následně se sušily v laboratoři při  $50^\circ\text{C}$ . Grafické záznamy z analýzy aminokyselin jsou k nahlédnutí v příloze PI a PII.

#### 8.4 Stanovení vybraných skupin látek Hlívy ústříčné metodou papírové chromatografie

Pro stanovení vybraných látek papírovou chromatografií byly použity vzorky z tabulky 4 a 5. Na chromatografickém papíře byly děleny sacharidy a  $\beta$ -glukany.



Obr.16: Ukázka papírové chromatografie

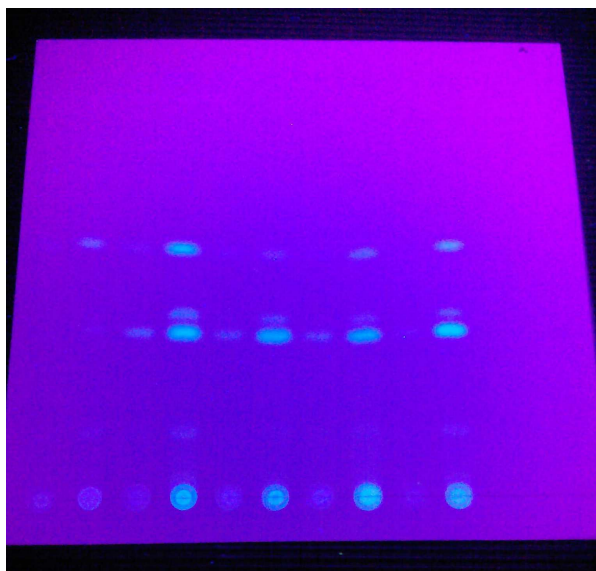
##### 8.4.1 Dělení sacharidů

Z vyvíjecích soustav uvedených v tab. 8 se nepodařilo v žádné rozdělit sacharidy. Skvrny analyzovaných vzorků zůstaly buď na startu nebo v čele rozpouštědla. Chybou mohla být neprovedená hydrolýza před analýzou, to však bylo zapříčiněno malým množstvím vzorků. Nebo ve stanovení špatného poměru rozpouštědel, mísících se s vodou, kde byl zvolen buď příliš velký nebo naopak malý obsah vody. Ve stejných soustavách bylo zkoušeno i rozdělení  $\beta$ -glukanů. Výsledky však nebyly dostačující pro identifikaci. V literatuře se uvádí, že je možné stanovit  $\beta$ -glukany jako 2,3,4,6-tetra-O-methyl-glukosu na papíře ve vyvíjecí sou-

stavě 1-butanol:ethanol:voda:amoniak (4:1:5:stopa). [58] Je zde potřeba detekčního činidla anilín hydrogenftalátu, který je finančně náročný, proto nebyl zakoupen a neprovedla se tato chromatografie.

## 8.5 Stanovení vybraných skupin látek Hlívy ústříčné metodou tenkovrstvé chromatografie

K metodě tenkovrstvé chromatografie byly použity vzorky uvedené v tabulce 4 a 5. Na chromatografických deskách ALUGRAM SIL G/UV254 byly analyzovány sacharidy a terpeny.



Obr. 17: Ukázka detekce pomocí UV lampy při  
254 nm

### 8.5.1 Dělení sacharidů

Pro dělení sacharidů na tenké vrstvě bylo použito soustav uvedených v tab. 9. Až soustavou V. (cyklohexan : ethylacetát v poměru 4 : 1) se sacharidy podařilo rozdělit. U ostatních soustav byly výsledky dělení nedostačující. Zjištěné hodnoty  $R_f$  uvádím v tabulce 19. Nebylo možné však identifikovat žádnou ze složek, poněvadž v literatuře jsou uváděny pouze složení vyvíjecích soustav bez hodnot  $R_f$ . Tyto chromatogramy byly použity pro

denzitometrické vyhodnocení. Ve stejných soustavách bylo zkoušeno i dělení  $\beta$ -glukanů. Rovněž i zde se nepodařilo tuto složku rozdělit.

Tab. 19 Získané  $R_f$  hodnoty při dělení sacharidů v soustavě cyklohexan : ethylacetát (4:1) pro vzorky uvedené v tab. 4 (ethanolové extrakty)

Vzorky	Hodnoty $R_f$							
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
<b>S1</b>	0,14		0,35	0,40		0,56		
<b>S2</b>	0,14		0,35	0,40		0,57		
<b>1a</b>	0,14		0,35	0,40		0,56		
<b>1b</b>	0,14	0,24	0,35	0,40	0,46	0,56	0,96	0,99
<b>2a</b>			0,35			0,56		
<b>2b</b>	0,14		0,35	0,40		0,57	0,96	0,99
<b>3a</b>			0,35	0,39		0,54		
<b>3b</b>	0,14		0,35	0,40	0,46	0,56	0,96	0,99
<b>4a</b>	0,14		0,35	0,39		0,54	0,98	0,99
<b>4b</b>	0,14		0,35	0,39	0,46	0,54	0,96	0,99

Tab. 20 Získané  $R_f$  hodnoty při dělení sacharidů v soustavě cyklohexan : ethylacetát (4:1) pro vzorky uvedené v tab. 5 (methanolové extrakty)

Vzorky	Hodnoty $R_f$							
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
<b>S3</b>	0,12				0,52			
<b>S4</b>	0,12		0,38		0,52			



Vzorky	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
1c	0,12	0,33	0,37	0,40	0,52	0,9		
1d	0,12	0,33	0,38	0,40	0,52	0,9		0,97
2c		0,33	0,37	0,40	0,52			
2d	0,12	0,33	0,38	0,40	0,52		0,94	0,97
3c		0,33	0,37	0,40	0,52			
3d	0,12	0,33	0,37	0,40	0,52	0,9	0,94	0,97
4c		0,33	0,37	0,41	0,52			
4d	0,12	0,33	0,37	0,40	0,52	0,9	0,94	0,97

Ze získaných hodnot  $R_f$  vyplývá, že ve všech vzorcích se vyskytovala frakce V s  $R_f 0,54 \pm 0,2$ . Frakce III u etanolových extraktů s  $R_f 0,35 \pm 0$  by se mohla shodovat s jednou z frakcí II a III (z tab.20), které byly rozdělené ve vzorcích extrahovaných v methanolu. Jak lze pozorovat z tabulek 19 a 20, u většiny vzorků se nacházely i frakce s  $R_f 0,13 \pm 0,1$  a  $0,40 \pm 0,1$ . Nejvíce zastoupenými cukry v hlívě jsou glukosa a trehalosa. Jelikož se trehalosa vyskytuje převážně v mladých plodnicích, lze soudit, že v případě frakce VI z tabulky 19 a frakce V z tabulky 20 by se mohlo jednat právě o glukosu.

### 8.5.2 Dělení terpenů

Dělení terpenů bylo provedeno v soustavách uvedených v tab. 10. Rozdělit se je podařilo nejlépe v soustavách III. (toluen : ethylacetát : methanol : voda (9:1:5:5)) a IV. (toluen : methanol : voda (10:5:5)). Jelikož nebyly u soustav v literatuře uváděny i hodnoty  $R_f$ , opět nebylo možné zjistit o jaké rozdělené látky se jedná. Tyto chromatogramy byly použity pro denzitometrické vyhodnocení.

Tab. 21 Získané  $R_f$  hodnoty při terpenů v soustavě toluen : ethylacetát : methanol : voda (9:1:5:5) pro vzorky uvedené v tab. 4 (ethanolové extrakty)

Vzorky	Hodnoty $R_f$				
	I	II	III	IV	V
S1	0,33	0,47	0,7		
S2	0,33	0,47	0,68		
1a	0,32	0,47	0,68		
1b	0,32	0,47	0,67		0,95
2a	0,34	0,47	0,70		
2b	0,35	0,46	0,71	0,93	0,95
3a	0,33	0,46	0,68		
3b	0,33	0,47	0,68		0,95
4a	0,32	0,46	0,69		
4b	0,33	0,47	0,69		0,95

Tab. 22 Získané  $R_f$  hodnoty při dělení terpenů v soustavě toluen : ethylacetát : methanol : voda (9:1:5:5) pro vzorky uvedené v tab. 5 (methanolové extrakty)

Vzorky	Hodnoty $R_f$							
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
S3		0,30		0,47		0,70		
S4	0,16	0,30	0,40	0,47		0,67	0,90	
1c		0,29		0,46		0,68	0,93	0,98
1d		0,29		0,47	0,58	0,67	0,91	
2c		0,28		0,45		0,66		

Vzorky	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
2d		0,30	0,40	0,45		0,65	0,91	0,96
3d		0,29		0,45		0,65	0,91	0,96
4c		0,29		0,45		0,66		
4d	0,15	0,29		0,45		0,65	0,93	0,96

Při dělení terpenů ve vyvíjecí soustavě toluen : ethylacetát : methanol : voda (9:1:5:5) můžeme pozorovat, že více frakcí se rozdělilo v extraktech v methanolu (viz.tab.22). Tři frakce se rozdělily ve všech vzorcích, a to frakce I ( $R_f$   $0,33 \pm 0,01$ ), frakce II ( $R_f$   $0,47 \pm 0,01$ ) a frakce III ( $R_f$   $0,69 \pm 0,02$ ) u vzorků extrahovaných v ethanolu a frakce II ( $R_f$   $0,29 \pm 0,01$ ), frakce IV ( $R_f$   $0,46 \pm 0,01$ ) a frakce VI ( $R_f$   $0,67 \pm 0,02$ ) u vzorků extrahovaných v methanolu. V literatuře nebyly uváděny u vyvíjecích soustav hodnoty  $R_f$  pro jednotlivé terpeny, proto nebylo možné rozdělené frakce identifikovat. Lze soudit, že mezi těmito třemi frakcemi by se mohl vyskytovat terpen hlívy ústříčné, pleuran.

Tab. 23 Získané  $R_f$  hodnoty při dělení terpenů v soustavě toluen : methanol : voda (10:5:5) pro vzorky uvedené v tab. 4 (ethanolové extrakty)

Vzorky	Hodnoty $R_f$					
	I	II	III	IV	V	VI
S1	0,21			0,63		
S2	0,22	0,29	0,37	0,61	0,88	0,91
1a	0,18		0,35	0,59	0,91	0,91
1b	0,18	0,25	0,35	0,57	0,88	0,90
2a				0,57		0,90
2b	0,15		0,35	0,57	0,88	

Vzorky	I	II	III	IV	V	VI
3a			0,35	0,55		0,90
3b	0,15		0,35	0,56		0,90
4a	0,15		0,35	0,56		0,9
4b	0,15		0,36	0,55	0,91	0,90

Tab. 24 Získané  $R_f$  hodnoty při dělení terpenů v soustavě toluen : methanol : voda (10:5:5) pro vzorky uvedené v tab. 5 (methanolvé extrakty)

Vzorky	Hodnoty $R_f$							
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
S3			0,13		0,33		0,54	
S4	0,08	0,12	0,13	0,27	0,33		0,53	
1c			0,13		0,32		0,53	
1d			0,14		0,34	0,43	0,54	0,88
2c					0,32		0,53	
2d			0,14		0,33		0,53	0,91
3c					0,32		0,53	
3d			0,14		0,32		0,53	0,90
4c					0,32		0,54	
4d			0,14		0,32		0,53	

Při dělení terpenů ve vyvíjecí soustavě toluen : methanol : voda (10:5:5) se ve všech vzorcích rozdělila pouze frakce s hodnotou  $R_f$   $0,55 \pm 0,03$ . Ve všech methanolvých extraktech (tab.24) se rozdělila ještě frakce V s hodnotou  $R_f$   $0,32 \pm 0,01$ .

Z terpenů byly detekovány 2 složky, které nabývaly podobných hodnot  $R_f$  v soustavách IV a V (viz.tab.10).V soustavě IV měly  $R_f$   $0,33 \pm 0,01$  a  $R_f$   $0,47 \pm 0,01$  a v soustavě V měly  $R_f$   $0,32 \pm 0,01$ .a  $R_f$   $0,55 \pm 0,03$ . Pravděpodobně by se mohlo jednat o stejné látky, které mohly v různých soustavách nabývat jiných hodnot  $R_f$ .

### 8.5.3 Denzitometrické vyhodnocení

Detekce byl provedena pomocí denzitometru CAMAG TLC SCANNER II (Švýcarsko). Pro denzitometrické hodnocení byly použity chromatogramy na tenké vrstvě s rozdělenými sacharidy a terpeny. Denzitometr vyhodnotil chromatogramy při vlnové délce 366 nm. Denzitometrické záznamy vzorků jsou uvedeny v příloze P III. U daných chromatogramů nedokázal senzitometr zaznamenat všechny skvrny čistě (v ideálním případě jsou píky souměrné zvonovité), což vysvětluje spoustu malých píků v grafických záznamech (viz. příloha PIII). To mohlo být zapříčiněno přítomností nečistot nebo jiných látek v dělené směsi, které mohly bránit dokonalému rozdělení složek (např. bílkoviny). U většiny grafů nedokázal denzitometr vyhodnotit celou plochu píků, což stěžovalo určení přesného množství složky ve směsi. Můžeme proto jen hrubě odhadnout, v jakém množství se daná složka ve směsi vyskytovala. Grafické záznamy také nebylo možné považovat za úplné, jelikož vyhodnocení proběhlo pouze při vlnové délce 366 nm. Pod laboratorní UV lampou byly totiž viditelné i další skvrny při vlnové délce 254 nm. Z vizuálního hodnocení chromatogramů UV lampou bylo patrné, že extrakty, které byly pořízené extrakční metodou dle Soxhleta, obsahovaly látky ve vyšších koncentracích než extrakty pořízené extrakcí při laboratorní teplotě.

Denzitometrické vyhodnocení se nejlépe osvědčilo u rozdělených terpenů v soustavě toluen:ethylacetát:methanol:voda (9:1.5:5), a to pouze u vzorků 1b a 1d ( viz. příloha PIII). U ostatních vzorků se tato detekce příliš neosvědčila. S největší pravděpodobností to mohlo být způsobeno tím, že se jednotlivé složky dostatečně neoddělily a mezi nimi byly ještě rozmyté látky, které mohly bránit vytvoření čitelného grafického záznamu. Pro ilustraci je vyhodnocení chromatogramů vzorků 1b a 1d uvedeno v tabulce 25 a 26.

Tab. 25 Procentuální množství rozdělených frakcí vzorku 1b po dělení terpenů v soustavě toluen:ethylacetát:methanol:voda (9:1.5:5)

<b>Složka s <math>R_f</math></b>	0,47	0,67	0,82	0,95
<b>Obsah složky [%]</b>	36,6	22,7	10,3	8,7

Tab. 26 Procentuální množství rozdělených frakcí vzorku 1d po dělení terpenů v soustavě toluen:ethylacetát:methanol:voda (9:1.5:5)

<b>Složka s <math>R_f</math></b>	0,47	0,67	0,91
<b>Obsah složky [%]</b>	33,6	29,9	22,9

## ZÁVĚR

Tato diplomová práce byla zaměřena na analýzu vybraných obsahových látek houby hlívy ústříčné (*Pleurotus ostreatus*) použitím chromatografických metod a metod vhodných k provozní kontrole při průmyslovém zpracování.

Diplomová práce byla rozdělena na část teoretickou a část praktickou. Teoretická část byla zaměřena na botanickou a chemickou charakteristiku houby. Důraz byl kladen především na důležité obsahové látky, které houba obsahuje. Značná část byla věnována působení hlívy ústříčné a jejich biologicky aktivních látek na organismus.

Praktická část zahrnuje přehled vzorků a metod, které byly použity k analýze vytipovaných látek hlívy ústříčné (*Pleurotus ostreatus*). Dále obsahuje výsledky a diskuzi.

K analýze byly vybrány čtyři vzorky. Vzorky 1 a 2 byly zakoupeny již sušené a pro účely experimentu byly dosušeny při 50°C. Vzorky 3 a 4 byly zakoupeny v čerstvém stavu a usušeny při 50°C do konstantního úbytku. U těchto vzorků (3,4) byla stanovena sušina.

U všech uvedených vzorků byl stanoven obsah neutrálně detergentní vlákniny (NDF) a obsah aminokyselin. Poté byly z těchto vzorků připraveny ethanolové a methanolové extrakty, které byly použity pro chromatografii papírovou a na tenké vrstvě silikagelu.

Nejvyšší průměrný obsah NDF byl nalezen u vzorku 4, a to 39,2 %  $\pm$  1,2 (3,5 % v sušině vzorku 4).

Obsah aminokyselin byl zjištěn medovou kapalinovou iontovýměnnou chromatografií. Nejvíce aminokyselin bylo pozorováno u vzorku 3, kde součet všech nalezených aminokyselin byl 235,67 g.kg<sup>-1</sup>. Ve všech vzorcích byly nejvíce zastoupeny kyselina glutamová a kyselina asparagová, které nejspíše v plodnicích působí jako intenzifikátory houbového aroma. Z plošných chromatografických metod se nejlépe osvědčila chromatografie na tenké vrstvě silikagelu, pomocí níž se podařilo dělit sacharidy a terpeny. Při chromatografii na papíře se látky nepodařilo úspěšně rozdělit. Jako standard byly použity tablety Beta glucanu od firmy Natures s.r.o., které však zcela nevyhovovaly. Doporučovala bych tedy pracovat s vhodnějšími standardy látek specifických pro hlívu ústříčnou (*Pleurotus ostreatus*). Rozdělené látky nebylo možné identifikovat z důvodu nedostupnosti tabelovaných hodnot R<sub>f</sub> pro soustavy, se kterými bylo pracováno.

Použité metody byly nenáročné na nákladná provozní a technické vybavení. Pro detailnější studium navrhuji použít vhodnější standardy a použít instrumentálních technik kapalinové chromatografie (HPLC), plynové chromatografie s hmotnostní spektrometrií (GC/MS) nebo nukleární magnetické resonance (NMR).



**SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY**

- [1] LEPŠOVÁ, Anna. *Zázračná houba? Hlíva ústříčná*. Vydavatelství Víkend, 2001, 64 s., ISBN 80-7222-181-7
- [2] LEPŠOVÁ, Anna. *Houby jako elixir života*. Vydavatelství Víkend, 2005, 88 s., ISBN 80-7222-369-0
- [3] OPLETAL, Lubomír. *Fytoterapeutické aspekty onemocnění oběhového systému, 2. Hlíva ústříčná a možnosti jejího využití*. Československá farmacie, vydává Česká lékařská společnost J.E.Purkyně, srpen 1993, ročník 42, č. 4, str. 160-165
- [4] JABLONSKÝ, Ivan. ŠAŠEK, Václav. *Jedlé a léčivé houby, pěstování a využití*. Praha, 2006, Nakladatelství Brázda, s.r.o., 264 s., ISBN 80-209-0341-0
- [5] BIELLI, Estore. *Velký průvodce přírodou. Houby. Obsáhlý rádce pro určování a sběr hub*. Praha, 2001, Knižní klub IKAR, 224 s., ISBN 80-242-0548-3
- [6] LAUX, E.Hans. *Jedlé houby a jejich jedovatí dvojníci*. Vydavatelství Víkend, 2006, 191 s., ISBN 80-86891-38-0
- [7] JANOTOVÁ, Yvona. *Hlíva ústříčná a pařezník pozdní*. Houbař 2009, roč. 3, č. 1, s. 10
- [8] ANONYM. *Pěstování hub doma*. Dostupný z: <<http://www.beskydagro.cz/zampionarna/pestovani-doma/>>
- [9] ANONYM. *Hlíva ústříčná*. Dostupný z: [http://www.naturfoto.cz/hliva-ustricna-fotografie\\_popis-3377.html](http://www.naturfoto.cz/hliva-ustricna-fotografie_popis-3377.html)
- [10] KLÁN, Jaroslav. *Co víme o houbách*. Státní pedagogické nakladatelství Praha, 1989, 311 s., ISBN 80-04-21143-7
- [11] VÁŇA, Pavel. *Léčivé houby podle bylináře Pavla*. Nakladatelství Eminent, Praha 2004, 185 s., ISBN 80-7281-113-4
- [12] SEMERDŽIEVA, Marta., VESELOVSKÝ, Jaroslav. *Léčivé houby dříve a nyní*. Nakladatelství Československé akademie věd, Praha 1986, s. 180
- [13] ANONYM. *Korelace*. Dostupný z : <<http://aix-lin.upol.cz/~milde/Korelace-stud.pdf> >

- [14] NOVÁK, Miroslav. *β-glukany, historie a současnost*. . Chemické listy 101, 2007, str. 872-880, [online]. Dostupný z:  
<[http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2007\\_11\\_872-880.pdf](http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2007_11_872-880.pdf)>
- [15] ZEKOVIC, 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
- [16] ANONYM. *Apiglukan*. Dostupný z:  
<<http://www.apiglukan.cz/beta-glukan%20studie.doc>>
- [17] CHOVANCOVÁ, A., ŠTURDÍK, E. *Vplyv beta-glukánov na imunitný systém človeka*. In Nova Biotechnologica V-1. 2005, s. 105-121.
- [18] ISHIBASHI, K., et al.. *Relationship between solubility of grifolan, a fungal 1,3-beta-D-glucan, and production of tumor necrosis factor by macrophages in vitro*. Bio-science Biotechnology and Biochemistry 2001, 65 (9): 1993 – 2000
- [19] VELÍŠEK, Jan. *Chemie potravin I.*. OSSIS, Tábor 1999, ISBN 80-902391-3-7, str. 352
- [20] MANZI, P., PIZZOFERRATO, L.. *Beta-glucans in edible mushrooms*. Food Chemistry 2000, 68 (3): 315 - 318
- [21] BOHN, J.A., BEMILLER, J.N.. *1,3-beta-D-glucans as biological response modifiers: A review of structure – functional activity relationships*. Carbohydrate Polymers 1995, 28 (1): 3 – 14
- [22] WANG, J.C., et al.. *Optimization for the production of water-soluble polysaccharide from Pleurotus citrinopilatus in submerged culture and its antitumor effect*. Applied Microbiology and Biotechnology 2003, 67 (6): 759 – 766
- [23] FOREJTOVÁ, Petra. *Léčivé účinky glukanů*. Časopis pro zdraví a alternativní léčení, Regena 3/2005, ročník 15., str. 18-19
- [24] ANONYM. *Nefdesanté Beta Glukan tbl.90*. Dostupný z:

- <<http://www.lekarna.cz/p/potravni-doplanky/nefdesante-beta-glukan-tbl-90/>>
- [25] HOŘEJŠÍ, V., Bartůňková, J.: *Základy imunologie*, 2.vydání, s. 158. Triton 2002
- [26] DUČKOVÁ, K., BUKOVSKÝ, M., KUČERA, J.. *Study of topical dispersions with an immunomodulatory activity*. STP Pharma Science 1997, 7 (3): 223- 228
- [27] BYSTRONĚ, Jaromír, CSc. Doc. MUDr. *Imunomodulace u recidivujících infekcí dýchacích cest*. Klin farmakol farm, 2005, str. 235-238, [online]. Dostupný z: <<http://www.klinickafarmakologie.cz/pdfs/far/2005/04/09.pdf>>
- [28] Objektive source E-learning. *Statiny*. Dostupný z: <http://www.osel.cz/index.php?obsah=19&id=6>
- [29] ANONYM. *Isoprenoidy*. Dostupný z: <[http://www.vscht.cz/eds/knihy/uid\\_es-002/hesla/isoprenoidy.html](http://www.vscht.cz/eds/knihy/uid_es-002/hesla/isoprenoidy.html)>
- [30] HOZA, Ignác, KRAMÁŘOVÁ, Daniela. *Potravinářská biochemie I*. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, červenec 2005, 169 str., ISBN 80-7318-295-5
- [31] ANONYM. *Je hlíva ústříčná opravdu malý zázrak?* Sondy 2006, č. 30, str. 6, ISSN 0322-8800
- [32] KOVÁŘ, Ladislav. *Breviř o houbách..* Nakladatelství Olympia, a.s., Praha 1999,ISBN 80-7033-593-9, str. 160
- [33] KUCHAROVÁ, Kateřina. *Zázrak jménem hlíva*. Regenerace, 2003, ročník 11, str. 26
- [34] ANONYM. *Ateroskleróza*. Dostupný z: <<http://www.ordinace.cz/clanek/ateroskleroza-prehled/>>
- [35] ANONYM. *Cukrovka, příznaky, onemocnění a léčba*. Dostupný z: <<http://cukrovka.webpark.cz/?X>>
- [36] KROUTIL, Jan. *Jak předejít výměně kloubu?* Regena, 2005, č.6, str. 9
- [37] ŠÁCHA, Pavel, MUDr.. *Osteoporóza*. Dostupný z: <<http://www.celostnimediceina.cz/osteoporoz.htm>>

- [38] ANONYM. *Je hlíva ústříčná opravdu malý zázrak?* týdeník Sondy, 2006, č. 30, str. 6, ISSN 0322-8800
- [39] ZEMAN, M., et al.. *Changes of endogenous melatonin and protective effect of diet containing pleuran and extract of black elder in colonic inflammation in rats.* Biologia 2001, 56 (6): str. 659 – 701
- [40] REVERBERI, M., et al.. *Antioxidant enzymes stimulation in Aspergillus parasiticus by Lentinula edodes inhibits aflatoxin production.* Applied Microbiology and Biotechnology 2005, 69 (2): str. 207 – 215
- [41] BOBEK, P., NOSÁLOVÁ, V., ČERNÁ, S.. *Effect of pleuran (beta-glucan from Pleurotus ostreatus) in diet or drinking fluid on colitis in rats.* Nahrung-Food 2001, 45 (5): str. 360 – 363
- [42] BOBEK, P., GALBAVÝ, S.. *Effect of pleuran (beta-glucan from Pleurotus ostreatus) on the antioxidant status of the organism and on dimethylhydrazineinduced precancerous lesions in rat colon.* British Journal of Biomedical Science 2001, 58 (3): str. 164 - 168
- [43] PRÍBELA, A.. *Analýza prírodných látok v požívatinách.* 1. vyd. ALFA, vydavateľství technické a ekonomické literatury, n.p. Bratislava 1978
- [44] BERAN, P.; a kolektiv. *Analytická příručka.* 2. vyd. Praha: Nakladatelství technické literatury, 1972. str. 53 - 99, ISBN 04 – 672 – 72.
- [45] ANONYM. *Separáční metody.* Dostupný z:  
< <http://www.natur.cuni.cz/~pcoufal/extrakce.pdf> >
- [46] ANONYM. *Potravinová vláknina.* Dostupný z :  
< <http://www.vupp.cz/czvupp/publik/06poster/06mbVlakninaPresentace.pdf>>
- [47] ANONYM; *Stanovení aminokyselin v krmivech.* Dostupný z:  
<<http://www.sweb.cz/HPLC1/Amk/amk.htm>>.]
- [48] IGNOS, s.r.o.: *Analyzátor aminokyselin AAA 400, Návod k obsluze.* Chemická část,

- Praha, 2002.
- [49] MIKEŠ, O.; a kolektiv. *Příručka chromatografických metod*. Praha: SNTL, 1961; ISBN 301 – 05 – 113.
- [50] ANONYM. *Thin layer chromatography, Paper chromatography*. Dostupný z: < [http://www.vscht.cz/ktk/www\\_324/lab/texty/ana/TLC2.pdf](http://www.vscht.cz/ktk/www_324/lab/texty/ana/TLC2.pdf)>
- [51] GASPARIČ, J.; a kolektiv. *Papírová a tenkovrstvá chromatografie organických sloučenin*. 1. vyd. Praha: Nakladatelství technické literatury, 1981. ISBN 04 – 613 – 81.
- [52] MIKEŠ, O.; a kolektiv. *Laboratorní chromatografické metody*. Praha: SNTL, 1980; ISBN 04 – 614 – 80.
- [53] ANONYM. *Slovník cizích slov on-line*. Dostupný z : < <http://slovník-cizich-slov.abz.cz/web.php/slovo/denzitometrie-densitometrie> >
- [54] Calda, E., CSc. RNDr. Doc., DUPAČ, V., DrSc. RNDr. prof. *Matematika pro gymnázia- Kombinatorika, pravděpodobnost, statistika*. Nakladatelství Prometheus, spol. s.r.o., 2003, Praha. ISBN 80-7196-147-7
- [55] ANONYM. *Korelace*. Dostupný z : <<http://aix-lin.upol.cz/~milde/Korelace-stud.pdf>>
- [56] JANČÁŘOVÁ, I.; a kolektiv. *Návody pro laboratorní cvičení z anorganické a analytické chemie*. 1. vyd. Mendlova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Brno 2000. ISBN 80-7157-208-X.
- [57] ANONYM; *Stanovení obsahu neutrálně detergentní vlákniny*. Dostupný z: < [http://database.zeus.cz/bokrs/vestniky/nrl\\_1\\_1\\_05\\_doplnek\\_06.pdf](http://database.zeus.cz/bokrs/vestniky/nrl_1_1_05_doplnek_06.pdf)>.
- [58] KARÁCSONYI, Š., KUNIAK, L. *Polysaccharides of pleurotus ostreatus: Isolation and structure of pleuran, an alkali-insoluble  $\beta$ -D-glucan*. Elsevier Science, Carbohydrate polymers 24, 1994, s. 107-111.

**SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK**

HDL	Hight-density lipoprotein
LDL	Low-density lipoprotein
PC	Papírová chromatografie
TLC	Tenkovrstvá chromatografie
NDF	Neutrálně detregentní vláknina
NDC	Neutrálně detergentní činidlo
AAA	Automatický analyzátor aminokyselin
R <sub>f</sub>	Retardační faktor
UV	Ultrafialové záření
HA	Pleuran
DB	Stupeň větvení
HPLC	Kapalinová chromatografie
GC	Plynová chromatografie
MS	Hmotnostní spektrometrie
S	Obsah sušiny
V	Obsah vody
x	Aritmetický průměr
s <sub>x</sub>	Směrodatná odchylka

**SEZNAM OBRÁZKŮ**

Obr. 1: Pleurotus ostreatus:.....	12
Obr. 2: Lupeny Pleurotus ostreatus.....	12
Obr. 3: Pěstování hlívy ústříčné na slámě.....	14
Obr. 4: Špalky prorůstající hlívou ústříčnou.....	16
Obr. 5: Pěstování ze substrátu.....	17
Obr. 6: Základní molekulární vzorec houbového beta-glukanu.....	21
Obr. 7: Lovastatin.....	26
Obr. 8: Soxhletův extraktor.....	36
Obr. 9: Analyzátor aminokyselin AAA 400 (Ingos, Praha) .....	38
Obr. 10: Vzorek 1.....	44
Obr. 11: Vzorek 2.....	44
Obr. 12: Vzorek 3.....	45
Obr. 13: Vzorek 4.....	45
Obr. 14: Standard.....	46
Obr. 15: Graf znázorňující obsah aminokyselin ve vzorcích v g.kg <sup>-1</sup> .....	61
Obr. 16: Ukázka papírové chromatografie.....	62
Obr. 17: Ukázka detekce pomocí UV lampy při 254 nm.....	63

**SEZNAM TABULEK**

Tab. 1 Taxonomie <i>Pleurotus ostreatus</i> .....	11
Tab. 2 Obsah $\beta$ -glukanů a poměr jejich vodorozpustné a ve vodě nerozpustné frakce.....	22
Tab. 3 Vzorky použité pro stanovení sušiny, NDF a aminokyselin.....	46
Tab. 4 Vzorky použité pro papírovou a tenkovrstvou chromatografii (extrakty v ethanolu) .....	47
Tab. 5 Vzorky použité pro papírovou a tenkovrstvou chromatografii (extrakty v methanolu) .....	47
Tab. 6 Navážky vzorků pro stanovení volných aminokyselin.....	53
Tab. 7 Navážky vzorků pro stanovení sirných aminokyselin.....	54
Tab. 8 Soustavy pro dělení sacharidů a $\beta$ -glukanů na papíře.....	54
Tab. 9 Soustavy pro dělení sacharidů na tenké vrstvě.....	55
Tab. 10 Soustavy pro dělení terpenů na tenké vrstvě.....	56
Tab. 11 Výsledky stanovení sušiny a vody u vzorku 2.....	57
Tab. 12 Výsledky stanovení sušiny a vody u vzorku 3.....	57
Tab. 13 Hodnoty prázdného filtračního sáčku.....	58
Tab. 14 Výsledky stanovení NDF u vzorku č.1.....	58
Tab. 15 Výsledky stanovení NDF u vzorku č.2.....	58
Tab. 16 Výsledky stanovení NDF u vzorku č.3.....	59
Tab. 17 Výsledky stanovení NDF u vzorku č.4.....	59
Tab. 18 Výsledky stanovení aminokyselin pomocí analyzátoru AAA 400.....	60
Tab. 19 Získané $R_f$ hodnoty při dělení sacharidů v soustavě cyklohexan : ethylacetát (4:1) pro vzorky uvedené v tab. 4 (ethanolové extrakty).....	63
Tab. 20 Získané $R_f$ hodnoty při dělení sacharidů v soustavě cyklohexan : ethylacetát (4:1) pro vzorky uvedené v tab. 5 (methanolové extrakty).....	64
Tab. 21 Získané $R_f$ hodnoty při terpenů v soustavě toluen : ethylacetát : methanol : voda	



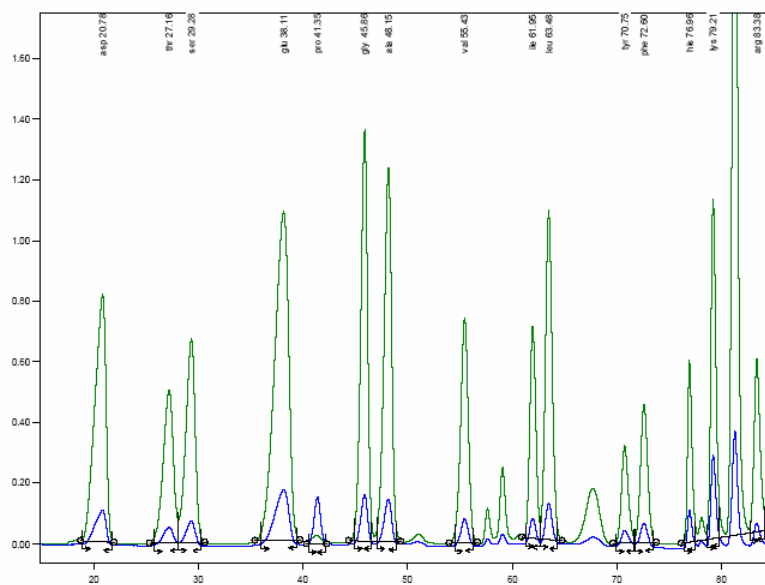
(9:1:5:5) pro vzorky uvedené v tab. 4 (ethanolové extrakty).....	65
Tab. 22 Získané $R_f$ hodnoty při dělení terpenů v soustavě toluen : ethylacetát : methanol : voda (9:1:5:5) pro vzorky uvedené v tab. 5 (methanolové extrakty).....	66
Tab. 23 Získané $R_f$ hodnoty při dělení terpenů v soustavě toluen : methanol : voda (10:5:5) pro vzorky uvedené v tab. 4 (ethanolové extrakty).....	67
Tab. 24 Získané $R_f$ hodnoty při dělení terpenů v soustavě toluen : methanol : voda (10:5:5) pro vzorky uvedené v tab. 5 (methanolové extrakty).....	67
Tab. 25 Procentuální množství rozdělených frakcí vzorku 1b po dělení terpenů v soustavě toluen:ethylacetát:methanol:voda (9:1.5:5).....	69
Tab. 26 Procentuální množství rozdělených frakcí vzorku 1d po dělení terpenů v soustavě toluen:ethylacetát:methanol:voda (9:1.5:5).....	69

**SEZNAM PŘÍLOH**

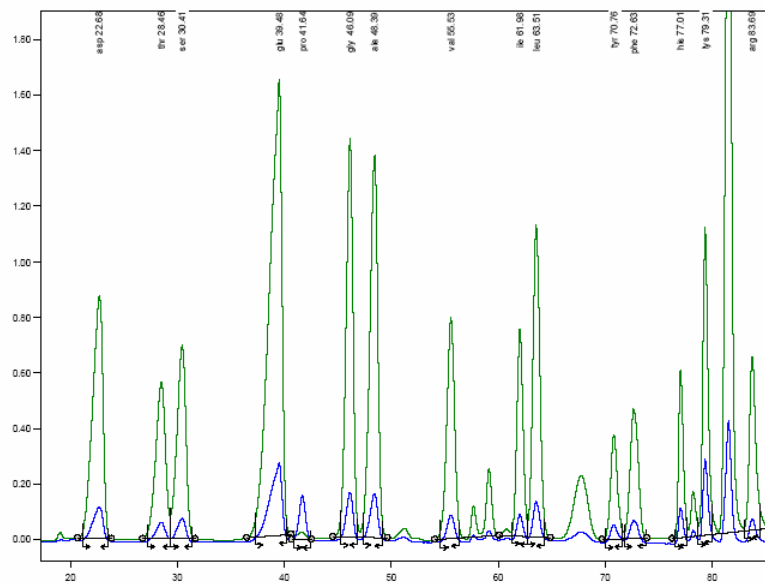
- P I            Analýza volných aminokyselin
- P II            Analýza sirných aminokyselin
- P III            Vyhodnocené denzitometrické záznamy rozdělených terpenů v soustavě toluen  
:ethylacetát:methanol:voda
- P IV            Denzitometrický záznam rozdělených sacharidů
- PV            Denzitometrický záznam rozdělených terpenů v soustavě toluen:methanol:voda
- PVI            Denzitometrický záznam rozdělených terpenů v soustavě toluen:ethylacetát:  
methanol:voda

# PŘÍLOHA PI: ANALÝZA VOLNÝCH AMINOKYSELIN

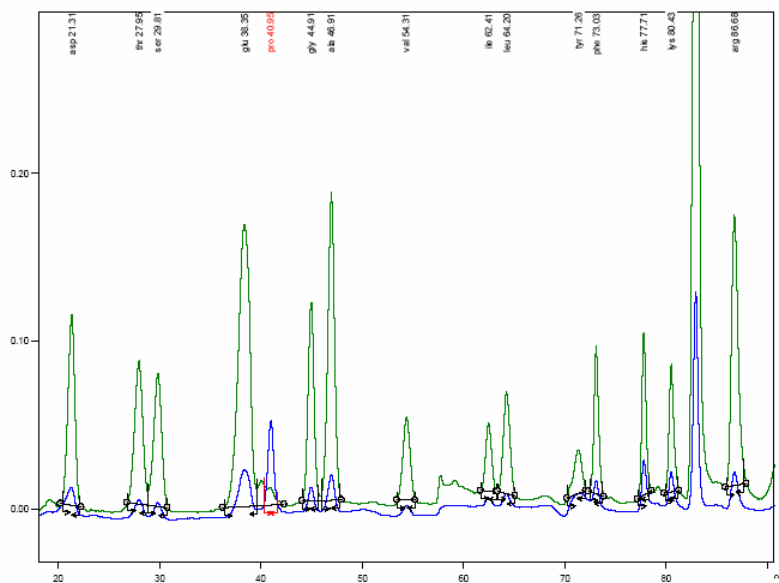
## vzorek 1



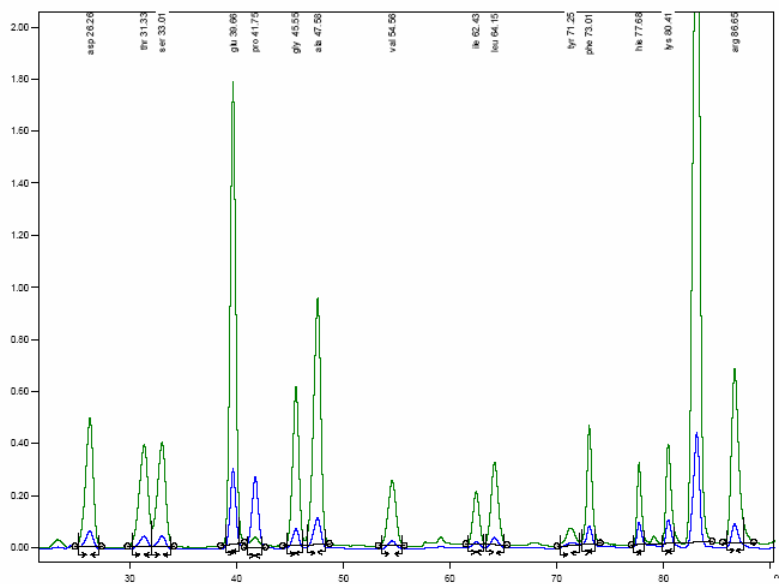
## vzorek 2



### vzorek 3

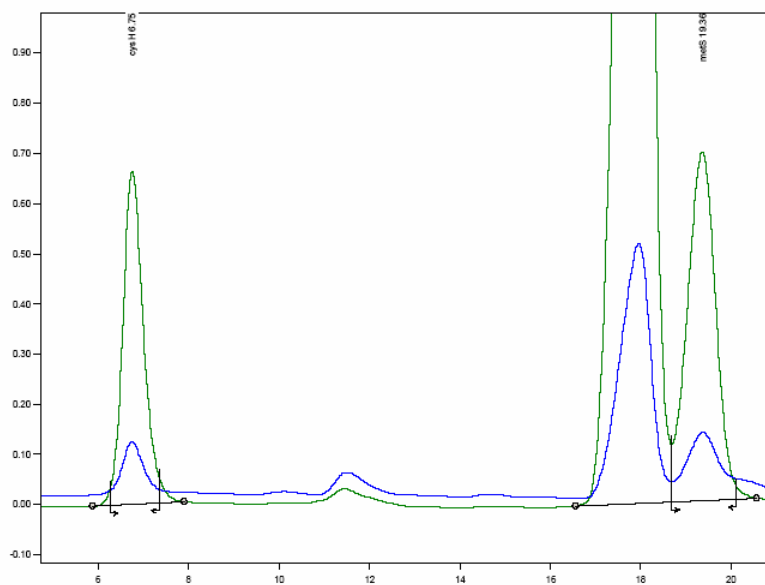


### vzorek 4

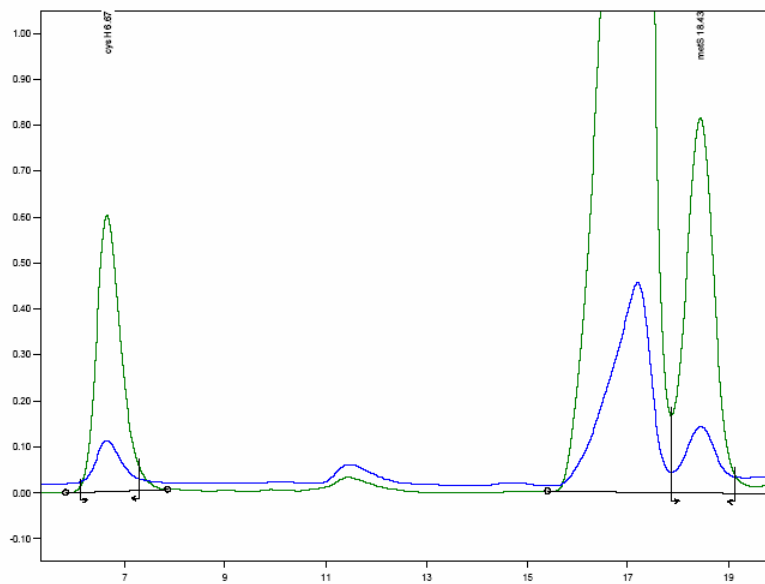


# PŘÍLOHA P II: ANALÝZA SIRNÝCH AMINOKYSELIN

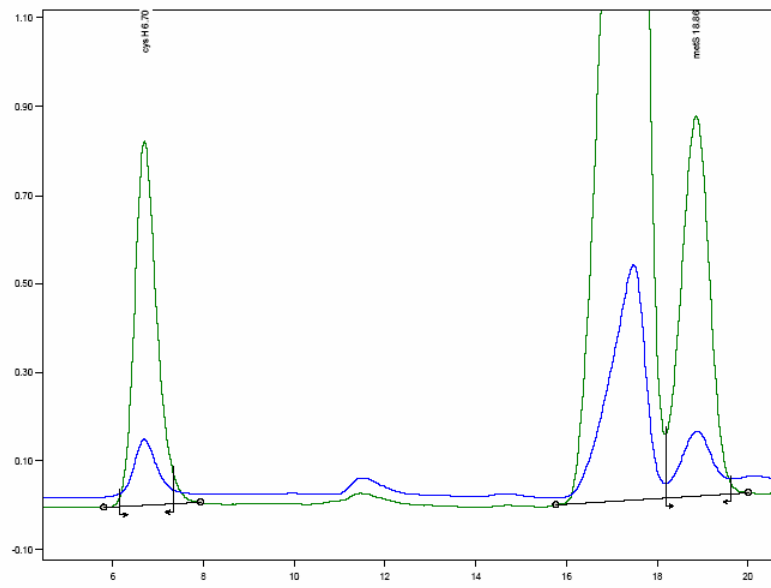
## vzorek 1



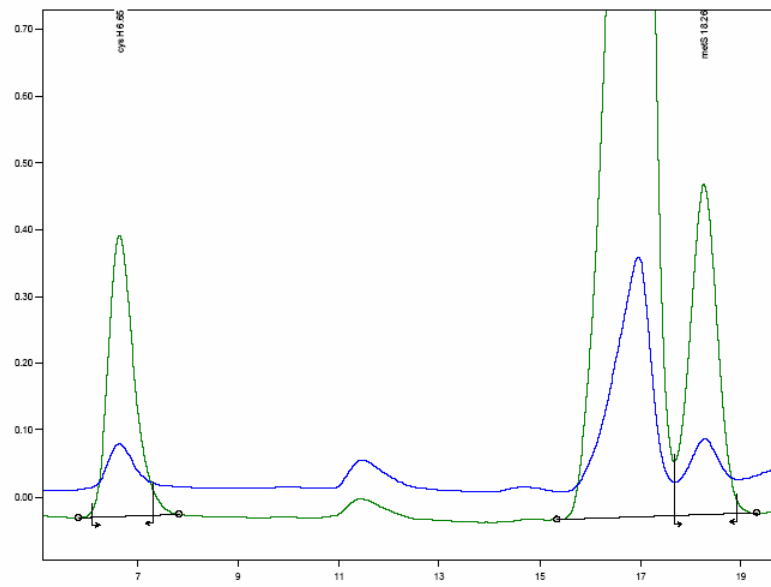
## vzorek 2



### vzorek 3

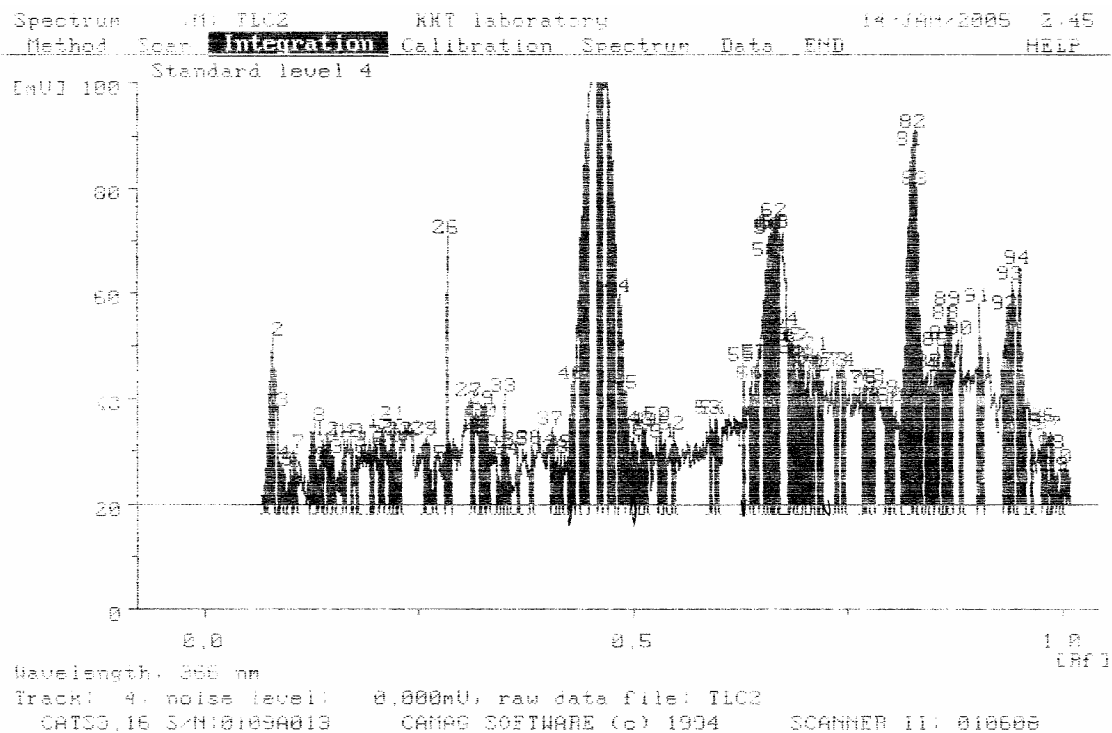


### vzorek 4

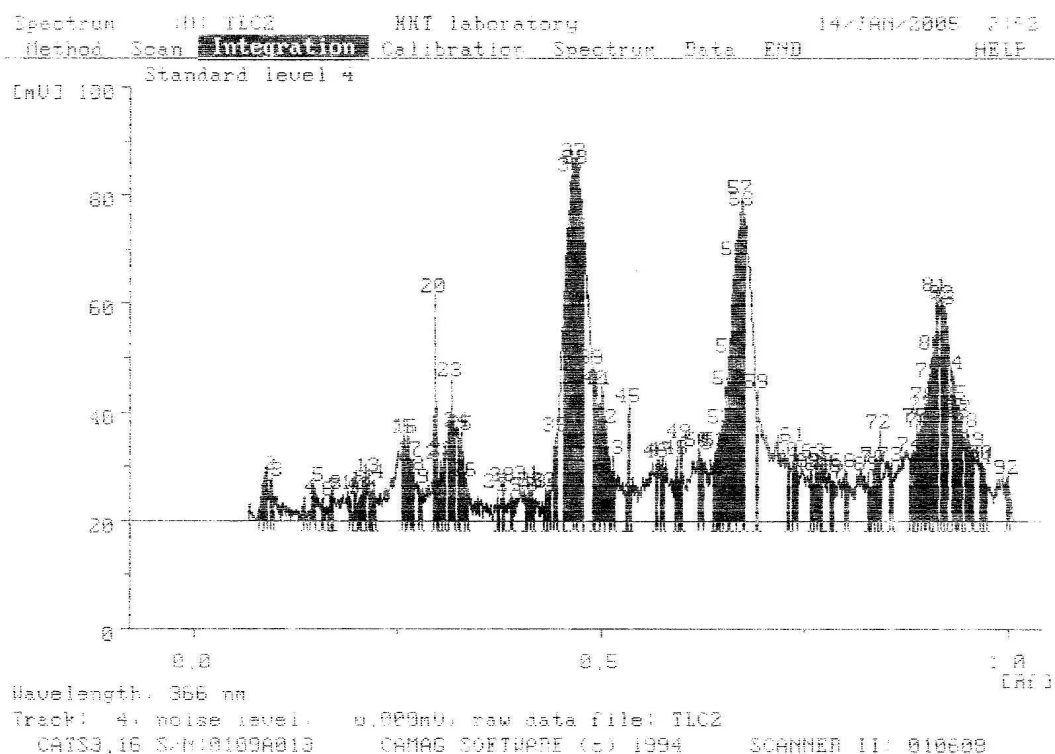


# P III VYHODNOCENÉ DENZITOMETRICKÉ ZÁZNAMY ROZDĚLENÝCH TERPENŮ V SOUSTAVĚ TOLUEN:ETHYLACETÁT:ME-THANOL:VODA

Vzorek 1 b

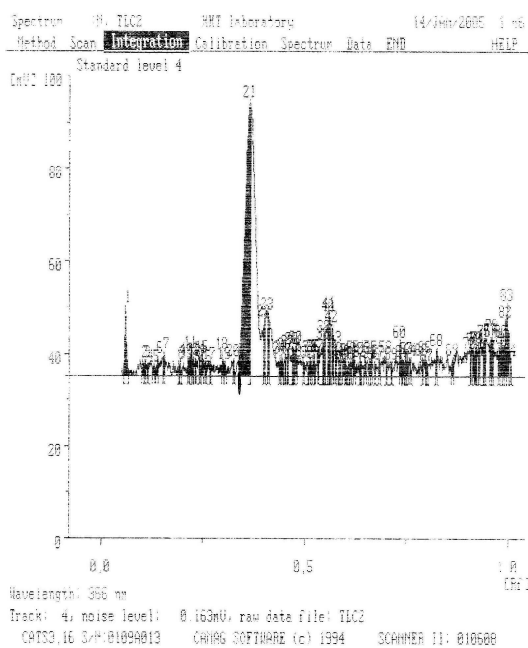


Vzorek 1d

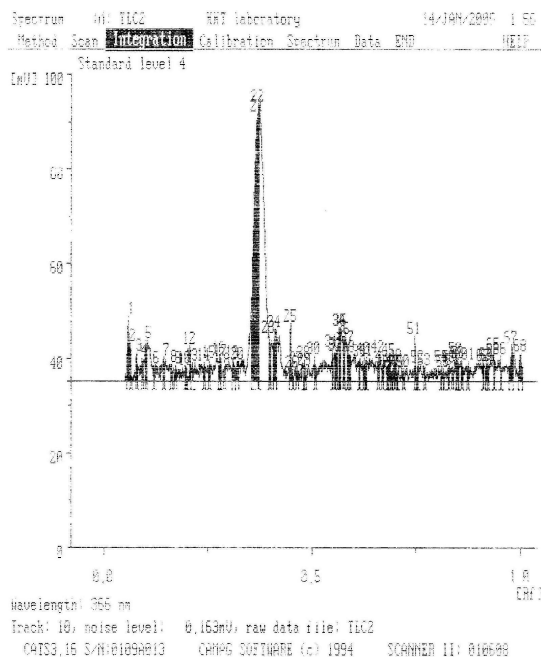


# PŘÍLOHA P IV: DENZITOMETRICKÝ ZÁZNAM ROZDĚLENÝCH SACHARIDŮ

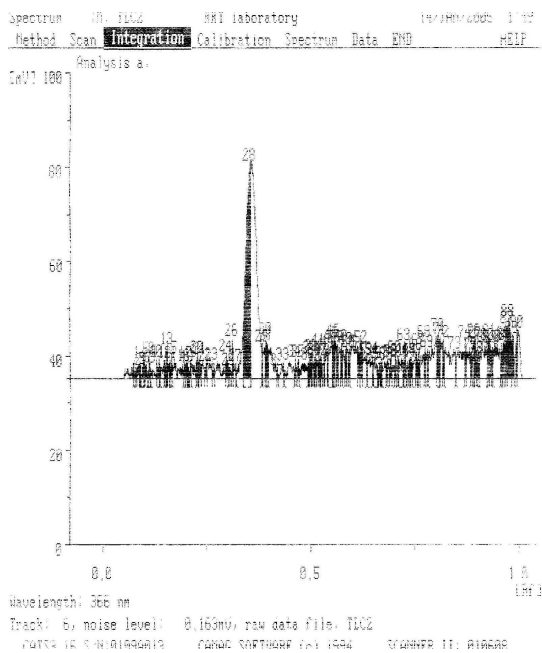
Vzorek 1b



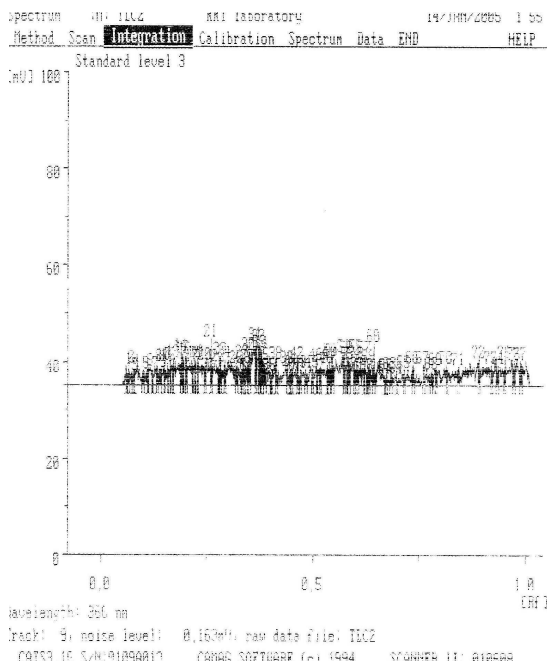
Vzorek 2b



Vzorek 4b



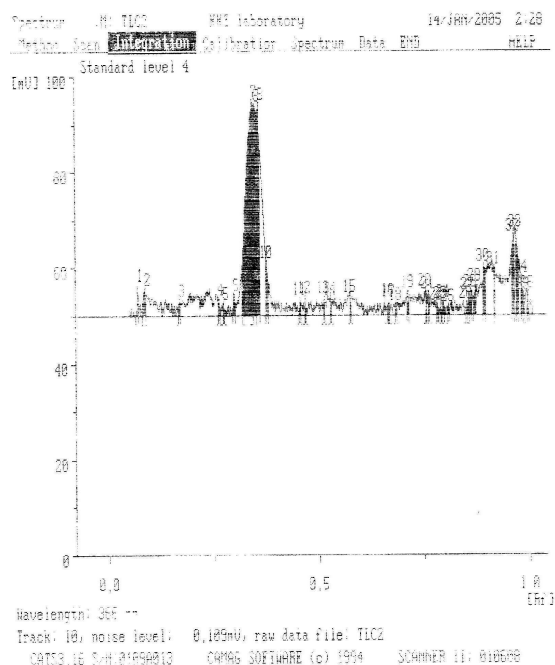
Vzorek 2a (nečitelný záznam)



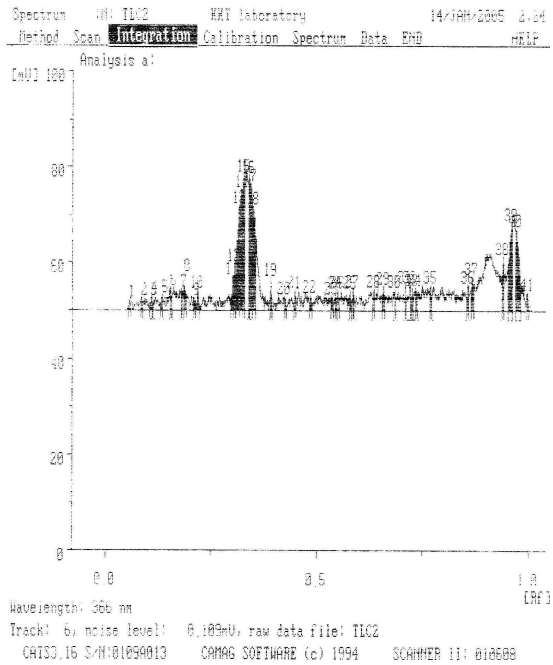


# PŘÍLOHA P V: DENZITOMETRICKÝ ZÁZNAM ROZDĚLENÝCH TERPENŮ V SOUSTAVĚ TOLUEN:METHANOL:VODA

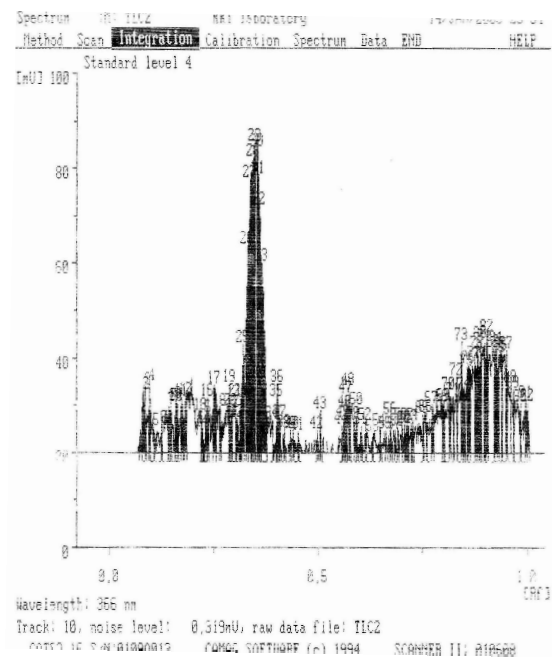
Vzorek 2b



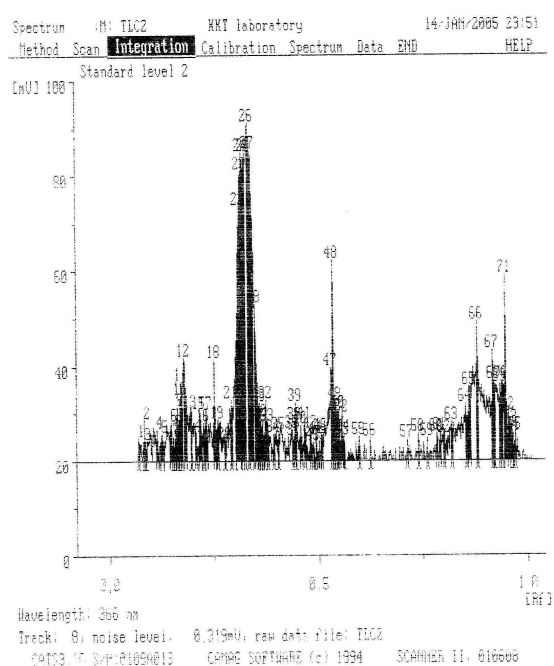
Vzorek 4b



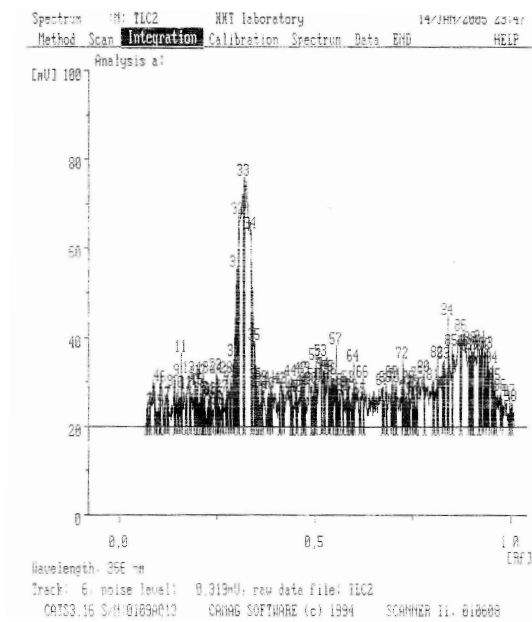
Vzorek 2d



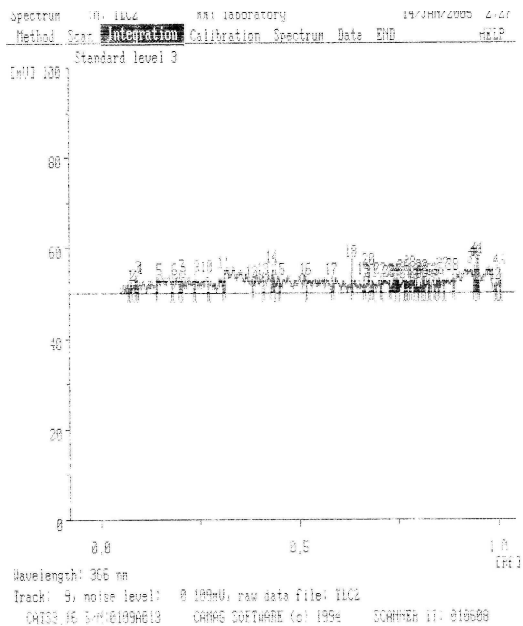
Vzorek 3d



## Vzorek 4d

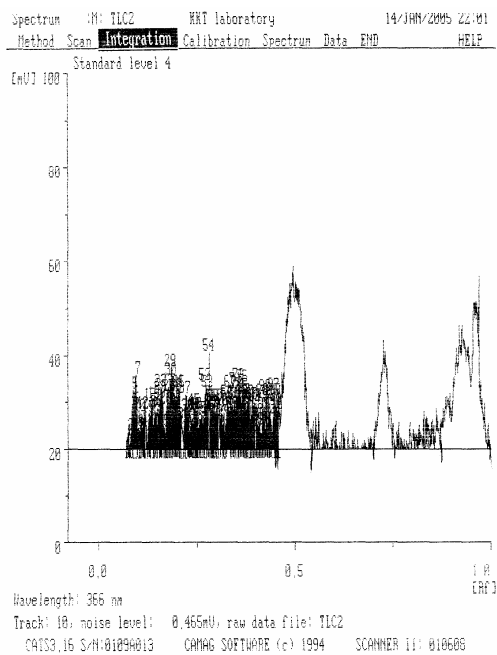


## Vzorek 2a (nečitelný záznam)

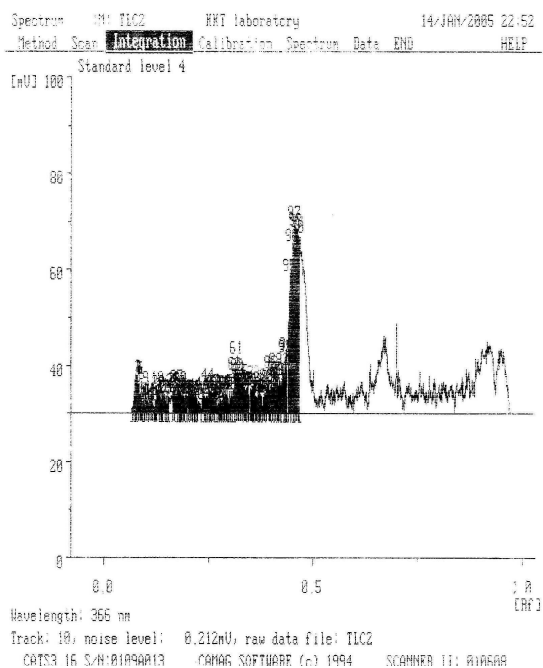


# PŘÍLOHA P VI: DENZITOMETRICKÝ ZÁZNAM ROZDĚLENÝCH TERPENŮ V SOUSTAVĚ TOLUEN:ETHYLACETÁT: METHANOL: VODA

## Vzorek 2b



## Vzorek 2d



## Vzorek 3d

