



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

PŘÍPRAVA POTRAVINOVÝCH DOPLŇKŮ NA BÁZI VZÁCNÝCH DRUHŮ HUB

PROCESSING OF FOOD SUPPLEMENTS BASED ON MEDICAL TYPES OF MUSHROOMS

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Vendula Vetchá

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Julie Hoová, Ph.D.

BRNO 2023

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1801/2022

Akademický rok: 2022/23

Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií

Studentka: **Bc. Vendula Vetchá**

Studijní program: Chemie přírodních látek

Studijní obor: bez specializace

Vedoucí práce: **Ing. Julie Hoová, Ph.D.**

Název diplomové práce:

Příprava potravinových doplňků na bázi vzácných druhů hub

Zadání diplomové práce:

V rámci práce budou řešeny následující dílčí cíle:

- 1) literární rešerše zaměřená na vzácné druhy hub využívaných v potravinářství a farmacii (reishi, hlíva apod.) – složení, účinky
- 2) optimalizace metod stanovení nutričně významných aktivních látek v houbách
- 3) stanovení biologických účinků extraktů z hub a interakce s živými buňkami
- 4) možnosti aplikace extraktu z hub do potravinových doplňků

Termín odevzdání diplomové práce: 8.5.2023:

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

Bc. Vendula Vetchá
studentka

Ing. Julie Hoová, Ph.D.
vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2023

prof. Ing. Michal Veselý, CSc.
děkan

ABSTRAKT

Tato diplomová práce se zabývá charakterizací nutričně významných látek ve vybraných vzorcích vzácných druhů hub, konkrétně lesklokorky lesklé a korálovce ježatého. Dále se věnuje biologickému vlivu vybraných vzácných hub na lidské buněčné linie HaCaT a Caco-2, sleduje produkci prozánětlivých cytokinů IL-6 a IL-8 imortalizovanými keratinocyty a buňkami karcinomu tlustého střeva po expozici vodných extraktů připravených z práškové formy hub.

Teoretická část diplomové práce se věnuje charakteristice hub z hlediska morfologických znaků a jejich taxonomickému zařazení do živé říše. Dále studuje účinky jedlých a léčivých druhů hub a detailně popisuje medicínální houby, jako lesklokorku lesklou, houževnatce jedlého, trsnatce lupenitého, penízovku sametonohou, korálovce ježatého a hlívu ústřičnou, informuje o jejich účincích, využití a možnostech aplikace v potravinářství a farmacii. Zmiňuje možné negativní účinky hub na zdraví konzumentů. Uvádí metody zpracování hub a jejich využití v potravinářském průmyslu, dále se zaměřuje na možnosti testování toxicity *in vitro* a poskytuje stručný přehled běžně používaných testů cytotoxicity jako je MTT test či LDH test.

Experimentální část diplomové práce se zabývá přípravou vodných extraktů z houbových prášků a jejich charakterizací z hlediska nutričních a biologicky aktivních látek. Pomocí HPLC analýzy sleduje obsah lipofilních látek a vitamínu C v jednotlivých vzorcích hub. Pro potvrzení biologického účinku na lidské zdraví byl proveden antimikrobiální test za použití čtyř modelových mikroorganismů a testy cytotoxicity na dvou lidských buněčných liniích. Nakonec byla provedena senzorická analýza instantní zeleninové polévky obohacené o přídavek houbového prášku.

U analyzovaných práškových extraktů z houby lesklokorky lesklé byly potvrzeny biologické účinky, a to především jejich cytotoxický účinek na nádorové buňky epitelu tlustého střeva. Aplikace do potravinářství není v případě reishi snadná, a to kvůli triterpenoidům, které způsobují hořkou chuť. Naopak v případě korálovce ježatého byla pomocí testů cytotoxicity potvrzena bezpečnost použití v potravinářství. Výsledky senzorické analýzy prokázaly pozitivní vliv korálovce ježatého na chuťový profil instantních zeleninových polévek.

KLÍČOVÁ SLOVA

Houby, β -glukany, antimikrobiální test, HaCaT, Caco-2, testy cytotoxicity, MTT test, LDH test, AlamarBlue test, cytokiny, IL-6, IL-8

ABSTRACT

This diploma thesis deals with the characterization of nutrition substances in medical mushrooms, specifically *Ganoderma lucidum* and *Hericium erinaceus*. It also focuses on the biological impact of these rare mushrooms on human cell lines HaCaT and Caco-2, and investigates the production of pro-inflammatory cytokines IL-6 and IL-8 by immortalized keratinocytes and colon cancer cells after exposure to aqueous extracts prepared from mushroom powder.

The theoretical part of the thesis deals with the characterization of mushrooms in terms of morphological characteristics and their taxonomic classification. It further studies the effects of edible and medicinal species and provides a detailed description of medicinal mushrooms such as *Ganoderma lucidum*, *Lentinula edodes*, *Flammulina velutipes*, *Grifola frondosa*, *Hericium erinaceus* and *Pleurotus ostreatus*, thesis informing about their effects, utilization and possibilities for application in the food and pharmaceutical industries. It mentions possible negative effects of mushrooms on consumers' health and presents methods for processing mushrooms and their use in the food industry. Finally, it focuses on the possibilities of *in vitro* toxicity testing and provides a brief overview of commonly used cytotoxicity tests such as the MTT test and LDH test.

The experimental part of the thesis deals with the preparation of water extracts from mushroom powders and their characterization in terms of nutritional and biologically active substances. HPLC analysis is used to monitor the content of lipophilic substances and vitamin C in mushroom samples. To confirm the biological effect on human health, antimicrobial tests were performed using four model microorganisms, and cytotoxicity tests were performed on two human cell lines. Lastly, a sensory analysis of instant vegetable soup enriched with mushroom powder was performed.

Biological effects of the analyzed powdered extracts from *Ganoderma lucidum* mushroom have been confirmed, especially their cytotoxic effect on colon epithelial tumor cells. However, the application of reishi in the food industry is not easy due to the presence of triterpenoids that cause a bitter taste. On the other hand, the safety of using the *Hericium erinaceus* mushroom in food has been confirmed through cytotoxicity tests. Sensory analysis results have shown a positive effect of *Hericium erinaceus* on the taste profile of instant vegetable soups.

KEYWORDS

Mushrooms, β -glucans, antimicrobial test, HaCaT cells, Caco-2 cells, cytotoxicity tests, MTT test, LDH test, AlamarBlue test, cytokines, IL-6, IL-8

CITACE

VETCHÁ, Vendula. *Příprava potravinových doplňků na bázi vzácných druhů hub* [online]. Brno, 2023 [cit. 2023-01-30]. Dostupné z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/149092>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce Julie Hoová.

PROHLÁŠENÍ

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

.....

Podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala Ing. Julii Hoové, Ph.D. za vedení diplomové práce, vstřícné konzultace, trpělivost a především ochotu, se kterou mi vždy vše vysvětlila, dále za příjemnou spolupráci v laboratoři a poskytnutí cenných rad při vypracování diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat doktorandkám z Ústavu chemie potravin a biotechnologií za ochotu a pomoc v laboratoři. Můj velký dík patří také mé mamince a celé rodině. Na závěr bych chtěla poděkovat svým nejlepším kamarádkám a spolužačkám za jejich nekonečnou podporu.

OBSAH

KLÍČOVÁ SLOVA.....	3
1 ÚVOD.....	10
2 TEORETICKÁ ČÁST	11
2.1 Charakteristika hub	11
2.2 Taxonomie hub	11
2.2.1 Oddělení <i>Ascomycota</i>	12
2.2.2 Oddělení <i>Basidiomycota</i>	13
2.3 Morfologie vyšších hub	14
2.4 Jedlé a léčivé druhy hub	15
2.5 Vybraní zástupci vzácných druhů hub	16
2.5.1 Lesklokorka lesklá	16
2.5.2 Houževnatec jedlý.....	18
2.5.3 Trsnatec lupenitý.....	22
2.5.4 Penízovka sametonohá	25
2.5.5 Korálovec ježatý	28
2.5.6 Hlíva ústříčná.....	30
2.6 Negativní účinky hub	33
2.7 Houby v potravinářském průmyslu	33
2.8 Technologické zpracování hub do práškové formy	34
2.9 Testování toxicity <i>in vitro</i>	35
2.10 Testy cytotoxicity	36
2.10.1 MTT test	36
2.10.2 LDH test	36
2.10.3 AlamarBlue test	37
3 CÍL PRÁCE	38
4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	39
4.1 Použité chemikálie pro analýzy	39

4.2 Použité komerční kity.....	39
4.3 Použité chemikálie pro kultivace	39
4.4 Použité chemikálie pro buněčné linie.....	39
4.5 Použité přístroje a laboratorní pomůcky.....	40
4.6 Použité mikroorganismy.....	40
4.7 Použité buněčné linie.....	41
4.8 Použité vzorky hub.....	41
4.9 Příprava vodných extraktů.....	41
4.10 Spektrofotometrické analýzy.....	41
4.10.1 Stanovení celkových sacharidů dle Duboise	41
4.10.2 Stanovení redukujících sacharidů metodou Nelson-Somogyi.....	42
4.10.3 Stanovení bílkovin metodou Biureta.....	43
4.10.4 Stanovení celkového obsahu fenolických látek	43
4.10.5 Stanovení antioxidační aktivity	44
4.11 Stanovení obsahu β -glukanů pomocí kitu Megazyme	44
4.11.1 Stanovení celkových glukanů	44
4.11.2 Stanovení α -glukanů.....	45
4.12 Analýza lipofilních látek pomocí HPLC	46
4.12.1 Extrakce lipofilních látek metodou dle Folche	47
4.13 Stanovení vitamínu C pomocí RP-HPLC/UV-VIS.....	47
4.14 Antimikrobiální test	48
4.14.1 Příprava médií a kultivace mikroorganismů pro antimikrobiální test.....	48
4.14.2 Mikrodiluční bujónová metoda.....	49
4.14.3 Resazurinový test	49
4.15 Cytotoxické testy.....	49
4.15.1 Kultivace buněčné linie Caco-2	50
4.15.2 Kultivace buněčné linie HaCaT	50

4.15.3 MTT test	50
4.15.4 LDH test	51
4.15.5 AlamarBlue test	51
4.16 Analýza produkce prozánětlivých interleukinů IL-6 a IL-8.....	52
4.17 Aplikace houbových prášků.....	52
4.18 Senzorická analýza.....	53
4.18.1 Příprava vzorků pro senzorickou analýzu	54
4.18.2 Senzorické hodnocení	54
4.18.3 Zpracování výsledků senzorické analýzy	54
5 VÝSLEDKY A DISKUSE	55
5.1 Charakterizace vzorků hub z hlediska nutričně významných látek	55
5.1.1 Stanovení celkových a redukujících sacharidů.....	55
5.1.2 Stanovení celkových bílkovin metodou dle Biureta	57
5.1.3 Stanovení celkového obsahu polyfenolů a antioxidační účinnosti	59
5.2 Stanovení celkových glukanů, α - i β -glukanů	60
5.3 Analýza lipofilních látek pomocí HPLC/UV-VIS	61
5.4 Stanovení vitamínu C metodou RP-HPLC/DAD.....	62
5.5 Antimikrobiální test.....	62
5.6 Stanovení cytotoxicity	66
5.6.1 MTT test	66
5.6.2 LDH test	70
5.6.3 AlamarBlue test	72
5.7 Analýza produkce prozánětlivých interleukinů IL-6 a IL-8.....	74
5.8 Vyhodnocení senzorické analýzy.....	76
5.8.1 Celkový vzhled	76
5.8.2 Barva	77
5.8.3 Konzistence.....	78

5.8.4	Vůně	78
5.8.5	Chuť	79
5.8.6	Hořkost	80
5.8.7	Celková přijatelnost	81
6	ZÁVĚR.....	83
7	SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ.....	86
8	PŘÍLOHY	95

1 ÚVOD

Do vyváženého jídelníčku každého jedince houby bezpochyby patří. V současné době jsou houby velmi žádanou a atraktivní surovinou, a to jak v čerstvém, tak technologicky zpracovaném stavu. Jejich konzumace může být nejen gastronomickým zážitkem, nýbrž i prevencí široké škály onemocnění. Mezi řadu benefitů, se kterými je jejich konzumace spojena, patří jejich antimikrobiální, antioxidační a protirakovinné vlastnosti. Jejich konzumace může ale také pozitivně ovlivnit gastrointestinální trakt. Buněčná stěna hub je tvořena z velké části polysacharidy, konkrétně β -glukany, které představují pro člověka nestravitelnou složku potravy, s tímto problémem si velmi ochotně poradí kolonizátoři lidského střevního epitelu, přátelské bakterie rodu *Lactobacillus*. Konzumace hub tedy přispívá k druhové rozmanitosti, četnosti a viabilitě přátelských střevních bakterií.

S narůstající popularitou těchto elixírů života narůstá i výskyt potravinových doplňků. Houby jsou podobně jako ovoce a zelenina omezeny svou krátkou dobou trvanlivosti. Důležitou roli v jejich technologickém zpracování hrají posklizňové úpravy, kterých může být použito hned několik. Nejpoužívanější metodou konzervace je sušení, při kterém je důležité dbát striktních technologických postupů, aby vlivem vysoké teploty nedocházelo k degradaci bioaktivních látek v houbách. Usušené plodnice jsou následně pomlety na jemný houbový prášek, který lze přidávat do pokrmů nebo suplementovat ve formě kapslí.

Cílem této diplomové práce je charakterizovat vybrané vzácné druhy hub z hlediska nutričně významných a biologicky aktivních látek. Zkoumat antimikrobiální, antioxidační, protirakovinné a imunomodulační účinky vybraných druhů hub. Dále navrhnout a zakomponovat méně chuťově atraktivní druhy do potravinového doplňku ve formě instantní zeleninové polévky a vylepšit tak nutriční skóre dané potraviny.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Charakteristika hub

Houby neboli *Fungi* reprezentují nejstarší vývojovou linii. Předpokládá se, že houby byly první eukaryota, která osídlila souš. V současnosti se řadí mezi druhově nejrozmanitější skupinu a dodnes není jejich původ zcela objasněn [1]. Jedním z důvodů může být i naprosté minimum fosilních nálezů nebo zkamenělin z předešlých geologických období [2].

Po dlouhou dobu byly houby vnímány jako vedlejší vývojová větev nižších rostlin [2]. Na základě hlubšího studia fylogenetického vývoje hub došlo k názoru, že houby vznikly samovolně, a je tedy nutné je považovat, vedle říše rostlin (*Plantae*) a živočichů (*Animalia*), za samostatnou třetí říši *Fungi* [2]. Houby jsou eukaryotické heterotrofní organismy, jejich tělo má jednoduchou stavbu, mohou být jednobuněčné i mnohobuněčné [3].

Pojem houba nezahrnuje pouze plodnici, kterou je možné nalézt v lese. Mezi houby se řadí i mikroskopické organismy, které mohou být buď vláknité, nebo jednobuněčné, jako vláknité lze uvést příklad plísně nebo jednobuněčné mikromycety, které představují například kvasinky. Znatelně velké houby, které je možné vidět v lese nebo běžně koupit v obchodě, jsou nazývány makromycety [4].

Význam hub pro přírodu je zcela zásadní, spolu s bakteriemi plní funkci tzv. destruentů, převádějí látky organického původu, které vyprodukovaly zelené rostliny, na látky anorganické, které zelené rostliny potřebují pro produkci organických látek. Spolu se zelenými rostlinami tvoří koloběh života na Zemi.

Vědecký obor zkoumající život, vlastnosti, činnost a význam hub v přírodě se nazývá mykologie. Dříve byla tato vědecká disciplína součástí botaniky [2].

2.2 Taxonomie hub

Klasifikace hub je poněkud nestálý systém zařazování hub do příslušných oddělení či tříd. S vývojem moderních technologií dochází k novým zjištěním, a je tedy nutné systém hub aktualizovat.

Nejstarší systém klasifikace hub byl založen převážně na viditelných morfologických znacích. Rozděloval houby na houby nižší, kam se řadily pravé plísně, a houby vyšší, kam patřily houby vřeckovýtrusé, stopkovýtrusé a houby nedokonalé [2].

V roce 1968 mykolog J. A. von Arxem navrhl nové uspořádání hub. Říši *Fungi* rozdělil do čtyř oddělení, a to *Myxomycota*, *Chytridiomycota*, *Oomycota* a *Eumycota*. Do oddělení *Eumycota* neboli „pravých hub“ byly řazeny makromycety, houby, které tvoří viditelné plodnice. Pro pravé houby byly charakteristické následující znaky: přítomnost β -glukanů

a chitinu ve stěnách buněk, nepřítomnost pohyblivých výtrusů, zachování projevů pohlavnosti, jsou obvykle jednobuněčné nebo rostou jako mycelium – mnohojaderné válcovité buňky různé velikosti [2,5]. Na základě morfologických a reprodukčních znaků bylo oddělení *Eumycota* rozděleno do čtyř tříd: *Zygomycetes* (houby spájivé), *Endomycetes* (houby pučivé), *Ascomycetes* (houby vřeckovýtrusé), *Basidiomycetes* (houby stopkovýtrusé) [2].

Další nové metody přinesly opět nový pohled na evoluci hub a s nimi bylo navrženo i další nové rozdělení. Říše *Fungi* se následně rozdělovala do pěti oddělení: *Chytridiomycota*, *Microsporidiomycota*, *Zygomycota*, *Ascomycota* a *Basidiomycota* [4]. Dalších několik let přineslo nové objevy a s nimi přišlo opět nové dělení, kdy k současným pěti oddělením bylo přidáno oddělení šesté, a to *Glomeromycota* [3].

V současnosti díky novým technologiím založených na enviromentálním sekvenování je rozmanitá říše pravých hub rozdělena do devíti hlavních oddělení: *Opisthosporidia*, *Chytridiomycota*, *Neocallimastigomycota*, *Blastocladiomycota*, *Zoopagomycota*, *Mucoromycota*, *Glomeromycota*, *Ascomycota* a *Basidiomycota* [5].

V oblasti potravinářství a léčitelství se nejvíce využívají makromycety, které tvoří větší plodnice, a to především houby patřící mezi *Ascomycota* a *Basidiomycota* [3].

2.2.1 Oddělení *Ascomycota*

Ascomycota neboli houby vřeckaté, často se setkáme i s názvem houby vřeckovýtrusé, patří mezi druhově nejbohatší kmen a zatím jsou detailně popsány přibližně dvě třetiny všech druhů. Společně s oddělením *Basidiomycota* spadají do podříše Dikarya, pro které je hlavním znakem sexuální cyklus, kdy dochází k produkci dikaryotických hyf [5].

Ascomycota jsou mnohobuněčné houby s přehrádkovaným myceliem. V jednotlivých přehrazených částích se nachází jednoduchý pór, který slouží k průchodu plazmy a jader. Převážná část životního cyklu probíhá v haploidní fázi [2].

Houby patřící do oddělení *Ascomycota* mají morfologicky rozlišené pohlavní orgány. Pohlavní rozmnožování vede ke tvorbě dikaryotických hyf, které na rozdíl od *Basidiomycota* mají poměrně kratší dobu životnosti [5]. Dikaryotická hyfa vede k produkci vřečka neboli asky, vakovité struktury, ve které následně po karyogamii a meióze, tj. pohlavním procesu, dochází ke vzniku obvykle osmi askospor. Nepohlavní proces rozmnožování je velmi běžný, dochází k němu prostřednictvím výtrusů jako konidie, oidie nebo chlamydospory [2,5].

Oddělení *Ascomycota* je druhově rozmanité, zahrnuje mikroskopické houby od jednoduchých kvasinek, které jsou častokrát používány jako modelové organismy, např. *Saccharomyces cerevisiae*, až po vyšší houby se složitými makroskopickými plodnicemi. Kmen *Ascomycota* se dále rozděluje na tři hlavní třídy: *Taphrinomycotina*, *Saccharomycotina* a *Pezizomycotina* [5].

2.2.2 Oddělení *Basidiomycota*

Oddělení *Basidiomycota*, houby stopkovýtrusé, je druhým druhově nejrozsáhlejším oddělením z říše hub. Bylo popsáno téměř 32 000 druhů a z hlediska buněčného cyklu patří mezi nejsložitější houby [5]. Do tohoto oddělení je řazena velká část hub sloužících k lidské spotřebě, přičemž většina těchto druhů obsahuje farmakologicky významné účinné látky [6].

Basidiomycota utváří přehrádkované mycelium [2]. Přeřádky mají ve stěnách utvořený soudečkovitý útvar, pór, označovaný jako doliporus [6,7]. Mezi hlavní charakteristický znak se řadí tvorba meiosporangia, které se nazývá bazidie, specializované buňky kyjovitého tvaru, které produkují obvykle čtyři bazidiospory [2]. Tvorba bazidiospory probíhá exogenně na stopkách, tzv. sterigmatech, bazidií. To znamená, že proces karyogamie a následná meióza probíhají právě ve zmíněné bazidii. V životním cyklu stopkovýtrusých hub převládá dvoujaderné mycelium, které vzniká při spojení dvou pohlavně odlišných primárních mycelií.

V tento okamžik dochází k plazmogamii, splynutí pouze buněk, nikoliv jejich jader, a vzniku dikaryotické buňky. Z dikaryotické buňky dále vzniká dvoujaderné podhoubí, v této fázi životního cyklu stopkovýtrusých hub je významný krok, který je typický pro většinu druhů, a to tvorba přezky. Tento útvar zajišťuje rovnoměrné rozdělení dceřiných jader [6]. Jedno ze dvou dceřiných jader zůstává ve špičce buňky, druhé putuje do přezky. Dojde k současnému rozdělení obou dceřiných buněk, ve špičce buňky i v přezce se jádra rozdělila na dvě a následuje opět výměna jader, kdy jedno jádro z přezky se vymění za jedno jádro ze špičky. V tuto chvíli se přezka uzavře a dojde ke vzniku dvou oddělených dikaryotických buněk [7].

Sekundární dikaryotické mycelium roste neomezeně dlouho po dobu několika týdnů až let a za příhodných podmínek vnějšího prostředí, jako je určitá teplota a vlhkost, může vytvářet plodnice, tvořené dikaryotickými hyfami [6]. Ve výtrusorodém roušku plodnice v bazidiích dochází k procesu karyogamie čili splynutí jader a následně k meiotickému dělení. Díky tomu opět vznikají zpravidla čtyři haploidní stopečkaté výtrusy neboli bazidiospory [6,7].

Literatura se v oblasti klasifikace oddělení *Basidiomycota* značně rozchází. Dříve se toto oddělení dělilo do dvou tříd, a to *Heterobasidiomycetes* a *Holobasidiomycetes*. V současnosti se ale mnohem více přiklání k rozdělení toho oddělení do třech pododdělení: *Pucciniomycotina*, *Ustilaginomycotina* a *Agaricomycotina* [5,6].

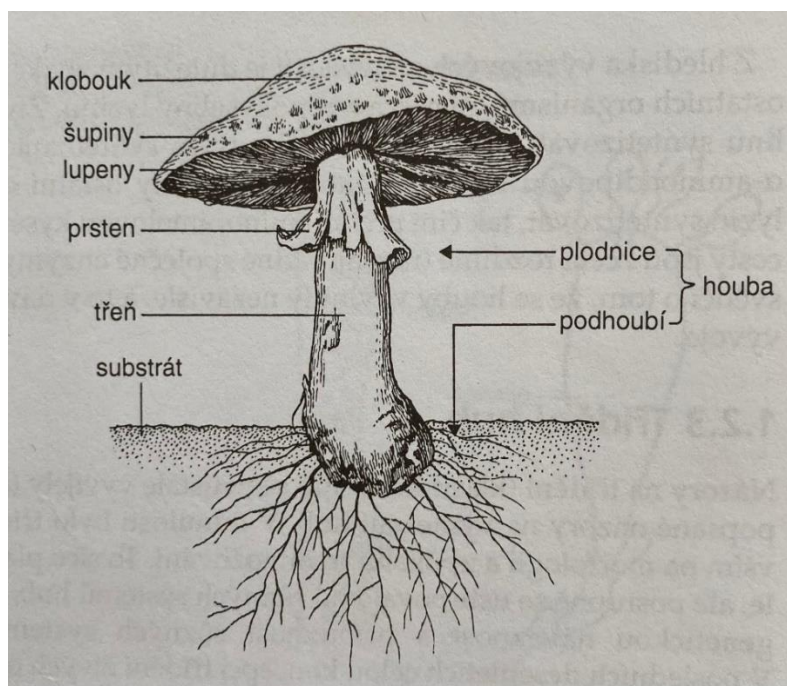
2.3 Morfologie vyšších hub

Celý systém zařazování hub je založen právě na morfologických znacích jednotlivých druhů. Vnější i vnitřní morfologie plodnic, morfologie výtrusů i způsob jakým vznikají, vzájemná podobnost i pozorování příbuzenských vlastností. Na to vše je brán zřetel při zařazování hub do systému [8].

Tělo hub je tvořeno stélkou, která v případě mikroskopických hub může být jednobuněčná. Ve většině případů vyšších hub je stélka tvořena vláknitými vegetativními buňkami mikroskopických rozměrů tzv. hyfami [9,10]. Hyfy rostou apikálně, putují směrem k živinám a jsou rozdělovány do dvou směrů [9].

První vede k vytvoření vegetativního podhoubí nebo-li mycelia [10]. Mycelium má podobu bílé pavučinovitě propletené, vláknité struktury, jejímž hlavním cílem je zajistit výměnu energie a potřebných látek. Mycelium může nabývat velikosti od několika desítek centimetrů až po desítky metrů čtverečních a jeho stáří může být až v řádu tisíců let [11].

Druhý směr růstu hyf je morfologicky odlišný, nese rozmnožovací orgány a vede k tvorbě plodnic. Plodnice neboli sporokarp je tedy složena z hyfového pletiva a její součástí jsou výtrusorodé buňky jako vřečka, bazidie a konidie [8].



Obrázek 1 Morfologická stavba houby [4]

Tvar plodnice může být velmi různorodý, stejně tak i její velikost, která může dosahovat od mikroskopických rozměrů až po několik decimetrů [8]. Jednoduchý typ plodnice může představovat jen spletené klubičko hyf kolem věceček. V případě vyšších hub jsou plodnice vývojově dokonalejší, lze u nich rozlišit třen (*stipes*) a klobouk (*pileus*) (Obrázek 1). Na třeni se může, ale nemusí vyskytovat prstenec. Je možné nalézt i plodnice bez třeně, takové přirůstají bokem ke substrátu [8,10].

Klobouk i třen jsou orgány tvarově rozmanité a proměnné. S vývinem plodnice se mění i tvar klobouku. Velkou roli při určování druhu hub hraje připojení klobouku ke třeni [10].

Plodnice vyšších hub, konkrétně hub lupenatých i hříbovitých jsou zpravidla uzavřeny v obalu tzv. velumu. Jde o dvojitý obal, který první vrstvu zanechává u dospělých plodnic na povrchu klobouku jako strukturovitý zbytek a pochvu na třeni. Druhá vrstva zanechává zbytečky na okraji klobouku a ve spodní části třeně. Druhá vrstva je i původce vzniku prstenu v horní části třeně [8].

Vnitřek plodnice je tvořen dužinou [10]. Ta může být velmi křehká, masitá, vodnatá, šťavnatá, suchá, vláknitá, kožovitá, tuhá i dřevnatá. Existuje mnoho znaků pozorovatelných na řezu nebo lomu dužiny. Například barva může být v dužině klobouku odlišná od třeně nebo dužina může ronit latex. Důležitým znakem při diagnostice je také chuť dužiny [8].

2.4 Jedlé a léčivé druhy hub

Mezi jedlé druhy hub patří houby, které nemají negativní vliv na lidské zdraví, za to mají bohaté nutriční složení a výbornou chuť. Houby jsou kvalitní funkční potravinou, patří mezi nízkokalorické potraviny s vysokým obsahem vlákniny, sacharidů a dalších zdraví prospěšných látek. Běžně sbírané ke kulinářskému využití jsou zástupci hřibů, kozáci, klouzky, bedle vysoká, liška obecná, ryzec smrkový a mnohé další. Důležité je pro konzumaci sbírat pouze mladé plodnice, které je vždy nutné ošetřit tepelným zákrokem, buď vařením, smažením, nebo pečením. Konzumace starých nebo nějakým způsobem vadných plodnic se nedoporučuje stejně jako konzumace syrových hub [8,12].

Léčivé houby jsou takové, které svými účinky ovlivňují zdraví konzumenta. Díky obsahu bioaktivních látek neslouží primárně jako pochutina, nýbrž spíše jako doplněk stravy. Výzkumy u řady hub prokázaly účinky proti bakteriím, virům, plísním, infekcím, zánětům, nádorům.

Jiné druhy hub projevily schopnost chránit konzumenta před oxidačním stresem, snižovat hladinu cukru a cholesterolu v krvi nebo posilovat imunitní systém. Ze zástupců léčivých hub jsou nejznámější hlíva ústříčná, outkovka pestrá, korálovec ježatý, hnojník obecný, trsnatec lupenitý, kotrč kadeřavý, houževnatec jedlý, choroš oříš, penízovka sametonohá, smrž obecný, leskokorka lesklá a další [13].

2.5 Vybraní zástupci vzácných druhů hub

Následující kapitola se věnuje vybraným jedlým i nejedlým léčivým druhům hub. Detailnímu popisu, původu, výskytu, obsahovým bioaktivním látkám a možnostem využití v kulinářství či medicíně.

2.5.1 Lesklokorka lesklá

Dominantní znak této houby je prozrazen již v jejím názvu, a to hned dvakrát. Jde o houbu, která svým lesklým vzhledem působí jako by byla nalakovaná či glazurovaná [4]. Celosvětově je tato houba známá pod populárním názvem Reishi, který pochází z japonštiny. Je možné se setkat i s čínským označením této houby Ling zhi.

Původní lokací této houby byla pravděpodobně jihovýchodní Asie, konkrétně oblast Číny, Vietnamu, Koreje. Dnes je rozšířena nejen po Evropě, ale i Severní Americe, USA a Kanadě. Tuto vzácnou saprofytickou houbu lze nejčastěji nalézt na pařezích listnatých stromů, konkrétně buků a dubů v období od května do října, kdy zpravidla nejhojněji roste [3,14].

Klobouk lesklokorky lesklé může dosahovat průměru 4–20 cm. Na dotek je tuhý, jeho tvar může být kruhovitý, oválný či ledvinovitý, někdy až vějířkovitý s tupým nebo zvlněným okrajem [4,15]. Barva klobouku se postupně mění, zprvu je převážně žlutý s lehkým nádechem do hněda ve středu klobouku, následně přechází do červenohnědého zbarvení, dále pak přes fialovohnědé zbarvení až do tmavé kaštanově hnědé barvy. Povrch klobouku je hladký a lesklý. Na spodní straně klobouku se nacházejí rourky, které jsou okrouhlé, s drobnými 5–20 mm dlouhými póry bělavé až hnědé barvy. Třeň je štíhlý 3–20 cm dlouhý, 1–2,5 cm široký, excentrický často i postranní. Barva třeně se postupně také mění, přechází přes červenohnědou až do tmavě hnědé, která je nejčastější [4,15]. Dužina houby má zpočátku světle béžovou barvu, která se mění na okrovou, později žlutohnědou až do světle hnědé. Na příčném řezu lze pozorovat plstnatou, korkovitou, poměrně tvrdou konzistenci. Aroma dužiny je nepříjemně zatuchlé. Chuť dužiny je nepříjemná a moučná [15].



Obrázek 2 Lesklokorka lesklá [12]

Již staré japonské zmínky hovoří o lesklokorce lesklé jako o houbě věčného mládí a dlouhověkosti. Je dokonce nazývána králem léčivých bylin [4]. I přestože plodnice lesklokorky jsou nejedlé, tuhé a hořké, patří tato houba díky obsahu bioaktivních látek mezi nejvýznamnější zástupce léčivých hub, jejíž účinky jsou nadále zkoumány [3].

V současné době jsou potvrzeny protizánětlivé, hypoglykemické, chemoprotektivní, antialergické, antibakteriální, hepatoprotektivní, imunomodulační a protirakovinné účinky. Nejvíce bioaktivních látek bylo izolováno a extrahováno z plodnice hub a mycelia [15]. Následně bylo identifikováno přes 600 chemických sloučenin jako alkaloidy, nukleosidy, polysacharidy, imunoproteiny, steroidy a triterpenoidy [16].

Lesklokorka lesklá (Obrázek 2) obsahuje jako většina hub polysacharidy, konkrétně β -glukany vykazující imunitní stimulaci, protizánětlivou a protinádorovou aktivitu. V těchto houbových glukanech nalezneme v hlavním řetězci primárně β -(1 $\rightarrow$ 3) vazby, místy rozvětvený s krátkými β -(1 $\rightarrow$ 6) vazbami. Imunomodulační a protirakovinné vlastnosti houbových β -glukanů určuje jejich struktura, přičemž platí, že čím větší molekulová hmotnost daného β -glukanu, tím vyšší aktivitu bude projevovat [17].

Z lesklokorky lesklé bylo vyizolováno doposud přes 100 polysacharidů s protirakovinnými účinky. Právě polysacharidy se při imunitní odpovědi chovají jako modulátory biologické odpovědi. Aktivují makrofágy, T lymfocyty a NK buňky, a tím zajistí produkci cytokinů, konkrétně interleukinů a interferonů [15]. Studie ukazují, že polysacharidy obsažené v houbě reishi potlačují tumorigenezi, invazi a metastázy různých druhů rakoviny [18].

Triterpenoidy jsou vedle polysacharidů a imunoproteinů jedny z nejzajímavějších látek pro farmakologický průmysl. V houbě reishi byly objeveny dva hlavní typy triterpenoidů, a to kyselina ganoderová, kyselina lucidenová a jejich deriváty. Triterpenoidy přispívají nejen ke snížení krevního tlaku, hladiny cholesterolu v krvi, ale projevují se u nich také chemo-preventivní účinky.

Bylo popsáno, že kyselina ganoderová potlačuje buněčný růst HeLa buněk prostřednictvím apoptické smrti. Další studie potvrzují cytotoxicitu extraktů houby a ukazují na zastavení buněčného cyklu a indukci apoptózy i v případě buněčné linie CaCo-2 lidského karcinomu tlustého střeva [19]. Jiné studie potvrzují antimikrobiální aktivitu proti *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* a *Bacillus subtilis*, způsobenou přítomností pofenolických kyselin, flavonidů, chinonů a terpenů [15].

Lesklorka lesklá je opravdu bohatým zdrojem různých látek, tento fakt nám potvrzuje i skutečnost, že v ní bylo nalezeno 18 volných aminokyselin, nukleosidy, mastné kyseliny jako například kyselina stearová, palmitová, linolenová, behanová nebo kyselina olejová. Užívání lesklorky zajistí přísun vitaminů skupiny B, a to konkrétně B₁, B₂, B₆, B₁₂, vitaminu C a E a celé řady minerálních látek jako hořčík, zinek, mangan nebo organicky vázané germanium [15,20].

Samotné sušené houby, výtažky z houby, připravené tinktury nebo sirupy se doporučují na léčbu hned několika chorob. Houba reishi se hojně užívá při problémech s chronickou nespavostí, bronchitidou, nefritidou, astmatem, anorexií, hepatitidou typu B, diabetem, při léčbě žaludečních vředů nebo kardiovaskulárních onemocněních [15,20].

2.5.2 Houževnatec jedlý

Houževnatec jedlý neboli houba shiitake je třetí nejpěstovanější houbou na světě. Častý je také čínský název pro tuto houbu xiangu. V odborné literatuře ji najdeme pod latinským názvem *Lentinus edodes* [3].

Původní oblastí této houby je východní a jihovýchodní Asie, jako je Japonsko, Čína, Nová Guinea. Volně shiitake roste na živých i odumřelých kmenech listnatých stromů: dubů, olší, habrů a kaštanů [20]. Již před více než tisíci lety byla v Číně tato houba pěstována primitivním způsobem na špalcích dřeva. V současnosti jsou jako substrát používány dřevěné špalky, kláty, piliny z listnatých stromů, drcená sláma nebo drcená kukuřičná vřetena [4].

Plodnice houževnatce jedlého se sestává z klobouku o průměru 5–12 cm. V případě mladých plodnic je klobouk polokulovitý s podvinutým okrajem, který časem přejde do sklenutého až mírně rozloženého. Klobouk starších plodnic se vyznačuje nepravidelně nadzvednutým

okrajem. Barva klobouku se mění, může být od světle hnědé přes tmavohnědou s červeným nádechem a tmavším středem. Pokožka klobouku bývá suchá a matná, často šupinatá a rozpraskaná. Lupeny jsou vysoké 3–7 cm, připojené ke třeni, zprvu bělavé barvy, později lehce růžové s hnědými skvrnami. Třeň nedosahuje vysokých rozměrů, bývá vysoký 3–5 cm a široký 0,5–1,5 cm. Třeň je obvykle válcovitého tvaru s jemnými šupinkami. Dužina houby shiitake je pevná, bělavá s jemnou chutí a příjemně houbovou vůní s lehkým česnekovým podtónem [14,15].



Obrázek 3 Houževnatec jedlý [15]

Produkce shiitake (Obrázek 3) stoupla nejen díky bohatému nutričnímu složení, ale rovněž díky zastoupení nemalého množství léčivých látek [21]. První pěstitelské pokusy byly provedeny již v 10. století v Číně. Lze si houbu vypěstovat i v domácích podmínkách, stačí pouze vhodný naočkovaný substrát [20]. Tradiční i moderní pěstírny jsou k nalezení převážně v Japonsku, Číně a Koreji, kde pěstují shiitake na nařezaných špalcích listnatého dřeva [3]. Do dvou měsíců od pokácení se špalky očkují do vyvrtaných otvorů a uloží se na sebe do metrů, cílem je, aby podhoubí vrostlo do dřeva [4]. Ideální podmínky pro růst je vlhké prostředí a stabilní teplota v rozmezí 10–15 °C [3]. Porostlé špalky podhoubím jsou vhodné k nasazení plodnic, toho lze dosáhnout máčením nebo pravidelným kropením vodou. Dle počtu sklizní za rok se určuje plodnost špalku dřeva na 2–5 let. Produkční farmy mají až 50 000 špalků [4].

Shiitake není bezdůvodně řazena mezi jedlé a léčivé houby. Díky svému vysokému obsahu vlákniny, bílkovin, aminokyselin, vitaminů, minerálních látek a mnoha dalších léčivých složek je nepostradatelnou položkou na jídelníčku nejednoho člověka. Například vysoký obsah polyfenolu je důkazem antioxidační aktivity. Antibakteriální účinek je potvrzen antimikrobiální aktivitou proti *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* nebo *Pseudomonas aeruginosa*. Mezi další prokázané účinky působící na zdraví konzumenta patří antidiabetické, hypotenzní, hypocholesterolemické, imunomodulační, antifungální, hepatoprotektivní [21].

Z minerálních látek houževnatec jedlý obsahuje například vápník, hořčík, draslík, fosfor, železo, sodík a stopové množství hliníku, chromu, manganu či selenu [22]. Za zmínku stojí i významné množství vitaminů skupiny B, thiaminu, riboflavinu, niacinu, kyseliny pantotenové, dále ergosterolu i vitaminu D₂. Hojně zastoupeny jsou i aminokyseliny, v houbě najdeme jak esenciální aminokyseliny jako leucin, izoleucin, lysin, methionin, fenylalanin, valin, threonin, tryptofan, tak i semi-esenciální aminokyseliny, a to histidin a arginin.

Houževnatec jedlý obsahuje přibližně 68–78 % sacharidů. Najdeme zde zástupce monosacharidů jako glukózu, mannózu, xylózu, ribózu nebo ramnózu, dále disacharidy, především ale polysacharidy jako α -glukany i β -glukany, xyloglukany, polyuronoidy a další [23]. Není proto divu, že jednou z nejvíce bádáných látek houževnatce jedlého je právě polysacharid, konkrétně β -(1→3)-glukan, známý pod názvem lentinan [15].

Lentinan je ve vodě rozpustný polysacharid s vysokou molekulovou hmotností až okolo 400–800 kDa. V jeho řetězci nalezneme molekuly glukózy s většinou (1,3)- β -D-glukanovými vazbami v pravidelně rozvětveném hlavním řetězci s 2 β -(1,6)-D-lukopyranosidovými větvemi na každém 5 β -(1,3)-glukopyranosidu lineární vazby. Mnohé klinické studie ukazují na pozitivní protinádorovou a imunitní aktivitu při léčbě různých typů rakoviny. Takto silná protinádorová aktivita je přisuzována lentinanu díky jeho vysoce uspořádané struktuře, která mu umožňuje indukovat interleukin-12, který stimuluje činnost NK buněk a produkci T lymfocytů [24].

Vedle polysacharidů jsou i další biologicky aktivní látky, na které je třeba se zaměřit. Přítomné exogenní aminokyseliny regulují syntézu cytokinů, produkci protilátek i proliferaci lymfocytů.

Svoji roli v imunitní odpovědi hrají také vitaminy B a D. Existují důkazy, že vitaminy skupiny B regulují funkci T buněk, NK buněk, buněčnou proliferaci i syntézu cytokinů. Obdobnou funkci studie potvrzují i v případě vitaminu D, který řídí funkci všech imunitních buněk, včetně T i B lymfocytů, monocytů, makrofágů, ale i dendritických buněk. I minerální

látky zejména zinek a hořčík mají vliv na imunitní odpověď, a to jak na vrozenou, tak na adaptivní.

Provedené studie zkoumaly účinky užívání houževnatce jedlého jak na zvířatech, tak na lidech. První studie na lidech byly provedeny již v 80. letech 20. století, kdy byly poprvé popsány imunitní účinky lentinanu u zdravých lidí. Bylo zjištěno, že tato látka zvyšuje proliferaci mononukleárních buněk periferní krve a rovněž zvyšuje produkci a aktivitu NK buněk. Při studii provedené na pacientech s rakovinou žaludku došlo k získání velmi podobných výsledků, lentinan jim byl podáván intravenózně po dobu 7 dnů v množství 2 mg a sloužil jako podpůrná léčba k chemoterapii. V tomto případě byla navíc detekována i významně zvýšená produkce IL-1 α , IL-1 β , dále se zvýšil i poměr aktivovaných T buněk a cytotoxických T buněk ve slezině [23].

V roce 1985 byl v Japonsku lentinan schválen do klinického použití a je vyráběn několika farmaceutickými firmami. Při radiační terapii nebo při chemoterapii s některými typy rakoviny lze používat výtažky nebo polysacharidové frakce jako podpůrnou léčbu ke zmírnění vedlejších negativních účinků těchto terapií, ale i jako hepatoprotektivní prostředek ke zlepšení funkce jater [15].

Mezi další vyizolované polysacharidy z houževnatce jedlého patří například galaktoglukomannan nebo fukomannogalaktan, přičemž u obou byly potvrzeny protizánětlivé účinky [15].

Z extraktů kultivovaného mycelia shiitake byla následně také vyizolována směs látek označovaná LEM, která je v současnosti využívána jako lék. Zkratka LEM je sestavena z počátečních písmen *Lentinus edodes mycelium* [4]. Směs je tvořena polysacharidy s proteiny a ligninem, tato směs byla podrobena několika studiím, přičemž pokusy na zvířatech ukázaly, že LEM vykazuje protinádorovou aktivitu u nádorů jater, došlo také k objevení pozitivního účinku při léčbě hepatitidy typu B, kde by LEM mohl sloužit jako podpůrný lék. Výrazná protinádorová aktivita byla potvrzena nejen na zvířatech, ale i na lidech, dalším objeveným účinkem bylo potlačení cytopatologických projevů viru HIV [15].

V sušeném prášku z houby shiitake nalezneme ve velkém množství deriváty nukleových kyselin, ergosterin a alkaloid eritadenin, jindy označovaný jako lenticinal [4,15]. Eritadenin je purinový alkaloid, chemicky jde o kyselinu (2R,3R)-dihydroxy-4(9-adenyl)-máselnou, u které jsou prokázány hypocholesterolemické účinky.

Testy na potkanech prokázaly, že eritadenin snižuje hladinu cholesterolu o 25 % po 7 dnech perorálního užívání v dávce 0,005 % příjmu krmiva. Další funkcí, kterou eritadenin disponuje,

je schopnost změnit profil mastných kyselin a molekulární profil jater a plazmy, a to tím způsobem, že potlačí metabolickou přeměnu kyseliny linolové na kyselinu arachidonovou [25].

Překvapivým zjištěním byl vliv vodného extraktu z hub shiitake na složení střevní mikroflóry, kdy došlo k podpoření probiotických bakterií konkrétně *Lactobacillus brevis* a *Bifidobacteria breve* [15].

Už z názvu houževnatce jedlého je zřejmé, že tato houba bude mít i bohaté kulinářské využití. Ne nadarmo se také nazývá perlou mezi houbami a v asijských zemích, zvláště v Číně a Japonsku, je nepostradatelnou složkou jídelníčku nejednoho člověka. Houževnatec jedlý má lahodnou chuť a silné houbové aroma, konzumují se čerstvé i sušené plodnice jak v syrovém, tak v upraveném stavu. Houby je možné grilovat, fritovat, udit, dále se běžně smaží, vaří nebo pečou. Je vhodné je přidávat do polévek, k zelenině nebo s nimi lze snadno dochutit maso [20].

2.5.3 Trsnatec lupenitý

Latinský název trsnatce lupenitého je *Grifola frondosa*, je možné se setkat i s mnoha dalšími názvy. Například s japonským názvem maitake, který lze přeložit jako tančící houba, nebo čínským názvem huaishuhua [20].

Podobně jako v případě lesklokorky a houževnatce i pro trsnatce je původním domovem Čína a oblast severovýchodního Japonska, kde se k přípravě pokrmů používá více než 3000 let. V současnosti roste roztroušeně po celé Evropě, v oblastech Severní Ameriky i východní Asii. Trsnatec neroste příliš hojně, najít ho můžeme pouze v rozpětí dvou měsíců, a to od konce srpna do října. Obvykle se vyskytuje po silnějších deštích na živých kmenech a kořenech nebo pařezech listnatých stromů, zejména na dubech a habrech, výjimečně na kaštanech, bucích nebo jasaněch [26]. Plodnice trsnatce mohou dorůstat do značně velikých rozměrů, trsy mohou mít hmotnost až 7 kg [15].

Plodnice trsnatce je jednoletá, vějířovitá, jazykovitá s mnoha kožovitými kloboučky vyrůstajícími z centrálního rozvětveného třeně [14]. Plodnice tvoří trsy o šířce 20–50 cm, vysoké 20–30 cm, které jsou utvořeny z polokruhovitých, jednostranných, lysých, ale vláknitých, masitých kloboučků popelavě šedé barvy s bílým okrajem vyrůstajících z hlavního rozvětveného třeně. Jednotlivé kloboučky jsou střechovitě uspořádány nad sebou a utvářejí tak trsovitý tvar. Na spodní straně kloboučků se nacházejí rourky dlouhé 2–4 cm, sbíhavé s hranatými bílými až krémově zbarvenými póry o velikosti 0,2–0,3 mm. Dužina je u starších plodnic bílá, vláknitá a tuhá [26]. Mladé plodnice mají dužinu pružnou a lehce masitou [15].



Obrázek 4 *Trsnatec lupenitý* [15]

Houba maitake (Obrázek 4) je dobrým zdrojem bílkovin, sacharidů, vlákniny, a je tak kvalitní nízkotučnou potravinou s obsahem tuku okolo 3,4 %. Obsahuje vitaminy B₁, B₂, B₃, ergosterol jakožto prekurzor vitamínu D₂, dále minerální látky jako draslík, železo, fosfor, sodík, vápník nebo hořčík [26,27]. Přestože v trsnatci lupenitém najdeme značné množství významných chemických sloučenin jako kumariny, flavonoidy, alkaloidy, steroidy nebo triterpeny, velká část pozornosti je věnována bioaktivním polysacharidům. Houba obecně obsahuje 33–47 % sacharidů, z monosacharidů se zde nachází glukóza, galaktóza, mannóza, fukóza nebo ribóza. Obsahuje také značný podíl rozpustné vlákniny ve formě β -(1,3)-glukanů, β -(1,6)-glukanů a také je bohatým zdrojem α -D-glukanů [28].

Dále jsou zde přítomny i heteroglukany, například xyloglukan, mannoxyloglukan, fukomannogalaktan a mannogalaktofukan [15].

Během studií provedených v posledních 30 letech bylo izolováno přes 47 bioaktivních frakcí polysacharidů získaných z trsnatce lupenitého [27]. Zejména jsou to MD-frakce, D-frakce, MZ-frakce, SX-frakce, Grifolans a další. V případě D-frakce a MD-frakce jde o polysacharidy vázané na protein [28].

D-frakce a MD-frakce jsou považovány za nejdůležitější bioaktivní polysacharidy, které jsou oficiálně používány jako protinádorové, protirakovinné a imunomodulační látky. Právě vysoká molekulová hmotnost D-frakce je považována za jeden z faktorů podporujících imunomodulační účinek této látky. Obě frakce mohou být extrahovány jak z plodnice, tak i mycelia trsnatce [27].

Studie prokázaly, že D-frakce aktivuje funkci makrofágů, dendritických buněk, NK buněk a T-lymfocytů, dále podporuje uvolňování mediátorů imunitní odpovědi jako lymfokinů a interleukinů. D-frakce na rozdíl od jiných polysacharidů s protinádorovými účinky vykazuje značnou výhodu v podávání látky pacientovi, lze ji podat perorálním, intravenózním i intraperitoneálním způsobem [27].

Klinické studie provedené na pacientech s pokročilou rakovinou přinesly zjištění, že kombinace D-frakce s chemoterapií byla prospěšná při léčbě rakoviny prsu, plic a jater, naopak méně účinná je proti leukémii, rakovině žaludku a kostí. Došlo ke zvýšení terapeutické odpovědi a ke snížení vedlejších účinků chemoterapie [29]. Další studie prokázaly schopnost D-frakce ovlivňovat nádorové buňky mléčné žlázy prostřednictvím modulace buněčných procesů během vývoje rakoviny [27].

MD-frakce získaná purifikací D-frakce přinesla v testech na myších lepší účinky než samotná D-frakce. MD-frakce vykazovala vyšší inhibiční účinek na růst nádoru u myši v případě perorálního podání.

Protinádorovou aktivitu vykazoval i polysacharid pojmenovaný GFP-A, který byl schopen inhibovat proliferaci buněk rakoviny tlustého střeva.

Z plodnic trsnatce lupenitého byly izolovány i bioaktivní proteiny a peptidy s průměrnou molekulovou hmotností 20–80 kDa. Lektin vyizolovaný z plodnice vykazoval cytotoxicitu vůči HeLa buňkám. Další izolovaný protein vykazoval významný účinek proti herpes simplex viru [27].

Trsnatec lupenitý není pouze významnou léčivou houbou, jde také o jedlou a chutnou houbu. Ke konzumaci se doporučují pouze mladé plodnice, staré jsou poměrně tuhé k přípravě. Houbu lze podávat v jakékoliv úpravě, nejčastěji se však povaří a nakrájená na plátky osmaží. V České republice je tento druh evidován jako ohrožený a uveden na Červeném seznamu hub a doporučen k ochraně [15].

2.5.4 Penízovka sametonohá

Penízovka sametonohá neboli *Flammulina velutipes*, známá též pod japonským názvem enokitake. Anglický název winter mushroom nám na rozdíl od českého, který popisuje vzhled houby, říká o období, které je typické pro výskyt této houby [20].

Penízovka je běžná houba severního mírného pásma, Evropy, Severní Ameriky, východní Asie, rozšířena je též v Jižní Americe, na Novém Zélandu a jižní Austrálii, do těchto oblastí byla nejspíše zavlečena. Penízovka se průmyslově produkuje především v Japonsku, Číně a Jižní Koreji. Dříve byla pěstována na špalcích a pařezích listnatých stromů, nyní je průmyslově pěstována v plastových lahvích z polypropylenu se širokým hrdlem o objemu 800–1000 ml nebo v sáčkách naplněných obohacenými sterilizovanými pilinami [3]. Volně roste poměrně hojně od října do dubna v trsech na pařezích, kmenech i větvích olší, buků, jilmů, vrb, výjimečně i jehličnanů [26].

Plodnice penízovky jsou veliké 1–3 cm a rostou v hustých trsech, typické jsou pro ně sametově hnědé třeni [4]. Klobouk plodnice narůstá do velikostí 20–60 mm a bývá polokulovitého tvaru, často je též vyklenutý až plochý, žlutě až oranžově hnědý s kaštanově hnědým středem. Klobouk bývá často hladký a slizký. Lupeny na spodní straně klobouku jsou krátce připojené nebo u třeně jemně vykrojené a zoubkem připojené, mají bělavou až světle žlutooranžovou barvu. Třeň je 3–8 cm dlouhý a 2–10 mm vysoký, válcovitý, často bočně stlačený, v horní části nažloutlý na bázi tmavohnědý až černohnědý [26,30]. Dužina je masitá, světle krémová až nažloutlá, bez výrazné chuti s nakyslou až příjemně houbovou vůní [20].



Obrázek 5 *Penízovka sametonohá* [15]

Penízovka (Obrázek 5) má pozitivní vliv na zdraví konzumenta, vykazuje protinádorovou, protirakovinnou, antihypertenzní a antiaterosklerotickou aktivitu. Napomáhá inhibici trombózy, snižování cholesterolu v krvi, působí proti stárnutí, stimuluje neurotransmitery spojené s pamětí a učením. V případě penízovky jsou potvrzené antioxidační, protizánětlivé, imunomodulační a antibakteriální účinky [31].

Penízovka obsahuje 58 % sacharidů, okolo 27 % bílkovin, 7 % tuku a 8 % popela. Analýzy popela ukázaly vysoký obsah draslíku a fosforu, dále penízovka obsahuje značné množství vápníku a hořčíku, naopak nižší obsah sodíku. Právě díky vysokému obsahu draslíku může penízovka napomáhat snižovat vysoký krevní tlak. Dále obsahuje stopové prvky jako železo, selen, zinek, mangan, lithium, měď a síru, které jsou důležitými prvky v naší stravě [32].

Bílkoviny jsou obecně jednou ze složek, které v jídelníčku často chybí, penízovka je svým obsahem bílkovin srovnatelná s různými druhy listové zeleniny, což z ní činí poměrně dobrý zdroj bílkovin. Aminokyseliny jsou stavebními kameny bílkovin, jsou v houbě hojně obsaženy zástupci jak esenciálních, tak i neesenciálních aminokyselin. Studie přinesly různé výsledky v detekovaných koncentracích volných aminokyselin, které jsou v penízovce obsaženy. Ze zástupců esenciálních aminokyselin byly zjištěny methionin, valin, izoleucin, leucin, lysin, fenylalanin a threonin. Z neesenciálních byly zaznamenány kyselina L-glutamoná, L-alanin, L-lysin, glycin, kyselina asparagová, která spolu s kyselinou glutamovou, přispívá k chuti

podobné glutamátu sodnému. Naopak alanin, glycin, threonin a serin poskytují houbám nasládlou chuť. Z plodnice enokitake byly vyizolovány fungální imunomodulační proteiny označené jako FID-fve a FID-gts, u kterých byla prokázána biologická aktivita jako imunomodulační schopnost nebo protirakovinná a prozánětlivá účinnost [31]. Tyto proteiny působí i v perorálním podání, dokáží stimulovat periferní krevní lymfocyty, a tím zajistit, aby docházelo k vylučování interferonů. V případě FID-fve proteinu byla zjištěna protirakovinná aktivita proti HeLa buňkám [15]. Flammin, velin, velutin a flammulin jsou další proteiny vyizolované z plodnice schopné inaktivovat ribozom [31]. U velutinu byla objevena schopnost potlačit reverzní transkriptázy viru HIV-1 [15].

Kromě těchto proteinů byl v myceliu objeven glykoproteinový enzym s protirakovinnou aktivitou označený jako proflamin [31]. Provedené pokusy na myších potvrdily protirakovinné a imunomodulační účinky proflaminu, který nejen prodloužil délku života myši s melanomem a adenokarcinomem, ale též přispěl k potlačení růstu sarkomu. Kromě látek s pozitivním účinkem houba obsahuje také cytolytický a kardiotoxický protein flammulotoxin [15].

Sacharidy zastupují více než polovinu suché hmotnosti houby. Jejich zastoupení je rozmanité, od monosacharidů jako ribóza, glukóza, xylóza, fukóza, galaktóza, fruktóza, přes disacharidy, a to sacharóza nebo trehalóza až po polysacharidy jako chitin, škrob a glukany [31].

Díky nízkému obsahu lipidů se houba enokitake řadí mezi nízkokalorické potraviny. V houbě najdeme jak mononenasyčené mastné kyseliny, tak i polynenasycené mastné kyseliny, přítomny jsou kyseliny stearová, palmitová, linolová a olejová [26,31]. Nejvíce zastoupenou je kyselina linolová, která je esenciální a slouží jako prekurzor pro biosyntézu zánětlivých mediátorů jako kyselina arachidonová a prostaglandiny. Houba enokitake tak reprezentuje kvalitní zdroj esenciálních mastných kyselin pro lidský organismus [31].

Za výraznými antioxidačními účinky stojí značné množství fenolových kyselin, tyto heterocyklické sloučeniny jsou známé právě pro svoji silnou antioxidační aktivitu. Z polyfenolických antioxidantů jsou zastoupeny například kyselina gallová, pyrogallol, kyselina homogestinová, kyselina 5-sulfosalicylová, kyselina chlorogenová, kyselina kávová, kyselina ferulová a kvercetin. Tyto látky jsou účinné při boji s oxidativním stresem a onemocněními, které způsobuje jako je rakovina, kardiovaskulární onemocnění nebo cukrovka [31].

Antimikrobiální aktivitu vykazovala penízovka proti *Bacillus subtilis* a *Staphylococcus aureus*, dokonce i antifungální aktivitu proti *Cladosporium herbarum*. Antimikrobiální a antifungální účinky jsou připisovány sekviterpenům cuparenového typu vyizolovaným z mycelia houby, které jsou označovány jako enokipodiny A–D [15].

Penízovka je dle spotřeby čtvrtou nejvíce celosvětově produkovanou houbou. Jde o poměrně chutnou houbu u nás známou jako vánoční houba, která se přidává do polévek, omáček, do zeleninových i masitých jídel, hodí se také k těstovinám, rybám nebo drůbeži. Do pokrmů jsou používány výhradně klobouky, třeně penízovky jsou poněkud tuhé [20].

2.5.5 Korálovec ježatý

Lví hříva nebo opičí hlava, i s takovým názvem je možné se setkat v případě korálovce ježatého. Latinský název pro tuto vzácnou houbu je *Hericium erinaceus*. Neméně známý je také jeho japonský název yamabushitake [20].

Produkční pěstování korálovce začalo teprve v 70. letech minulého století v Číně. Houba je rozšířena v Evropě, Severní Americe a Asii, především v Číně a Japonsku [26]. Nalézt korálovce ježatého na našem území je velmi vzácné a není proto divu, že patří mezi chráněné druhy [20]. Korálovec volně roste v období od června do listopadu, ale velmi řídce až vzácně. Obvykle je možné ho nalézt na živých kmenech listnáčů, jako buků a dubů, výjimečně jasanů, jabloní nebo ořešáků několik metrů nad zemí [15,26].

Plodnice korálovce ježatého dorůstají do šířky 30–80 mm, bývají kompaktní a nevětvené, mají kulovitý, vejčitý až ježovitý tvar. Mladé plodnice jsou bělavé barvy a postupným zasycháním ve stáří přechází do okrově hnědého zbarvení. Na přední a spodní straně se nacházejí převislé, šídlovité, ale křehké ostny dlouhé až 40 mm a široké 1,5–2 mm hustě namačkané u sebe [30]. Dužina je u mladých plodnic měkká, ale masitá, bělavá s malými dutinkami a příjemnou ovocnou vůní a chutí. U starých plodnic je dužina tuhá a v ostnech až nažloutlá [15].



Obrázek 6 Korálovec ježatý [15]

Hericium erinaceus (Obrázek 6) je po staletí užívána jako houba s léčivými účinky, byl prokázán její zdraví prospěšný vliv na činnost nervů a mozku. Díky obsahu neurotrofních sloučenin, látek, které jsou schopny procházet hematoencefalickou bariérou, je zkoumán její potenciál při léčbě neurologických poruch. Vedle těchto látek obsahuje i další biologicky aktivní látky, které lze získat extrakcí z plodnic nebo mycelia a byly potvrzeny jejich antioxidační, antidiabetické, protirakovinné, protizánětlivé, antimikrobiální, antihyperglykemické a hypolipidemické vlastnosti. Korálovec se používá také při léčbě kognitivních poruch, Alzheimerovy choroby, Parkinsonovy choroby, ischemické mozkové poruše. Probíhají také výzkumy zaměřené na antidepresivní účinky houby, kterou by tak bylo možné využít pro léčbu depresí [33].

Korálovec ježatý obsahuje polysacharidy, polypeptidy a velkou řadu sekundárních biologicky aktivních metabolitů jako erinaciny, hericeriny, steroidy, alkaloidy a laktony. Polysacharidy jsou bohatou složkou buněčné stěny hub. Celkové množství sacharidů v korálovci je poměrně vysoké, na každých 100 g sušené houby obsahuje v průměru 61,3–77,5 g celkových sacharidů. Přičemž největší pozornost je věnována polysacharidům jako jsou β -glukany, α -glukany a glukano-proteinovým komplexům [34]. Z plodnic korálovce bylo vyizolováno pět polysacharidů vykazujících protinádorovou aktivitu, jsou to například xylany, glukoxylany, heteroxyloglukany a galaktoxyloglukany. Dalšími vyizolovanými látkami byly ve vodě rozpustné polysacharidy, konkrétně β -(1→6)-glukan s molekulovou hmotností okolo 13 kDa, který je schopen aktivovat makrofágy při imunitní odpovědi.

Jiné pokusy objevily přítomnost polysacharidu pojmenovaného HEPF1, jde konkrétně o heteropolysacharid o molekulové hmotnosti 190 kDa, složený z jednotek fruktózy, galaktózy, glukózy a malým zastoupením 3-O-methyl ramnózy [35].

Hericenony jsou spolu s hericeny, epinapyronem a erinaciny nízkomolekulové látky vyizolované z korálovce ježatého. Hericenony jsou aromatické látky extrahované z plodnice houby, v současnosti je identifikováno 11 typů [35]. Hericenony jsou bioaktivní látky schopné stimulovat biosyntézu nervového růstového faktoru a mohou tak mít pozitivní vliv na průběh Alzheimerovy choroby [34]. Erinaciny patří do skupiny cyathionových diterpenoidů, vyizolovaných z mycelia houby. Tyto látky vykazují podobnou biologickou aktivitu jako hericenony, jsou schopné stimulovat biosyntézu nervového růstového faktoru [35]. Bylo identifikováno 15 erinacinů, kdy podrobnější výzkumy u osmi z nich prokázaly neuroprotektivní vlastnosti. Tyto erinaciny mohou vyvolat uvolnění nervového růstového faktoru, umí snižovat ukládání amyloidu- β nebo zvyšovat expresi enzymu degradujícího inzulin či mohou pomoci zvládat neuropatickou bolest [36].

Další výzkumy přinesly zjištění, že extrakty z korálovce ježatého vylepšují myelinizační proces v myelinových obalech nervů. V případě vodných extraktů byl potvrzen vliv korálovce i na podporu hojení ran [15].

Korálovec je jedlou chutnou houbou, mladé plodnice jsou chutné s jemnou nahořklou chutí připomínající lilek [20]. Kvůli kulinářskému prožitku houbu ale nesbíráme, je evidována na Červeném seznamu hub ČR jako ohrožená. Pro vlastní užívání lze koupit násadu a houbu si uměle vypěstovat doma [15].

2.5.6 Hlíva ústříčná

Hlíva ústříčná neboli *Pleurotus ostreatus* (Obrázek 7), známá též pod anglickým názvem oyster mushroom nebo japonským názvem hiritake [20].

První zmínky o léčivém zázraku v podobě hlívy pocházejí již z doby před naším letopočtem z Číny, kde tuto houbu uctívali jako tzv. božský květ. Znalost léčivých účinků této houby není pouze záležitost Číny, povědomí o jejích blahodárných benefitech se tradovalo i v zemích střední Evropy, Jižní Ameriky nebo Afriky [26]. Čína se však stala největším světovým producentem hlívy ústříčné [20]. Hlíva ústříčná je saproparazit, hojně rostoucí v období od října do prosince jak na živých, tak i na odumřelých kmenech listnatých stromů, buků, ořešáků, jírovců, topolů a vrb. Roste v trsech s plodnicemi střečovitě uskupenými nad sebou. Lze ji snadno objevit v zahrádkách, sadech či městských parcích [26].

Klobouk plodnice bývá jazykovitý až lasturovitý, bokem přirostlý nebo protažený v krátký třeň. Klobouky jsou bochníkovité s podvinutým okrajem, široké 40–200 mm a obvykle jsou popelavě šedé až modrošedé barvy místy s lehkým fialovým nádechem. Pokožka klobouku je hladká a lysá, lupeny na spodní straně jsou sbíhavé, bílé až šedé barvy [30]. Třeň je dlouhý 1–4 cm, široký až 2 cm, bělavý až světle šedé barvy. U mladých plodnic je dužina měkká, pružně masitá, starší plodnice jsou tuhé místy až dřevnaté. Dužina má bělavou barvu a jemnou nakyslou chuť i vůni [20].



Obrázek 7 *Hlíva ústřičná* [12]

Provedené analýzy zjistily obsah základních nutričních látek v hlívě, obsah sacharidů byl zjištěn okolo 36–60 %, bílkovin 11–42 % a lipidů v rozmezí 0,2–8 %. Díky vysokému podílu bílkovin se hlíva ústřičná řadí mezi potraviny bohaté na bílkoviny a může i zlehka konkurovat masu nebo mléku, a to díky vysokému obsahu aminokyselin, konkrétně esenciálních aminokyselin, kterých v hlívě nalezneme hned všech osm, které jsou pro lidskou výživu nezbytné. Hlíva je také velmi kvalitním zdroje vlákniny, její buněčná stěna je bohatá na chitin a polysacharidy, které mají prokázané pozitivní účinky na zdraví konzumenta. Vedle těchto látek jsou v hlívě obsaženy také vitaminy jako B₁, B₂, B₃, B₉, C, ergosterin jako prekurzor vitamínu D a minerální látky ve formě makro i mikroprvků, jako draslík, hořčík, sodík, vápník, jód, bor, fosfor, železo, selen, zinek, měď nebo mangan [37]. Hlíva ústřičná obsahuje lipidy ve všech formách, volné mastné kyseliny, mono, di a triglyceridy, steroly, estery sterolů i fosfolipidy. Lipidy přijímané z hub jsou pro člověka nejlepší možnou variantou, protože představují nejmenší riziko pro ucpání cév. Z mastných kyselin jsou zastoupeny jak mono i polynenasycené mastné kyseliny, jako například kyselina linolová nebo olejová.

Ze zástupců nasycených mastných kyselin najdeme v hlívě například kyselinu pentadekanovou, palmitovou nebo stearovou [38].

Polysacharidy spolu s chitinem v houbách představují hlavní živiny. Díky bohatému obsahu vlákniny je hlíva vhodnou nízkokalorickou potravinou pro osoby s diabetem, pro pacienty trpící alimentárními vředy nebo pro jedince ke snížení obezity [38]. V hlívě se nachází polysacharidy konkrétně ve formě β -(1 $\rightarrow$ 3)-D-glukanů a mannanů. Extrakcí byly z houby získány různé druhy izolátů glukanů, např. pleuran, u kterého byl objeven protizánětlivý účinek při experimentálních testech na myších. Při experimentech na lidských subjektech byl potvrzen pozitivní vliv na imunitu, obzvláště v případě lehkých infekcí. U dalšího vyizolovaného polysacharidu složeného z jednotek glukózy a galaktózy byla prokázána schopnost stimulovat makrofágy, splenocyty a thymocyty při imunitní odpovědi. Podobné vlastnosti se projevíly i u heteropolysacharidu, u nějž byly zjištěny i protinádorové účinky. Výzkumy prokázaly, že konzumací hlívy lze předcházet tvorbě a výskytu nádorů tlustého střeva [15].

Plodnice hlívy ústříčné obsahují statiny, látky schopné snižovat hladinu cholesterolu. Lovastatin je látka se schopností selektivně inhibovat syntézu cholesterolu, v roce 1987 byl schválen jako léčivo k redukci cholesterolu v krvi. Lovastatin by mohl být nápomocný při onemocněních jako osteoporóza, artritida, ischemie nebo při ztuhnutí jater. Lovastatin dále ukazuje své široké pole působnosti, kdy byly prokázány protirakovinné vlastnosti, potlačuje buněčné dělení a zvyšuje aktivitu buněčného cyklu. Pomáhá předcházet metastázám, a proto je podáván při radioterapiích a chemoterapiích. Byl prokázán i jeho antifungální účinek proti *Rhodotorula rubra*, *Mucor recemosus* i *Candida albicans* [39].

V hlívě ústříčné byl dále objeven ergosterol s antimikrobiální a protirakovinovou aktivitou, dále lektiny, látky projevující antibiotické, antimykotické a protirakovinové účinky [15].

2.6 Negativní účinky hub

Vždy je dobré mít na mysli, že i když houby obsahují nespočet zdraví prospěšných látek, může se stát, že některé budou mít naopak negativní efekt. Houby mohou u některých lidí vyvolávat alergické reakce, které nemusí způsobit pouze plodnice, ale i mycelium či výtrusy. Dalším problémem je výskyt toxinů, které jsou při nesprávné úpravě a požití houby až smrtelné. Houby mají schopnost kumulovat do svých plodnic a mycelií látky nacházející se v jejich vnějším okolí, mezi takové látky patří například i těžké kovy jako olovo, rtuť nebo kadmium, jejichž přítomnost v lidském těle může vážně ohrozit zdraví jedince [20].

Za další látku negativně ovlivňující zdraví konzumenta hub byl označen agaritin, který se běžně vyskytuje v plodnicích žampionu. Agaritin by měl vykazovat karcinogenní účinky, tento fakt ale výzkumy nepotvrdily. Tato látka tepelným zákrokem degraduje, proto je doporučováno nekonzumovat žampiony a obecně všechny houby v syrovém stavu, ale tepelně upravené [4].

Negativní účinky hub mohou být vyvolány i v kombinaci s jinými nesprávnými potravinami či nápoji. Nešťastnou volbou je kombinace hub s alkoholem, kdy některé druhy hub obsahují ve svých plodnicích látku zvanou coprin, která v těle člověka blokuje enzym odbourávající alkohol. Při kombinaci těchto dvou látek může dojít k silnými otravám [20].

2.7 Houby v potravinářském průmyslu

Houby se v potravinářském průmyslu používají od nepaměti. Již staří Sumerané před více než 3 000 lety před naším letopočtem věděli, že kvašením šťávy z hroznů získají alkoholický nápoj ve formě vína, nejspíše ale nevěděli fakt, že se za tímto procesem schovává právě kvasinka. Pomocí mikroskopických hub lze vyrábět i další suroviny zcela klíčové pro potravinářský průmysl, například ethanol, kyselinu citronovou, mléčnou a mnohé další. Novější výzkumy se soustředí na přípravu potravin z mikroskopických vláknitých hub, která bude bohatá na bílkoviny a lze ji tak použít jako náhražku masa, jde o tzv. mykoprotein [26].

Pokud jde o makromycety, v potravinářském průmyslu se s nimi můžeme setkat ve třech podobách, v čerstvém nebo sušeném stavu, konzervované nebo zpracované na produkty. Čerstvé houby slouží k přímé spotřebě, mají krátkou dobu trvanlivosti, a proto je běžné se s nimi setkat spíše na lokálních trzích se zelinou. Sušené houby se využívají pro výrobu instantních polévek a omáček. Časté je také pomletí sušených hub za účelem získat houbový prášek, který má velké využití v potravinářství. Díky vysokému obsahu bílkovin se využívá jako komponenta pro vylepšení nutričních vlastností jiných potravinářských výrobků. Houbový prášek je proto často přidáván do nudlí, těstovin, rýžových kaší nebo do pekařských výrobků,

kde zvyšuje v daných potravinách obsah bílkovin, napomáhá k lepší elasticitě potravinářských výrobků a pomáhá vytvořit kompaktní lepkavou strukturu v těstovinách a nudlích. Studie o aplikaci hub do potravinářských výrobků přinesly zajímavé poznatky, například přidání prášku z žampionů do masových kuliček cílí nejen na zvýšení bílkovin ve výrobku, ale také na vyšší obsah železa, zinku, selenu, draslíku a vitaminů. Houby masu dodávají také jemnou aromatickou chuť. Předpokládá se, že prášek z hub by mohl snížit výskyt kardiovaskulárních onemocnění, rakoviny, obezity, které jsou spojené s nadměrnou konzumací masných výrobků [40].

2.8 Technologické zpracování hub do práškové formy

Houby jsou do jisté míry sezónní potravinou, i když na světě existuje mnoho velkokapacitních pěstíren, které produkují tuny čerstvých hub denně, některé druhy je takto pěstovat nemožné. Pro uchování hub je tedy dalším krokem jejich technologické zpracování. To lze provést hned několika způsoby termickou úpravou, chemickým ošetřením nebo za použití fyzikálních procesů.

Sušení je nejčastější metodou konzervace hub. Cílem je snížit obsah vody za účelem zabránění mikrobiální kontaminace. V běžné praxi se používá řada sušících technik jako je sušení přirozeným vzduchem, solární sušení, lyofilizace, horkovzdušné sušení, vakuové sušení, sušení mikrovlnným ohřevem nebo kombinace více metod. Sušením houby získají intenzivnější chuť oproti houbám čerstvým, naopak bioaktivní látky a živiny se mohou procesem sušení měnit. Sušení má zejména největší vliv na obsah vitamínu D₂ a vitamínu B₁₂ [41,43].

Dřívější technologický postup výroby prášků z hub byl založen na lyofilizaci a následném pomletí lyofilizovaného materiálu. Inovativní technologický postup pro vytvoření prášku z hub je metoda “shell broken“, která rozláme tvrdé skořápky spor za účelem snadné absorpce živin a bioaktivních látek. Metoda je založena na namočení čerstvého prášku spor, jeho odstředění a následné chlazení při ultra nízkých teplotách. Těmito kroky získáme mokré prášek spor s prasklými skořápkami, který je za použití mikrovlnného ohřevu rozmrazen a je tak získán suchý prášek z rozlámaných skořápek spor. Tento proces pomáhá při uvolňování polysacharidů během zpracování. Výsledný prášek z houby reishi není zdrojem nečistot a je pro lidské tělo mnohem lépe vstřebatelný [43].

2.9 Testování toxicity *in vitro*

Testování *in vitro* je často používáno pro screening a klasifikaci chemikálií, při zkoumání nových léčiv, ve zdravotnictví, v kosmetice nebo při posuzování toxicity či alergenního potenciálu potravin. Pomocí *in vitro* metod stanovení toxicity lze zkoumat přírodní složky využívané při výrobě potravin, povolené chemikálie, přísady, rezidua nebo působení chemikálií z obalových materiálů či jiné kontaminanty [44].

K testování *in vitro* se používají primární buňky, imortalizované buněčné linie nebo kmenové buňky. Nevýhodou primárních buněk je, že špatně rostou, proto je mnohem častější volbou použití buněčných linií, které pocházejí buď z imortalizovaných primárních buněk, nebo jsou získány z nádorů. U buněčných linií jsou narušeny buněčné procesy, což tyto buněčné linie činí méně geneticky stabilní a rychlá schopnost růstu může být příčinou kontaminace. Nejznámější a nejlépe popsanou buněčnou linií jsou HeLa buňky, izolované z karcinomu děložního čípku. Kmenové buňky díky své genetické stabilitě a schopnosti provádět hlavní buněčné procesy jsou nejlepší volbou při testování zdravotnických materiálů a toxicity léčiv [45].

Caco-2 je lidská epiteliální buněčná linie odvozená z karcinomu tlustého střeva. Jednou z jejích vlastností je schopnost spontánně se diferencovat do monovrstvy buněk s mnoha vlastnostmi typickými pro absorpční enterocyty s kartáčkovým lemem, které se nacházejí v tenkém střevě. Použití Caco-2 představuje spolehlivý způsob pro testování absorpce léčiv a dalších sloučenin po perorálním podání u lidí. Díky své jednoduchosti a reprodukovatelnosti umožňují mezilaboratorní srovnání výsledků. Caco-2 se využívá také v rámci testování cytotoxicity, což umožňuje sledování účinku bioaktivní látky v modelu buněčné linie a otevírá studie molekulárních mechanismů, které mohou být obtížněji řešitelné *in vivo* [46].

Buněčná linie HaCaT je imortalizovaná linie lidských keratinocytů. Díky své dlouhé životnosti a snadné kultivaci *in vitro* jsou HaCaT buňky vhodným modelem pro testování cytotoxicity. Nejčastěji se využívají při testování cytotoxicity různých látek, včetně kosmetických produktů, léčiv a chemoterapeutik. Použití HaCaT při testech cytotoxicity umožňuje posoudit potenciální negativní vliv látek na kožní buňky a také studovat molekulární mechanismy odpovědné za cytotoxický účinek. Další výhodou je schopnost diferencovat *in vitro*, která umožňuje sledování uvolňování zánětlivých a reparačních mediátorů v reakci na testované látky [47].

2.10 Testy cytotoxicity

Testy cytotoxicity jsou nejzákladnější typy testů provedených *in vitro*. Tyto testy jsou používány pro stanovení viability buněk. Hodnotí poškození buňky vedoucí k buněčné smrti, vliv na buněčnou proliferaci i jiné subletální účinky, které negativně ovlivňují buňky jako například oxidační stres.

Testy cytotoxicity se používají pro testování léčiv, bezpečnost potravin, kosmetiky a mnohé další. Zkoumají, zda testované sloučeniny neovlivňují proliferaci buněk nebo nevykazují cytotoxické účinky. Existuje nespočet metod, jak stanovit životaschopnost buněk, jsou to například metody založené na vylučování barviva, kolorimetrické testy, fluorometrické testy nebo luminometrické testy [48,49].

2.10.1 MTT test

MTT test je nejuniverzálnější a nejoblíbenější kolorimetrický test ke zjištění viability buněk. Pracuje na principu redukce žlutého ve vodě rozpustného tetrazoliového barviva MTT neboli 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromid, které je působením NAHD redukováno na nerozpustný purpurový formazan, který se ve formě krystalů hromadí v buňce [50]. Před odečtením hodnot absorbancí při vlnové délce 570 nm je nutné rozpustit krystaly, např. pomocí DMSO, SDS nebo DMF. Při vyhodnocení testu platí, že čím tmavšího fialového až modrofialového zbarvení bylo dosaženo, tím více je metabolicky aktivních buněk [51].

Tento test se provádí pro adherentní i neadherentní buňky, zpravidla na standardních 96jamkových destičkách, kdy do jedné jamky přijde 500–10 000 buněk. Tato metoda je bezpečná, snadno reprodukovatelná a lze ji použít jak pro stanovení viability buněk, tak i pro testování cytotoxicity [48].

2.10.2 LDH test

Test LDH je běžnou kolorimetrickou metodou používanou pro zjištění buněčné cytotoxicity. Princip je založen na měření aktivity cytoplazmatického enzymu, který je uvolňován při poškození buňky. Laktátdehydrogenáza (LDH) se vyskytuje v cytoplazmě buněk, dojde-li k poškození plazmatické membrány, LDH je uvolňováno do média buněčné kultury [52].

Enzymovou reakcí, při které dochází k přeměně jedнитrotetrazolinu na červený formazan za pomoci katalyzátoru diaforázy, lze stanovit uvolněný LDH. Červený formazan absorbuje při vlnové délce 492 nm, kterou lze snadno spektroskopicky měřit. Stanovené množství formazanu je přímo úměrné s obsahem LDH v médiu kultury, to odpovídá počtu poškozených nebo mrtvých buněk. [48]

2.10.3 AlamarBlue test

AlamarBlue test neboli test redukce resazurinu je fluorometrický test založený na enzymatické nevratné reakci, jde o redukci modrého resazurinu na růžový resorufin. Resazurin je fenoxyzin-3-onové barvivo, které snadno prochází buněčnou stěnou a není pro ni toxické. Po vstupu resazurinu do buněk dochází k redukci na sytě růžový resorufin, který je vysoce fluorescenční. Viabilní buňky nepřetržitě redukují resazurin, tím dochází k čím dál vyšší produkci resorufinu, a tím zvyšují fluorescenci a přeměňují také barvu kultivačního média. Čím více vyprodukovaného resorufinu, tím je větší počet životaschopných buněk [48,53].

3 CÍL PRÁCE

V rámci diplomové práce budou řešeny následující dílčí cíle:

1. Literární rešerše zaměřená na vzácné druhy hub v potravinářství, farmacii (reishi, hlíva apod.), jejich složení a účinky.
2. Optimalizace metod stanovení nutričně významných látek v houbách.
3. Stanovení biologických účinků extraktů z hub a interakce s živými buňkami.
4. Možnost aplikace extraktu z hub do potravinových doplňků.

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Použité chemikálie pro analýzy

ABTS (2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzeno-thiazoline-6-sulfonic acid)), Sigma-Aldrich (USA)
D-glukóza monohydrát, Penta (CZE)
Ethanol, Lach:Ner (CZE)
Ethanol pro UV/VIS, Penta (CZE)
Folin-Ciualtovo činidlo, VWR Chemicals (FRA)
Hydroxid sodný, Lach:Ner (CZE)
Chloroform, Penta (CZE)
Kyselina chlorovodíková, Lach:Ner (CZE)
Kyselina gallová, Sigma-Aldrich (DEU)
Kyselina octová, Lach:Ner (CZE)
Kyselina sírová, Lach:Ner (CZE)
Methanol, Honeywell (FRA)
Peroxodisíran draselný, Sigma-Aldrich (DEU)
Resazurin sodium salt, Sigma-Aldrich (USA)
Trolox (6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethyl-chromane-2-carboxylic acid), Sigma-Aldrich (CHE)
Uhličitan sodný bezvodý, Penta (CZE)

4.2 Použité komerční kity

Human IL-6 ELISA Kit, Invitrogen, ThermoFisher Scientific (AUT)
IL-8 Human ELISA Kit, Invitrogen, ThermoFisher Scientific (AUT)
 β -Glukan Assay Kit (Yeast and Mushroom), K-YBGL, Megazyme (IRL)

4.3 Použité chemikálie pro kultivace

BHI médium, Himedia (IND)
Nutrient Broth médium, Himedia (IND)
LB médium, Sigma-Aldrich (USA)

4.4 Použité chemikálie pro buněčné linie

Antibiotic-antimycotic 100X. Biosera (DEU)
2,4-dinitrofenylhydrazin, Sigma-Aldrich (DEU)
Dodecylsírán sodný, VWR (UK)
DMEM médium, Biowest (USA)
FBS Fetální bovinní sérum, Biowest (USA)

MEM non Essential Amino Acids 100X, Biowest (USA)
MEM médium s Earle's Salts a L-Glutaminem , Biowest (USA)
MTT (Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide, VWR (USA)
NADH, VWR (USA)
Pyruvát sodný, VWR (USA)
Resazurin sodium salt, Sigma-Aldrich (USA)
Trypsin, WVR (USA)
Trypanová modř, Sigma-Aldrich (UK)

4.5 Použité přístroje a laboratorní pomůcky

Analytické váhy, Boeco (DEU)
Automatické pipety o různém objemu
Běžné laboratorní pomůcky a laboratorní sklo
CellCulture CO₂ Inkubátor, ESCO (DEU)
Centrifuga Boeco U-32R, Hettich Zentrifugen (DEU)
ELISA reader BioTek ELx808, Biotek (DEU)
HPLC sestava UltiMate 3000 s UV/VIS detektorem – Thermo Fisher Scientific (USA)
Inverzní biologický mikroskop I-101 L-scientific, Laboserv (CZE)
Vodní lázeň. P-LAB (CZE)
Laminární box Aura mini, BioAir (ITA)
Magnetická míchačka, Lavat (CZE)
Předvážky OHAUS, ScoutPro (USA)
Spektrofotometr, Helios δ , Unicam (UK)
Temperovaná třepačka Unimax 1010, Heidolph (DEU)
Vortex, Vitrum (DEU)

4.6 Použité mikroorganismy

Pro provedení antimikrobiálního testu byly použity čtyři modelové organismy *Escherichia coli* CCM 7395, *Micrococcus luteus* CCM 1569, *Serratia marcescens* CCM 8587 a *Staphylococcus epidermidis* CMM 4418. Všechny použité mikroorganismy byly získány z České sbírky mikroorganismů Masarykovy univerzity v Brně.

4.7 Použité buněčné linie

Pro *in vitro* testování cytotoxicity byly vybrány dvě adherentní buněčné linie. Buněčná linie lidského kolorektálního karcinomu, CaCo-2, a imortalizovaná keratinocytová buněčná linie HaCaT. HaCaT linie pochází z CLS (Cell Line Services, Německo) a buněčná linie CaCo-2 z ATCC (American Type Culture Collection, USA).

4.8 Použité vzorky hub

V experimentální práci byly použity dva vzorky houby lesklokorky lesklé a dva vzorky korálovce ježatého zakoupené od MycoMedica (Česká republika). V případě vzorku BRP (Bio Reishi Pulvere) jde o usušenou bio houbu reishi pomletou na jemný prášek. Jako druhý vzorek RTP (Reishi Triterpen Extrakt) byl použit extrakt houby reishi v práškové podobě. Vzorek HE (Heridium) korálovce ježatého byl použit ve formě pomletého prášku z plodnice. Druhý vzorek korálovce ježatého HE 50 (Heridium 50), s o 50 % vyšším obsahem polysacharidů a o 20 % vyšším obsahem β -glukanů, byl také použit v práškové formě.

4.9 Příprava vodných extraktů

Ze vzorků houby reishi byly připraveny dvě sady vodných extraktů. Toto extrahovací a kroky extrakce byly vybrány pro vysokou účinnost a snadnou přípravu. První sada byla připravena 24hodinovou extrakcí, kdy 1 g houbového prášku byl rozpuštěn v 10 ml destilované vody a ponechán 24 hodin třepat na třepačce. V druhém případě byl 1 g houbového prášku zalit 10 ml vroucí vody a ponechán louhovat do zchladnutí na laboratorní teplotu. Následně byly vzorky zcentrifugovány po dobu 5 minut při 5 000 ot./min. a supernatant byl použit pro jednotlivé analýzy. Na základě průběžných výsledků byly ze vzorků korálovce ježatého připraveny pouze 24hodinové vodné extrakty.

4.10 Spektrofotometrické analýzy

Za účelem charakterizace vybraných druhů hub byly připravené extrakty podrobeny následujícím spektrofotometrickým metodám. Vzorky byly charakterizovány z hlediska celkového obsahu sacharidů, obsahu redukujících sacharidů, obsahu celkových fenolických látek a antioxidační účinnosti.

4.10.1 Stanovení celkových sacharidů dle Duboise

Pro toto stanovení byl vždy pipetován 1 ml analyzovaného vzorku do suchých čistých zkumavek. Ke vzorku byl přidán 1 ml 5% roztoku fenolu a 5 ml koncentrované kyseliny sírové. Zkumavky byly promíchány pomocí přístroje Vortex a inkubovány 30 minut při laboratorní teplotě. Po uplynutí inkubační doby byla změřena výsledná absorbance vzniklých roztoků

při vlnové délce 490 nm oproti blanku. Blank tvořil 1 ml destilované vody, zbylý postup byl stejný jako při přípravě analyzovaných vzorků. Každý vzorek byl analyzován celkem ve třech opakováních, ze získaných hodnot absorbancí byl vypočten průměr a směrodatná odchylka.

Pro sestavení kalibrační křivky byla připravena kalibrační řada roztoků v rozmezí koncentrací 0,02–0,1 mg/ml ze standardního roztoku D-glukózy o koncentraci 0,1 mg/ml. Výsledná koncentrace sacharidů v analyzovaných vzorcích byla vypočtena z rovnice kalibrační křivky $A_{490} = 8,5718 \cdot c$ s korelačním koeficientem $R^2 = 0,9827$.

4.10.2 Stanovení redukujících sacharidů metodou Nelson-Somogyi

Vždy 1 ml vzorku byl napipetován do suché čisté zkumavky. Ke vzorku byl následně přidán 1 ml Somogyiho činidla připraveného smícháním roztoku I a II v poměru 4:1 těsně před stanovením. Po promíchání byly zkumavky se vzorky umístěny do vroucí vodní lázně po dobu 15 minut. Pomocí tekoucí vody byly vzorky ochlazeny na laboratorní teplotu, poté byly přidány 2 ml Nelsonova činidla a obsah zkumavek byl důkladně promíchán. Po dvouminutové inkubaci při laboratorní teplotě byly zkumavky doplněny na výsledný objem 10 ml a důkladně promíchány pomocí přístroje Vortex. Výsledná absorbance vzorků byla měřena při 540 nm proti blanku, který byl připraven stejným postupem, ale místo 1 ml vzorku obsahoval 1 ml destilované vody. Všechny vzorky byly analyzovány v triplicátech. Z naměřených hodnot absorbancí byl vypočten průměr a směrodatná odchylka.

Pomocí standardního roztoku D-glukózy byla zhotovena kalibrační řada roztoků v rozmezí koncentrací 0,02–0,1 mg/ml. Výsledné množství redukujících sacharidů bylo vypočteno z rovnice kalibrační křivky $A_{540} = 10,4431 \cdot c$ s korelačním koeficientem $R^2 = 0,9987$.

- **Somogyiho roztok I**

Ve 100 ml destilované vody bylo rozpuštěno 12 g uhličitanu sodného, 8 g hydrogenuhličitanu sodného a 6 g vínanu sodno-draselného. Ve 300 ml destilované vody bylo rozpuštěno 72 g síranu sodného. Vzniklé roztoky byly vzájemně smíseny.

- **Somogyiho roztok II**

Ve 200 ml destilované vody bylo rozpuštěno 24 g síranu sodného a 4 g pentahydrátu síranu měďnatého.

- **Nelsonovo činidlo**

Ve 450 ml destilované vody bylo rozpuštěno 25 g molybdenanu amonného. Do vzniklého roztoku bylo přidáno 21 ml koncentrované kyseliny sírové.

3 g heptahydrátu arseničnanu sodného byly rozpuštěny v 25 ml destilované vody. Roztoky byly smíchány a vzniklý roztok byl ponechán 48 hodin ve tmě.

4.10.3 Stanovení bílkovin metodou Biureta

K 1 ml analyzovaného vzorku byly přidány 2 ml fyziologického roztoku a 0,3 ml Biuretova činidla. Vzorky byly ponechány k inkubaci po dobu 30 minut při laboratorní teplotě a následně byla změřena jejich výsledná absorbance při vlnové délce 550 nm proti blanku, který byl připraven stejným postupem jako vzorky, ale byl použit 1 ml destilované vody. Všechny vzorky byly analyzovány ve třech paralelních opakováních. Z naměřených hodnot absorbancí byl vypočten průměr a směrodatná odchylka.

Pro kalibraci byl použit standardní bílkovinný roztok hovězího albuminu o koncentraci 3 mg/ml a byla sestavena kalibrační řada v rozmezí koncentrací 500–3000 µg/ml. Zkumavky byly doplněny fyziologickým roztokem na výsledný objem 3 ml a následně bylo přidáno 0,3 ml Biuretova činidla. Následující postup byl stejný jako v případě analyzovaných vzorků. Výsledné množství bílkovin bylo vypočteno z rovnice kalibrační křivky $A_{550} = 0,2308 \cdot c$ s korelačním koeficientem $R^2 = 0,9977$, získané sestrojením grafu kalibrační závislosti absorbance na koncentraci bílkovinného standardu.

4.10.4 Stanovení celkového obsahu fenolických látek

Do zkumavky bylo napipetováno 50 µl vzorku, ke kterému byl přidán 1 ml destilované vody a 1 ml směsi Folin-Ciocalteuova činidla s destilovanou vodou v poměru 1:9. Vzniklá směs byla promíchána a nechána inkubovat 5 minut při laboratorní teplotě, po uplynutí inkubace byl přidán 1 ml nasyceného roztoku uhličitanu sodného. Zkumavky byly promíchány pomocí přístroje Vortex a nechány 15 minut inkubovat při laboratorní teplotě. Následně byla změřena výsledná absorbance neznámých vzorků při vlnové délce 750 nm oproti blanku. Blank byl připraven stejným postupem jako analyzované vzorky s rozdílem prvního kroku, kdy bylo použito 50 µl destilované vody. Všechny neznámé vzorky byly analyzovány ve třech opakováních, ze zjištěných hodnot byl vypočten průměr a směrodatná odchylka.

Pro zhotovení kalibrační závislosti byla sestavena kalibrační řada roztoků v rozmezí koncentrací 0,1–0,7 mg/ml ze standardního roztoku kyseliny gallové o koncentraci 1 mg/ml. Výsledná koncentrace celkových fenolických látek byla vypočtena z rovnice kalibrační křivky $A_{750} = 1,5209 \cdot c$ s korelačním koeficientem $R^2 = 0,9996$.

4.10.5 Stanovení antioxidační aktivity

Nejprve byl připraven roztok ABTS rozpuštěním látky ABTS v destilované vodě o koncentraci 7 mM. Pro získání radikálového kationtu z ABTS byl přidán 2,45mM peroxodisíran draselný. Vzniklý roztok byl ponechán nejméně 12 hodin ve tmě. Před měřením byl roztok ABTS^{•+} upraven ethanolem pro UV/VIS na absorbanci $0,70 \pm 0,02$. Absorbance byla měřena proti ethanolu pro UV/VIS při vlnové délce 734 nm.

Do zkumavek bylo napipetováno 10 μ l analyzovaných vzorků, ke kterým byl přidán 1 ml roztoku ABTS^{•+}. Zkumavky byly ponechány 10 minut ve tmě a následně byl zaznamenán úbytek absorbance v čase 10, tzn. A_{10} . Všechny vzorky byly analyzovány ve třech paralelních stanoveních. Z naměřených hodnot absorbancí byl vypočten průměr a směrodatná odchylka. V počátečním čase, tedy A_0 , byl měřen blank, který představoval 10 μ l destilované vody a 1 ml roztoku ABTS^{•+}.

Pro kalibraci byl použit standardní roztok Troloxu o koncentraci 1 mg/ml, který byl připraven rozpuštěním Troloxu v 60% ethanolu. Kalibrační řada byla sestavena v rozmezí koncentrací 50–400 μ g/ml a byla měřena stejným způsobem jako neznámé vzorky. Výsledná absorbance jednotlivých vzorků byla zjištěna z rozdílu hodnot počáteční absorbance A_0 a absorbance naměřené po 10 minutách ve tmě A_{10} . Z rovnice kalibrační křivky $A = 0,0012 \cdot c$ s korelačním koeficientem $R^2 = 0,9982$ byla následně vypočtena antioxidační aktivita jednotlivých vzorků.

4.11 Stanovení obsahu β -glukanů pomocí kitu Megazyme

Pro stanovení celkových glukanů, β - a α -glukanů byl využit komerčně dostupný Yeast and Mushroom β -glukan kit od firmy Megazyme (Irsko). Dle přiloženého návodu byly nachystány potřebné roztoky [54].

4.11.1 Stanovení celkových glukanů

1. Do uzavíratelných reakčních zkumavek bylo naváženo přibližně 90 mg vzorku a následně přidány 2 ml 12 M ledové kyseliny sírové. Vzorky byly promíchány pomocí přístroje Vortex a vloženy do lázně s ledem na dobu 2 hodin. V průběhu inkubace byly vzorky několikrát promíchány pro úplné rozpuštění β -glukanů.
2. Ke každému vzorku byly přidány 4 ml destilované vody a vzorky byly homogenizovány po dobu 10 s na přístroji Vortex. Poté bylo do každé zkumavky napipetováno 6 ml destilované vody a vzorky byly opět promíchány po dobu 10 s za pomoci přístroje Vortex.

3. Otevřené zkumavky byly umístěny do vroucí vodné lázně a inkubovány po dobu 2 hodin. Po uplynutí 5 minut byly zkumavky opět uzavřeny zátkami.
4. Po ochlazení zkumavek na pokojovou teplotu byly opatrně uvolněny uzávěry zkumavek.
5. Obsah každé zkumavky byl kvantitativně převeden do odměrné baňky o objemu 100 ml za pomoci 200 mM acetátového pufru s pH=4,5.
6. Následně bylo do každé odměrné baňky přidáno 6 ml 8,0 M roztoku NaOH a odměrné baňky byly doplněny 200 mM acetátovým pufrem s pH=4,5 po rysku. Baňky byly důkladně promíchány a byla odebrána alikvotní část vzorku do Eppendorf zkumavky.
7. Eppendorf zkumavky byly centrifugovány při 13 000 rpm po dobu 5 minut.
8. Z každé alikvotní části bylo převedeno 0,1 ml odstředěného extraktu na dno skleněných zkumavek. Všechny vzorky byly provedeny v duplikátech.
9. Na dno zkumavek bylo přidáno 0,1 ml směsi exo-1,3- β -glukanázy a β -glukosidázy v roztoku 200 mM acetátového pufru. Zkumavky byly promíchány a inkubovány po dobu 60 minut při teplotě 40 °C.
10. Poté byly do všech zkumavek napipetovány 3 ml reakčního činidla GOPOD a zkumavky ponechány inkubovat po dobu 20 minut při 40 °C.
11. Blank byl připraven z 0,2 ml 200 mM acetátového pufru o pH=4,5 a 3 ml reagenčního činidla GOPOD. Standardní vzorek D-glukózy byl připraven z 0,1 standardu D-glukózy, 0,1 ml 200 mM acetátového pufru o pH=4,5 a 3 ml reagentu GOPOD.
12. Standardní vzorek i blank byly podrobeny celému inkubačnímu procesu jako vzorky s reagentem GOPOD.
13. Výsledná absorbance byla změřena při vlnové délce 510 nm proti blanku.

4.11.2 Stanovení α -glukanů

1. Do reakčních zkumavek s uzávěrem bylo naváženo 100 mg každého vzorku a následně přidány 2 ml 1,7 M roztoku NaOH.
2. Zkumavky byly vloženy na dobu 20 minut do ledu a během inkubace byly průběžně promíchávány za pomoci přístroje Vortex.
3. Do každé zkumavky bylo přidáno 8 ml 1,2 M acetátového pufru o pH=3,8 a poté ihned 0,2 ml amyloglukosidázy a invertázy z láhve 2 dodané v balení kitu. Zkumavky byly promíchány a vloženy do vodní lázně vyhřáté na 40 °C po dobu 30 minut a průběžně míchány.

4. U vzorků obsahujících > 10 % α -glukanů byl obsah zkumavek kvantitativně přenesen do 100 ml odměrných baněk a doplněn destilovanou vodou po rysku a důkladně promíchán. Odebraný alikvot byl zcentrifugován při 13 000 rpm po dobu 10 minut.
5. U vzorků obsahujících <10 % α -glukanů byly 2 ml roztoku převedeny do centrifugačních zkumavek a centrifugovány při 13 000 rpm po dobu 5 minut.
6. Do nových zkumavek bylo převedeno 0,1 ml zředěného nebo nezředěného roztoku a následně přidáno 0,1 ml 200 mM acetátového pufru o pH=4,5, dále 3 ml reagentu GOPOD a zkumavky byly ponechány inkubovat po dobu 20 minut ve vodné lázni vyhřáté na 40 °C.
7. Výsledná absorbance analyzovaných vzorků byla změřena při 510 nm proti blanku.

4.12 Analýza lipofilních látek pomocí HPLC

Analyzované vzorky hub byly podrobeny binární gradientové eluci s průtokem mobilní fáze 1,2 ml/min při teplotě 25 °C, viz Tabulka 1 a Tabulka 2. Měření vzorků probíhalo na chromatografické sestavě Dionex UltiMate 3000 s DAD detektorem řady Vanquish a kolonou C18. V prvním kanálu při vlnové délce 285 nm byly detekovány ergosterol, tokoferol, ubiquinon. Betakaroten, torulen, tolularhodinu, lykopen, neoxantin, violaxantin, chlorofyl A/B a lutein byly identifikovány ve druhém kanále při vlnové délce 435 nm.

Tabulka 1 Složení mobilní fáze pro analýzu lipofilních vitaminů metodou HPLC

Mobilní fáze	Složení mobilní fáze	% zastoupení
A	Acetonitril	84
	Methanol	2
	trisHCl, pH=8	14
B	Methanol	60
	Ethylacetát	40

Tabulka 2 Gradientová změna mobilní fáze v čase

Retenční čas (min)	Mobilní fáze A (%)	Mobilní fáze B (%)
0	100	0
13	0	100
19	0	100
20	100	0
25	100	0

4.12.1 Extrakce lipofilních látek metodou dle Folche

Nejprve byla připravena extrakční směs smísením chloroformu a methanolu v poměru 2:1. Do malých reagenčních lahví o objemu 100 ml byl navážen vždy 1 g vzorku, ke kterému bylo následně přidáno 20 ml extrakční směsi. Za stálého míchání byly po dobu 60 minut všechny vzorky extrahovány na magnetické míchačce. Po uběhnutí 60 minut bylo přidáno 24 ml destilované vody, vzorky byly důkladně promíchány a nechány se ustálit do oddělení fází.

Chloroformová fáze byla odpipetována do plastových centrifugačních zkumavek. Zkumavky se vzorky byly vloženy do vyhřívaného termobloku na 40 °C a odpařovány pomocí dusíku. Po úplném odpaření byl přidán 1 ml směsi ethylacetátu a acetonitrilu v poměru 2:1. Vzorky byly homogenizovány po dobu 10 minut na přístroji Vortex. Poté byly vzorky přefiltrovány přes PTEE filtr a převedeny do vialek, takto připravené vzorky byly použity k měření na HPLC.

4.13 Stanovení vitamínu C pomocí RP-HPLC/UV-VIS

Stanovení vitamínu C bylo provedeno za pomoci vysokoúčinné kapalinové chromatografie s reverzní fází. Pro analýzu byly vybrány vzorky s 24hodinovou extrakcí, které byly podrobeny binární gradientové eluci s průtokem mobilní fáze 1 ml/min při teplotě 35 °C. Měření probíhalo na přístroji UltiMate 3 000 značky Dionex. Vzorky o objemu 10 µl byly nanесeny na kolonu pomocí dávkovací smyčky. Parametry nastavení HPLC sestavy jsou uvedeny v Tabulka 3, průběh gradientové změny mobilní fáze je uveden v Tabulka 4. Každý vzorek byl stanoven ve dvou opakováních, z rovnice lineární regrese $y = 15\,348,18 \cdot x$ byla vypočtena výsledná koncentrace vitamínu C v jednotlivých vzorcích.

Tabulka 3 Parametry nastavení HPLC

Objem nástríku	10 µl	
Složení mobilní fáze	Mobilní fáze A	Octan sodný
	Mobilní fáze B	Acetonitril
Typ eluce	Gradientová	
Průtok MF	1 ml/min	
Teplota termostatu	35 °C	
Čas analýzy	20 minut	
Název a typ kolony	Kinetex 2.6 µm Polar C18 100 Å (150x4,6 mm)	
Detektor	DIONEX (Diode Array Detector)	
Detekce	267 nm	

Tabulka 4 Gradientová změna mobilní fáze v čase

Retenční čas	Mobilní fáze A (%)	Mobilní fáze B (%)
3	100	0
6	90	10
12	30	70
14	30	70
15	30	70
16	100	0
20	100	0

4.14 Antimikrobiální test

Antimikrobiální účinnost analyzovaných vzorků hub byla sledována u čtyř vybraných mikroorganismů. Pro tento experiment byly vybrány dva typy mikroorganismů, a to dvě grampozitivní bakterie a dvě gramnegativní bakterie. Zástupci grampozitivních bakterií byli *Staphylococcus epidermidis* a *Micrococcus luteus*, v případě gramnegativních byly použity *Escherichia coli* a *Serratia marcescens*.

4.14.1 Příprava médií a kultivace mikroorganismů pro antimikrobiální test

Kultivace vybraných mikroorganismů probíhala v tekutých médiích připravených dle návodu výrobce, viz Tabulka 5. Potřebné množství bylo naváženo, přeneseno do Erlenmeyerových baněk a rozpuštěno v odpovídajícím objemu destilované vody. Takto připravená média byla sterilována po dobu 35 minut při 120 °C v tlakovém hrnci.

Tabulka 5 Použitá média pro vybrané mikroorganismy

Mikroorganismus	Typ média	Navážka (g) na 1000 ml
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	BHI médium	37
<i>Micrococcus luteus</i>	NB médium	25
<i>Escherichia coli</i>	LB médium	20
<i>Serratia marcescens</i>	NB médium	25

Po zchlazení bylo 50 ml každého média přelito do Erlenmeyerových baněk o objemu 100 ml. Do takto připravených médií v menších Erlenmeyerových baňkách byl převeden obsah kryozkumavek s mikroorganismy. Zaočkované baňky byly přeneseny na temperovanou třepačku při 37 °C a kultivovány po dobu 24 hodin. Po uplynutí 24 hodin byla bakteriální kultura naředěna sterilním médiem na hodnotu 0,5 McFarlandovy stupnice a následně zředěna na potřebnou koncentraci podle daného mikroorganismu. Takto naředěné bakteriální kultury byly použity pro provedení mikrodiluční bujónové metody pro stanovení antimikrobiální účinnosti.

4.14.2 Mikrodiluční bujónová metoda

Antimikrobiální účinnost vybraných vzorků hub byla testována mikrodiluční bujónovou metodou. Pro tuto metodu byly použity mikrotitrační destičky s 96 jamkami. Do každé jamky bylo vždy napipetováno 50 µl sterilního média, 50 µl vodného extraktu hub o různé koncentraci, viz Tabulka 6, a 100 µl bakteriální kultury. Stejným způsobem byly zhotoveny také blanky, kde místo 50 µl vzorku bylo použito 50 µl destilované vody. U všech destiček byl následně změřen zákal v čase 0, poté byly destičky vloženy do termostatu, kde byly inkubovány po dobu 24 hodin.

Pro zjištění růstu nebo úbytku bakteriální kultury byl změřen zákal v čase 0 a poté v čase 24 hodin. Zákal byl měřen pomocí přístroje ELISA Reader při vlnové délce 630 nm.

Tabulka 6 Koncentrace vodných extraktů odpovídající ředění použité při antimikrobiálním testu

Ředění vzorků	2	4	8	16	32	64	128	256	512
Koncentrace (mg/ml)	50,00	25,00	12,50	6,25	3,13	1,56	0,78	0,39	0,20

4.14.3 Resazurinový test

Po změření zákalu po 24 hodinách inkubace bylo do každé jamky 96jamkové destičky napipetováno 20 µl resazurinu. Takto napipetované mikrotitrační destičky byly ponechány k inkubaci při teplotě 37 °C po dobu 30 minut. Po uplynutí inkubační doby byla změřena výsledná absorbance pomocí přístroje ELISA Reader při vlnové délce 570 nm.

4.15 Cytotoxické testy

Testování cytotoxicity vybraných vzorků hub bylo provedeno na dvou buněčných liniích, a to HaCaT, kterou představují imortalizované keratinocyty, a sice buněčnou linií Caco-2 tvořenou buňkami lidského adenokarcinomu lidského střeva. Vodné extrakty vzorků hub byly testovány v rozmezí koncentrací 4–28 obj.%. Výchozí koncentrace všech testovaných vzorků byla 100 mg/ml.

4.15.1 Kultivace buněčné linie Caco-2

Kultivace buněčné linie Caco-2 probíhala na médiu EMEM (Eagle's Minimum Essential Medium), které bylo doplněno o 10 % sterilního fetálního bovinního séra, 1 % směsi antibiotik/antimykotik a 1 % neesenciálních aminokyselin. Buňky byly kultivovány v kultivačních nádobách o velikosti povrchu 25 cm² a 75 cm². Kultivační láhve byly vždy pečlivě uzavřeny a opatrně vloženy do inkubátoru s řízenou atmosférou 5% CO₂ při 37 °C a s 95% vlhkostí. V průběhu kultivace bylo dle potřeby měněno médium, buňky byly pravidelně kontrolovány pomocí mikroskopu a v případě potřeby zpasážovány. Buňky byly před každou analýzou cytotoxicity spočítány a dle potřebné koncentrace pro následující testy naředěny čerstvým sterilním EMEM médiem.

4.15.2 Kultivace buněčné linie HaCaT

Pro kultivaci HaCaT buněk bylo používáno médium DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), které bylo doplněno o 10 % sterilního fetálního bovinního séra a 1 % směsi antibiotik/antimykotik. Buňky byly kultivovány v kultivačních nádobách o velikosti povrchu 25 cm² a 75 cm². Kultivační láhve byly vždy pečlivě uzavřeny a opatrně vloženy do inkubátoru s řízenou atmosférou 5% CO₂ při 37 °C a s 95% vlhkostí. V průběhu kultivace bylo dle potřeby měněno médium, buňky byly pravidelně kontrolovány pomocí mikroskopu a v případě potřeby zpasážovány. Buňky byly před každou analýzou cytotoxicity spočítány a dle potřebné koncentrace pro následující testy naředěny čerstvým sterilním DMEM médiem.

4.15.3 MTT test

Pro stanovení cytotoxicity pomocí MTT testu byla předem nakultivovaná buněčná kultura naředěna na koncentraci 15 000 buněk/jamka v případě buněčné linie Caco-2, v případě buněčné linie HaCaT byla naředěna na koncentraci 25 000 buněk/jamka. MTT test probíhal na 96jamkových mikrotitračních destičkách. Do každé jamky bylo napipetováno 100 µl buněčné kultury o potřebné koncentraci, která byla ponechána 24 hodin ke kultivaci. Po uplynutí 24 hodin bylo odpipetováno staré médium a přidáno 100 µl čerstvého média s různou koncentrací analyzovaných vzorků, takto napipetované destičky byly kultivovány dalších 24 hodin. Následně bylo odpipetováno médium se vzorky a přidáno 20 µl MTT roztoku v PBS o koncentraci 2,5 mg/ml. Destičky byly inkubovány v termostatu po dobu 3 hodin při 37 °C a poté bylo do každé jamky přidáno 100 µl 10% roztoku SDS v PBS. Destičky byly zabaleny alobalem a ponechány ve tmě následujících 24 hodin. Konečným krokem bylo změření výsledné absorpance pomocí přístroje ELISA Reader při vlnové délce 540 a 562 nm.

Součástí testu byly také kontrolní jamky, jako buněčná kontrola sloužily jamky, které obsahovaly pouze buňky a čisté médium. Jako pozitivní kontrola sloužily jamky obsahující 100 μ l 40% ethanolu, v tomto případě došlo k inhibici viability buněk.

4.15.4 LDH test

Pro provedení LDH testu byly použity supernatanty z buněčné linie HaCaT, které byly odpipetovány při provádění MTT testu do nové 96jamkové mikrotitrační destičky a uchovány při -20 °C.

Z uchovaných buněčných supernatantů bylo v triplikátech pipetováno 10 μ l do každé jamky nové mikrotitrační destičky. Následně k nim bylo přidáno 50 μ l roztoku NADH v pyruvátu, který vznikl rozpuštěním 0,75 mM roztoku pyruvátu sodného na konečnou koncentraci 1 mg/ml. Po inkubaci po dobu 30 minut při 37 °C bylo do každé jamky přidáno 50 μ l roztoku 2,4-dinitrofenylhydrazinu (20 mg 2,4-DNPH rozpuštěno ve 100 ml 1 M HCl). Mikrotitrační destičky byly ponechány ve tmě po dobu 20 minut. Poté bylo přidáno 50 μ l 4 M roztoku NaOH. Po 5 minutách inkubace při laboratorní teplotě byla změřena výsledná absorbance při 450 nm.

Aktivita enzymu laktátdehydrogenázy byla vypočtena z rovnice kalibrační křivky $A_{450} = 0,0026 \cdot c$ s korelačním koeficientem $R^2 = 0,9806$ získané ze standardního roztoku pyruvátu sodného v NAHD v koncentracích odpovídajících absolutní aktivitě 0–2 000 U/ml. Spolu s analyzovanými vzorky byly testu podrobeny i supernatanty, které sloužily jako pozitivní kontrola (buňky kultivované v 40% ethanolu) a negativní kontrola (buňky kultivované pouze v čistém médiu) při provádění MTT testu.

4.15.5 AlamarBlue test

Testování viability za využití barviva resazurinu bylo prováděno na mikrotitračních 96jamkových destičkách. Předem nakultivovaná buněčná kultura byla naředěna na potřebnou koncentraci 15 000–25 000 buněk/jamka v závislosti na testované buněčné linii. Do každé jamky bylo napipetováno 100 μ l buněčné kultury, která byla následujících 24 hodin kultivována v inkubátoru s řízenou atmosférou. Po uplynutí 24 hodin bylo odpipetováno staré médium a přidáno 100 μ l čerstvého média s různou koncentrací analyzovaných vzorků, takto napipetované destičky byly kultivovány dalších 24 hodin. Poté bylo médium se vzorky odpipetováno a napipetováno 100 μ l čerstvého média a 20 μ l roztoku resazurinu o koncentraci 0,15 mg/ml v PBS. Po 3 hodinách inkubace při 37 °C byla změřena výsledná absorbance při vlnové délce 560 a 590 nm. Součástí testu byly také jamky sloužící jako pozitivní kontrola (buňky kultivované v 40% ethanolu) a negativní kontrola (buňky kultivované pouze v čistém médiu).

4.16 Analýza produkce prozánětlivých interleukinů IL-6 a IL-8

Cytokiny souhrnně označují signální molekuly v imunitním systému, jde o malé molekuly proteinů nebo glykoproteinů, které významně ovlivňují velkou řadu buněčných funkcí, jako je růst, diferenciace či rychlost imunitní odpovědi na infekci způsobenou patogenem. Interleukin-6 a interleukin-8 jsou specifické typy prozánětlivých cytokinů, které jsou produkovány bílými krvinkami a primárně zajišťují informování a rychlou odpověď imunitního systému na akutní zánět nebo infekci [55,56].

Stanovení prozánětlivých interleukinů IL-6 a IL-8 bylo provedeno za použití dvou komerčně dostupných kitů. Pro analýzu interleukinů IL-6 byl použit Human IL-6 ELISA Kit značky Invitrogen, jedná se o enzymově vázaný imunosorbentní test. Pro stanovení interleukinů IL-8 byl použit Human IL-8 ELISA Kit, který je založený na stejném principu. Při stanoveních bylo postupováno dle instrukcí výrobce [57,58]. Výsledné hodnoty absorbancí byly zaznamenány pomocí přístroje ELISA Reader. Koncentrace interleukinu-6 byla zjištěna výpočtem z rovnice kalibrační křivky $A_{450} = 0,0008 \cdot c$ s korelačním koeficientem $R^2 = 0,9809$. Z rovnice regrese $A_{450} = 0,0012 \cdot c$ s korelačním koeficientem $R^2 = 0,9809$ byla vypočtena koncentrace IL-8.

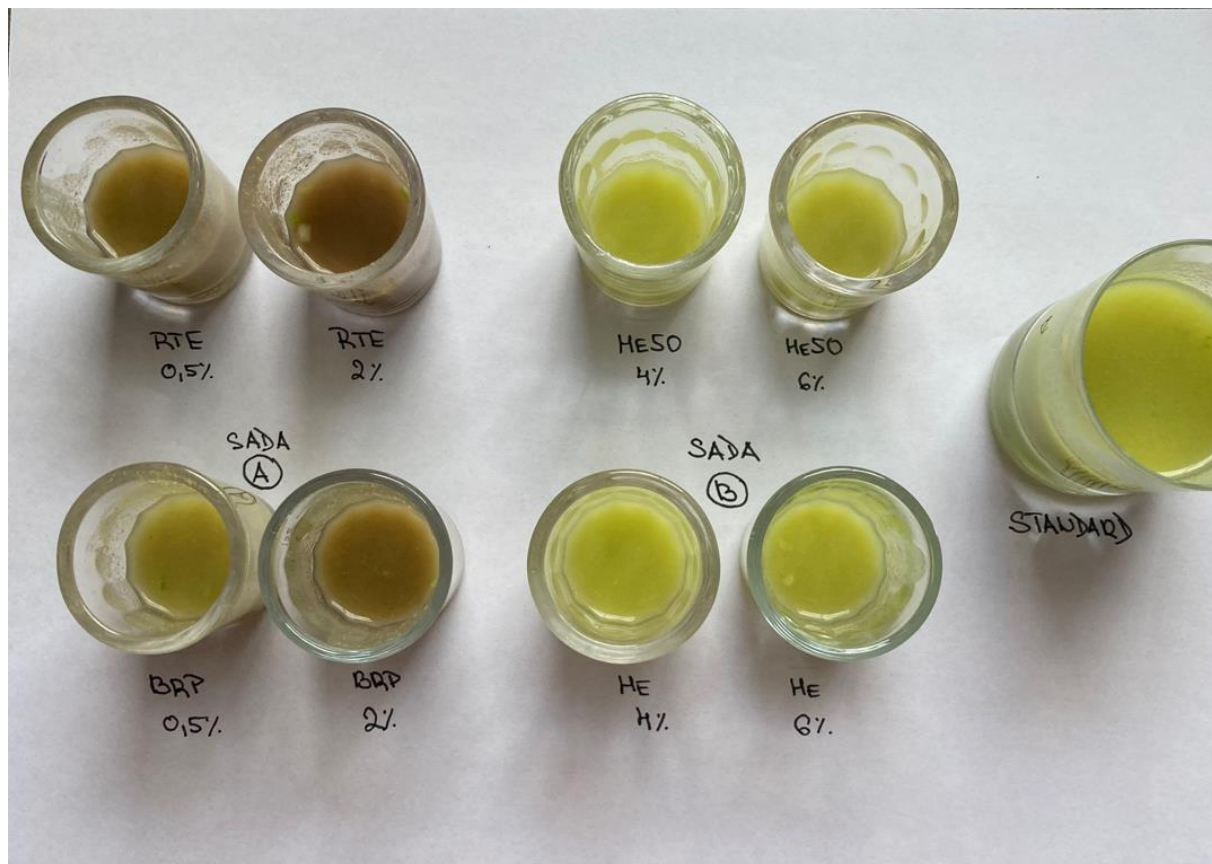
4.17 Aplikace houbových prášků

V rámci aplikace houbových prášků do potravin byly připraveny paštiky dle běžné receptury, do kterých byly přidány houbové prášky Bio Reishi Pulvere a Reishi Triterpen Extrakt, viz Obrázek 8.



Obrázek 8 Připravené paštiky s přídavkem houbových prášků BRP (Bio Reishi Pulvere) a RTE (Reishi Triterpen Extrakt)

Na 100 g paštiky byl přidán 1 g houbového prášku. Při kombinaci houbových prášků z lesklokorky lesklé s masem došlo k projevení výrazné hořké chuti, to bylo důvodem, proč paštiky nebyly vybrány pro senzorické hodnocení. Pro případné využití houbových prášků v paštikách by byla nutná optimalizace receptury pro snížení hořkosti výrobku.



Obrázek 9 Zeleninové instantní polévky s přidavkem houbových prášků z lesklokorky lesklé a korálovce ježatého připravené pro senzorické hodnocení

Další aplikací bylo přidání houbových prášků do instantní sypké směsi polévky zeleninového základu. Kombinace hub a zeleniny byla chuťově atraktivní, proto byly instantní polévky vybrány pro senzorickou analýzu.

4.18 Senzorická analýza

Pro senzorickou analýzu byla připravena instantní polévka s obsahem hub. Degustace probíhala dne 29. 3. 2023 od 9 do 11 hodin v zasedací místnosti Ústavu chemie potravin a biotechnologií Fakulty chemické VUT v Brně. Hodnocení se zúčastnilo 10 hodnotitelů z řad studentů, kteří byli předem proškoleni.

4.18.1 Příprava vzorků pro senzorickou analýzu

Pro hodnocení byla použita komerčně dostupná instantní brokolicová polévka značky Vitana, která byla připravena podle návodu na obalu. Do polévky bylo přidáno adekvátní množství vzorku hub. Pro senzorickou analýzu byly připraveny dvě sady polévek, sada A obsahovala houbové prášky lesklokorky lesklé (BRP a RTE), naopak sada B obsahovala houbové prášky korálovce ježatého (HE a HE 50). Celkem bylo tedy připraveno 8 vzorků polévek s houbovými prášky a jeden standard, který obsahoval pouze samotnou polévku. Označení vzorků a obsah houbových prášků je přehledně zobrazen v Tabulce 7.

Tabulka 7 Rozdělení sad A a B a jejich kódování

Kódování (sada A)	Označení vzorků	Obsah houby (hm. %)	Kódování (sada B)	Označení vzorků	Obsah houby (hm. %)
K2MO	Standard	0	L4Z2	Standard	0
P8Z1	BRP	0,5	E1B3	HE	4
SMVO	BRP	2	M8A5	HE	6
L5J3	RTE	0,5	B1M1	HE 50	4
A6N2	RTE	2	P5K9	HE 50	6

Vysvětlivky k označení vzorků

BRP	Bio Reishi Pulvere – prášek z pomleté plodnice reishi
RTE	Reishi Triterpen Extrakt – prášek obohacený o triterpenoidy
HE	Hericium - Korálovec ježatý – prášek z pomleté plodnice korálovce
HE 50	Hericium 50- Korálovec ježatý – prášek obohacený o polysacharidy

4.18.2 Senzorické hodnocení

Pro senzorickou analýzu byla připravená polévka servírována v bílých miskách řádně kódovaných podle Tabulky 7. Na začátku hodnocení byli hodnotitelé seznámeni s dotazníkem viz PŘÍLOHY a následně obdrželi první sadu polévek k hodnocení. Hodnotitelé měli za úkol hodnotit celkový vzhled, barvu, konzistenci, vůni, chuť, hořkost a celkovou přijatelnost vzorků. Jako chuťový neutralizátor měli k dispozici vodu a rohlíky.

4.18.3 Zpracování výsledků senzorické analýzy

Výsledné hodnocení vzorků polévek obohacených o houby bylo zpracováno pomocí MS Excel. Pro jednotlivé deskriptory byly vytvořeny grafy v závislosti na mediánu hodnocení.

5 VÝSLEDKY A DISKUSE

Tato diplomová práce pojednává o složení vybraných druhů hub, jejich účincích na zdraví konzumenta a v neposlední řadě o jejich využití v potravinářství a farmacii.

Experimentální část práce je zaměřena na charakterizaci nutričně významných a bioaktivních látek ve vybraných vzorcích hub. Dalším cílem práce bylo charakterizovat biologický účinek vodných extraktů z vybraných vzorků hub a jejich interakci s lidskými buněčnými liniemi, pro splnění tohoto cíle byly provedeny testy cytotoxicity na dvou buněčných liniích a antimikrobiální testy na čtyřech modelových mikroorganismech. Diplomová práce se dále věnuje možnostem obohacení nutričně slabých potravin o extrakty vybraných hub a případnou aplikaci v oblasti potravinářství.

Účelem této práce je získat komplexní znalosti o vzácných druzích hub v potravinářství a farmacii, jejich účincích a vlivu na zdraví konzumenta a přispět tak k rozvoji jejich využití v lékařství a potravinářském průmyslu.

5.1 Charakterizace vzorků hub z hlediska nutričně významných látek

Vybrané vzorky huby byly podrobeny následujícím analýzám za účelem charakterizace nutričně významných látek.

5.1.1 Stanovení celkových a redukujících sacharidů

Pro stanovení celkových sacharidů ve vybraných vzorcích hub bylo použito spektrofotometrické stanovení dle Duboise. Stanovení bylo provedeno dle postupu uvedeného v kapitole 4.10.1. Sacharidy patří mezi látky snadno rozpustné ve vodě, proto byly testovány vodné extrakty hub, které byly připraveny dle postupu uvedeného v kapitole 4.9.

V případě redukujících sacharidů byla použita metoda Nelson-Somogyiho. Stanovení bylo provedeno rovněž u vodných extraktů hub podle postupu uvedeného v kapitole 4.10.2.

Všechny vzorky byly analyzovány ve třech paralelních opakováních. Z naměřených hodnot byl vypočten průměr a směrodatná odchylka. Výsledný obsah celkových i redukujících sacharidů analyzovaných vzorků byl následně vypočten z rovnice kalibrační křivky a uveden v Tabulce 8.

Tabulka 8 Obsah celkových sacharidů a redukujících sacharidů ve vybraných vzorcích hub

Vybrané vzorky hub	Typ extrakce	Obsah celkových sacharidů (mg/g)	Obsah redukujících sacharidů (mg/g)
Bio Reishi Pulvere	Voda / 24 hodin	425,65 ± 4,67	19,73 ± 0,75
Bio Reishi Pulvere	Horká voda	516,81 ± 3,50	18,40 ± 0,71
Reishi Triterpen Extrakt	Voda / 24 hodin	903,54 ± 7,58	47,69 ± 1,69
Reishi Triterpen Extrakt	Horká voda	858,63 ± 5,83	45,55 ± 0,79
Heridium	Voda / 24 hodin	287,57 ± 4,08	30,23 ± 0,59
Heridium 50	Voda / 24 hodin	953,71 ± 2,92	8,84 ± 0,20

Z Tabulky 8 je patrné, že nejvíce sacharidů bylo detekováno u vzorku Heridium 50 (953,71 mg/1g), dále u vzorku Reishi Triterpen Extrakt s 24hodinovou extrakcí (903,54 mg/1g). Nejnižší obsah sacharidů vykazoval vzorek Heridium, a to 287,57 mg/g.

Při srovnání vzorků je důležité brát v úvahu dva faktory, a to dobu extrakce a teplotu extrahovadla. Tyto dva parametry výrazně ovlivňují detekované množství jak celkových, tak redukujících sacharidů v jednotlivých vzorcích. U vzorků Bio Reishi Pulvere vykazoval vzorek s 24hodinovou extrakcí nižší obsah celkových sacharidů než vzorek zalitý pouze horkou vodou. Vyšší teplota extrahovadla mohla způsobit degradaci polysacharidů na jednodušší sacharidy, což zapříčinilo vyšší obsah celkových sacharidů. Extrakce horkou vodou poskytuje ve vodě rozpustné polysacharidy, na rozdíl například od extrakce alkalickým roztokem, která je nejlepší volbou při extrakci polysacharidů nerozpustných ve vodě [59]. Působením vysoké teploty na buněčnou stěnu hub dochází k narušení struktury buněčné stěny a k vyššímu uvolňování polysacharidů, které je žádoucí. Stejného efektu lze dosáhnout i úpravou pH, lze tedy říci, že teplota a pH extrahovadla hrají významnou roli v narušování buněčné stěny a tím i v extrakci polysacharidů z hub [60].

U vzorků Reishi Triterpen Extrakt ukázala 24hodinová extrakce větší výnos celkových i redukujících sacharidů než vyšší teplota extrahovadla, tedy vzorek Reishi Triterpen Extrakt pouze zalitý horkou vodou.

U vzorků Reishi Triterpen Extrakt bylo očekáváno vyšší zastoupení celkových a redukujících sacharidů v porovnání se vzorky Bio Reishi Pulvere, jde totiž o koncentrovaný práškový extrakt, naopak v případě Bio Reishi Pulvere jedná se pouze o prášek z pomleté plodnice.

Zajímavé je srovnání vzorků *Hericium* a *Hericium 50*, oba vzorky byly extrahovány stejnou dobu. Vzorek *Hericium*, vodný extrakt z prášku pomleté plodnice, vykazuje výrazně nižší obsah celkových sacharidů než *Hericium 50*, ale vyšší obsah redukujících sacharidů. Vzorek *Hericium 50* obsahuje více polysacharidů, které jsou převážně neredukující. Dlouhá doba extrakce může tyto polysacharidy postupně rozkládat na jednoduché sacharidy. Dle výrobce má vzorek *Hericium 50* obsahovat o 50 % polysacharidů více než prášek ze samotné pomleté plodnice. Výrazně vyšší obsah celkových sacharidů u vzorku *Hericium 50* (953,71 mg/g) je tedy na místě oproti vzorku *Hericium*, který obsahuje okolo 287,57 mg/g. Výrobce garantuje minimální přídavek 50 % polysacharidů ve vzorku *Hericium 50* oproti vzorku *Hericium*. Výrobce se touto hranicí minimálního přídavku chrání před uváděním nepravdivého nutričního složení.

Houby obecně patří mezi potraviny s vysokým obsahem sacharidů, jejich zastoupení se liší v závislosti od druhu hub. Porovnáme-li obsah celkový i redukujících sacharidů u vodných extraktů připravených z prášků z pomletých plodnic, lze říci, že více celkových sacharidů najdeme v houbě reishi (423,65 mg/g), a to přibližně o polovinu než v případě korálovce ježatého (287,57 mg/g). U neredukujících sacharidů je situace obrácená, což potvrzuje i fakt, že korálovec ježatý je velmi chutná houba s nasládlou chutí na rozdíl od reishi, která nemá kulinářské využití.

5.1.2 Stanovení celkových bílkovin metodou dle Biureta

Stanovení obsahu bílkovin bylo provedeno podle postupu uvedeného v kapitole 4.10.3. Analýze byly podrobeny vodné extrakty z hub připravené dle kapitoly 4.9. Každý vzorek byl analyzován ve třech opakováních, z naměřených hodnot byl následně vypočten průměr a směrodatná odchylka. Koncentrace bílkovin v jednotlivých vzorcích byla vypočtena z rovnice kalibrační křivky a výsledné hodnoty jsou uvedeny v Tabulce 9.

Tabulka 9 Celkový obsah bílkovin ve vodných extraktech

Vybrané vzorky hub	Typ extrakce	Obsah bílkovin (mg/g)
Bio Reishi Pulvere	Voda / 24 hodin	4,64 ± 0,26
Bio Reishi Pulvere	Horká voda	4,68 ± 0,36
Reishi Triterpen Extrakt	Voda / 24 hodin	83,77 ± 3,34
Reishi Triterpen Extrakt	Horká voda	73,50 ± 2,48
<i>Hericium</i>	Voda / 24 hodin	13,62 ± 0,61
<i>Hericium 50</i>	Voda / 24 hodin	18,79 ± 0,65

Nejvíce bílkovin vykazoval vzorek Reishi Triterpen Extrakt extrahovaný 24 hodin, a to 83,77 mg/g. Dále vzorek Reishi Triterpen Extrakt zalitý horkou vodou obsahoval poměrně vysoký obsah bílkovin. Při porovnání koncentrovaných vzorků (Reishi Triterpen Extrakt) houby reishi se samotným pomletým práškem (Bio Reishi Pulvere) obsahoval koncentrovaný práškový extrakt signifikantně vyšší obsah bílkovin. V případě vzorků *Hericium* a *Hericium* 50 obsahoval vzorek čisté pomleté plodnice (*Hericium*) nepatrně menší množství oproti vzorku *Hericium* 50, který je obohacen o 50 % polysacharidů a 20 % β -glukanů.

Studie porovnávající různé typy extrakce proteinů z hub přinesla nové poznatky, kdy nejúčinnější extrakční technika byla extrakce proteinů za pomoci působení enzymů. Ve studii byla zkoumána i vodná extrakce, která sice přinesla nízký výtěžek proteinů, ale získané proteinové extrakty byly nejčistší [61]. Použitím vodné extrakce tedy nemuselo dojít k vyextrahování veškerých proteinů. Zajímavým porovnáním by mohlo být použití jiného extrakčního činidla nebo extrakční techniky.

Lesklókorka lesklá i korálovec ježatý patří mezi houby bohaté na obsah různých druhů proteinů, jsou v nich obsaženy fungální imunomodulační proteiny (FIP), proteiny inaktivující ribozomy (RIP), dále například lektin, různé glykoproteiny a řada enzymů. Většina těchto proteinů je schopna regulovat imunitní mechanismy v těle, a to buď přímo nebo nepřímo. Z lesklókorky lesklé byla extrahována řada enzymů jako ligninázy, celulózy, amylázy, proteázy a mnoho dalších. Využití těchto enzymů nemusí být pouze pro jejich biologické vlastnosti, jako je antioxidační aktivita nebo jejich schopnost inhibovat melanin, mohou být použity i v mnoha zemědělských výrobcích, například využití ligninázy k degradaci ligninu [62].

V případě korálavce ježatého byl izolovaný enzym označený jako HEP 3, který vykazoval imunomodulační aktivitu a mohl by být použit jako potenciální lék nebo funkční potravinová složka pro imunoterapii gastrointestinálních onemocnění. Studie odhalila, že HEP 3 by mohl zlepšit imunitní systém tím, že by reguloval složení a metabolismu střevní mikrobioty [63].

Ze stanovení bílkovin Biuretovou metodou lze vyvodit závěry, že přestože obě houby jsou bohaté na obsah proteinů, použití vodné extrakce nemuselo být tou nejlepší volbou. Avšak pokud zvažujeme použití vodného extraktu do potravinového doplňku, je voda jako extrakční činidlo nejlepší volbou.

5.1.3 Stanovení celkového obsahu polyfenolů a antioxidační účinnosti

Stanovení celkových fenolických sloučenin bylo provedeno dle postupu v kapitole 4.10.4. Každý vzorek byl analyzován ve třech opakováních, následně byl vypočten průměr a směrodatná odchylka. Celkový obsah fenolických sloučenin byl vypočten z rovnice kalibrační křivky.

Antioxidační aktivita jednotlivých vzorků byla měřena dle postupu uvedeného v kapitole 4.10.5. Jednotlivé vodné extrakty byly podrobeny stanovení ve třech opakováních, následně byla ze získaných hodnot vypočtena průměrná hodnota a směrodatná odchylka. Antioxidační aktivita byla vztažena na ekvivalentní množství TEAC. Výsledná koncentrace celkových polyfenolů a antioxidační aktivita jednotlivých vzorků je uvedena v Tabulce 10.

Tabulka 10 Koncentrace celkových fenolických látek ve vodných extraktech

Vybrané vzorky hub	Typ extrakce	Obsah celkových polyfenolů (mg/g)	Antioxidační aktivita (mg/g)
Bio Reishi Pulvere	Voda / 24 hodin	$1,17 \pm 0,09$	$0,83 \pm 0,07$
Bio Reishi Pulvere	Horká voda	$1,24 \pm 0,04$	$0,89 \pm 0,22$
Reishi Triterpen Extrakt	Voda / 24 hodin	$12,82 \pm 0,28$	$14,92 \pm 0,64$
Reishi Triterpen Extrakt	Horká voda	$13,76 \pm 1,14$	$18,64 \pm 0,64$
Hericium	Voda / 24 hodin	$4,09 \pm 0,11$	$3,30 \pm 0,17$
Hericium 50	Voda / 24 hodin	$4,43 \pm 0,18$	$5,97 \pm 0,91$

Nejvyšší obsah celkových polyfenolů ($13,76 \text{ mg/g}$) byl zaznamenán u vzorku Reishi Triterpen Extrakt zalitého horkou vodou. Stejný vzorek vykazoval i nejvyšší antioxidační aktivitu ($18,64 \text{ mg/g}$). Nejnižší obsah polyfenolů ($1,17 \text{ mg/g}$) i nejnižší antioxidační účinnost ($0,83 \text{ mg/g}$) byly stanoveny u vzorku Bio Reishi Pulvere extrahovaného po dobu 24 hodin. Z hodnot uvedených v Tabulce 10 je možné pozorovat trend, kdy spolu korespondují hodnoty obsahu polyfenolů a antioxidační aktivity. Je možné konstatovat, že antioxidační aktivita je závislá na obsahu polyfenolických sloučenin. Ze získaných hodnot je dále patrné, že delší doba extrakce neměla vliv na množství extrahovaných polyfenolů, a tedy i na výslednou antioxidační aktivitu. Hodnoty antioxidační aktivity jsou v případě obou vzorků Reishi Triterpen Extrakt a dále vzorku Hericium 50 vyšší než obsah celkových fenolických látek, důvodem je to, že fenolické látky nejsou jako jediné zodpovědné za antioxidační vlastnosti hub. Na antioxidační aktivitě se podílí také přítomnost proteinů, polysacharidů, z nichž jsou to konkrétně β -glukany, dále vitamin C, vitamin A nebo vitamin E [64]. Antioxidační vlastnosti mají také triterpenoidy, které jsou hojně zastoupeny ve vzorcích Reishi Triterpen Extrakt.

Studie zabývající se zkoumáním vlivu teploty a doby varu na hladinu fenolických sloučenin a antioxidační aktivitu u houby reishi přinesla podobné výsledky. Krátká doba extrakce při teplotě varu vedla k nižšímu obsahu polyfenolů. Ještě nižší hodnoty byly zaznamenány při delší době extrakce na nižší teplotu. Nejlepší metodou extrakce fenolických sloučenin je kombinace záhřevu na vyšší teplotu okolo 90 °C a doba extrakce v řádu jednotek minut. Při procesu zahřátí na vyšší teplotu dochází k lepšímu uvolnění bioaktivních látek [65].

Lze konstatovat, že vzorky zalité horkou vodou měly lepší podmínky pro uvolnění fenolických látek ze své matrice než vzorky extrahované po dobu 24 hodin, tento fakt se projevil i na vyšší antioxidační aktivitě.

5.2 Stanovení celkových glukanů, α - i β -glukanů

Pro stanovení obsahu celkových glukanů, α -glukanů i β -glukanů byl využit komerční kit značky Megazyme. Při stanovení bylo postupováno dle návodu uvedeného v kapitole 4.11. Stanovení byly podrobeny všechny vzorky v práškové formě. Každý vzorek byl analyzován v duplikátech. Ze získaných dat byl následně vypočten průměr a směrodatná odchylka. Pro výpočet byl použit program Excel poskytnutý výrobcem na webových stránkách [66].

Tabulka 11 Celkové glukany, α -glukany a β -glukany obsažené ve vzorcích hub

Vybrané vzorky hub	Celkový obsah glukanů (%w/w)	Obsah α -glukanů (% w/w)	Obsah β -glukanů (%w/w)
Bio Reishi Pulvere	72,97 $\pm$ 0,94	2,24 $\pm$ 0,06	70,73 $\pm$ 0,88
Reishi Triterpen Extrakt	55,57 $\pm$ 0,73	2,55 $\pm$ 0,04	53,02 $\pm$ 0,77
Hericium	52,05 $\pm$ 0,28	2,32 $\pm$ 0,06	49,73 $\pm$ 0,22
Hericium 50	68,37 $\pm$ 0,42	3,97 $\pm$ 0,12	64,41 $\pm$ 0,54

Nejvíce celkových glukanů obsahoval vzorek Bio Reishi Pulvere (okolo 73 %). V tomto vzorku bylo obsaženo až 71 % β -glukanů. Z Tabulky 11 lze vyčíst, že druhý vzorek bohatý na obsah celkových glukanů je Hericium 50, ve kterém bylo stanoveno 68 % celkových glukanů a 64 % β -glukanů. Při porovnání vzorku Hericium a Hericium 50 by rozdíl v obsahu β -glukanů měl být minimálně 20 %, jak uvádí výrobce na obalu. Reálný rozdíl mezi vzorky však představuje až 29,5 % v obsahu β -glukanů. Výrobce deklaruje minimální přidané množství, horní hranice přidaného množství β -glukanů není stanovena. Tímto způsobem se výrobce chrání před uváděním nepravdivosti nutričních charakteristik a oklamáním zákazníka.

U všech vzorků podrobených stanovení byl zjištěn významný obsah β -glukanů, jejichž konzumace je vhodná nejen z hlediska imunomodulačního účinku. β -glukany jsou přirozeným prebiotickým preparátem, který pozitivně ovlivňuje přátelské střevní bakterie, konkrétně bakterie mléčného kvašení, jako *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus acidophilus* [65].

Bylo prokázáno, že polysacharidy obsažené v korálovci ježatém mají potenciální účinek na modulaci, diverzitu a četnost bakterií tvořících střevní mikrobiotu [67].

Přestože α -glukany jsou v přírodě rozšířené a hrají významnou roli v dodávání energie, jejich zastoupení u jednotlivých vzorků se výrazně neliší a v porovnání s obsahem β -glukanů je jejich obsah poměrně nízký. Tyto glukany představují základní struktury amylozy a amylopektinu, tedy polysacharidových složek škrobu. Škrob je ale zásobní látkou pro rostliny a v buněčných stěnách hub se primárně nevyskytuje, na rozdíl od chitinu, který je pro houby typický [68].

5.3 Analýza lipofilních látek pomocí HPLC/UV-VIS

Lipofilní látky obsažené ve vzorcích hub byly analyzovány pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie, postup a parametry HPLC sestavy jsou popsány v kapitole 4.12. Pro stanovení lipofilních látek ve vzorcích hub byly nejprve vzorky podrobeny extrakci dle Folche popsané v kapitole 4.12.1. Detekované lipofilní látky jsou uvedeny v následující Tabulce 12.

Tabulka 12 Obsah lipofilních látek ve vybraných vzorcích hub

Vzorek	Lipofilní látka	Koncentrace ($\mu\text{g/g}$)
Bio Reishi Pulvere	Ergosterol	$91,83 \pm 3,67$
	Ubiquinon	$5,49 \pm 0,22$
	Betakaroten	$324,74 \pm 9,74$
Reishi Triterpen Extrakt	Ergosterol	$152,75 \pm 6,87$
Heridium	Ergosterol	$199,46 \pm 7,98$
	Tokoferol	$65,95 \pm 2,64$
	Ubiquinon	$113,77 \pm 4,55$
	Lykopen	$1,26 \pm 0,06$
Heridium 50	Nedetkováno	Nedetkováno

Houby jsou obecně velmi bohatým zdrojem lipofilních látek, konkrétně vitaminů rozpustných ve vodě. Provitamin D₂, ve formě ergosterolu, se přirozeně vyskytuje v buněčné stěně hub. Ergosterol je vlivem ultrafialového záření konvertován do vitamínu D₂. Jeho obsah v sušených houbách je závislý na použité metodě sušení. Bylo prokázáno, že použití sušící techniky za přítomnosti UV přeměňuje ergosterol na vitamin D a tím tak zvyšuje nutriční obsah jedlých druhů hub [69]. Ve všech analyzovaných vzorcích s výjimkou Heridium 50 byla stanovena přítomnost ergosterolu. Nejvyšší koncentraci vykazoval prášek z pomleté plodnice Heridium, a to $199,46 \mu\text{g/g}$. Ve vzorku Heridium byl dále stanoven provitamin E, karotenoid

lykopen a koenzym Q₁₀. Při srovnání vzorku Bio Reishi Pulvere a Reishi Triterpen Extrakt je obsah provitaminu D₂ více zastoupen u práškového extraktu než u čistého prášku z plodnice houby, a to až o 66 %. Vzorek Bio Reishi Pulvere naopak obsahoval značnou koncentraci provitaminu A, a to 324,74 µg/g.

Při použití extrakce dle Folche byla použita silná organická extrahovadla, přesto nemuselo dojít k úplné extrakci lipofilních látek přítomných ve vzorcích hub. Jiný pohled na problematiku by mohlo přinést použití rozdílné extrakční techniky látek lipofilního charakteru z matrice hub.

5.4 Stanovení vitaminu C metodou RP-HPLC/DAD

Obsah vitaminu C byl ve vzorcích hub analyzován pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie, postup a parametry HPLC sestavy jsou popsány v kapitole 4.13.

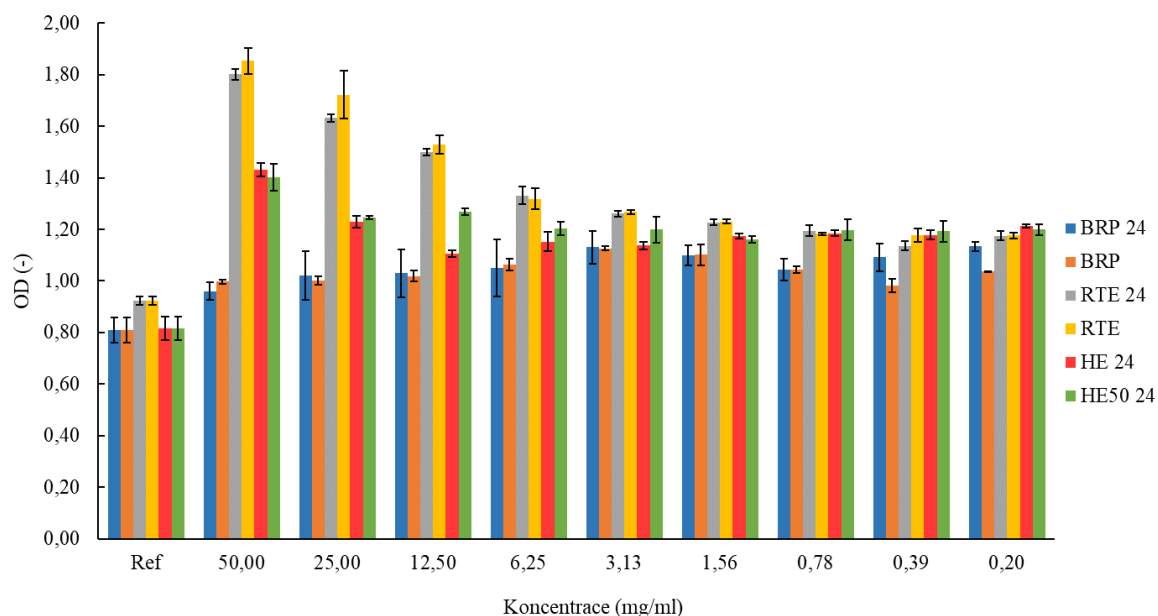
Tabulka 13 Stanovení obsahu vitaminu C

Vzorek	Obsah vitaminu C (µg/g)
Bio Reishi Pulvere	47,29 ± 2,36
Reishi Triterpen Extrakt	212,09 ± 10,60
Hericium	148,56 ± 7,43
Hericium 50	94,62 ± 4,73

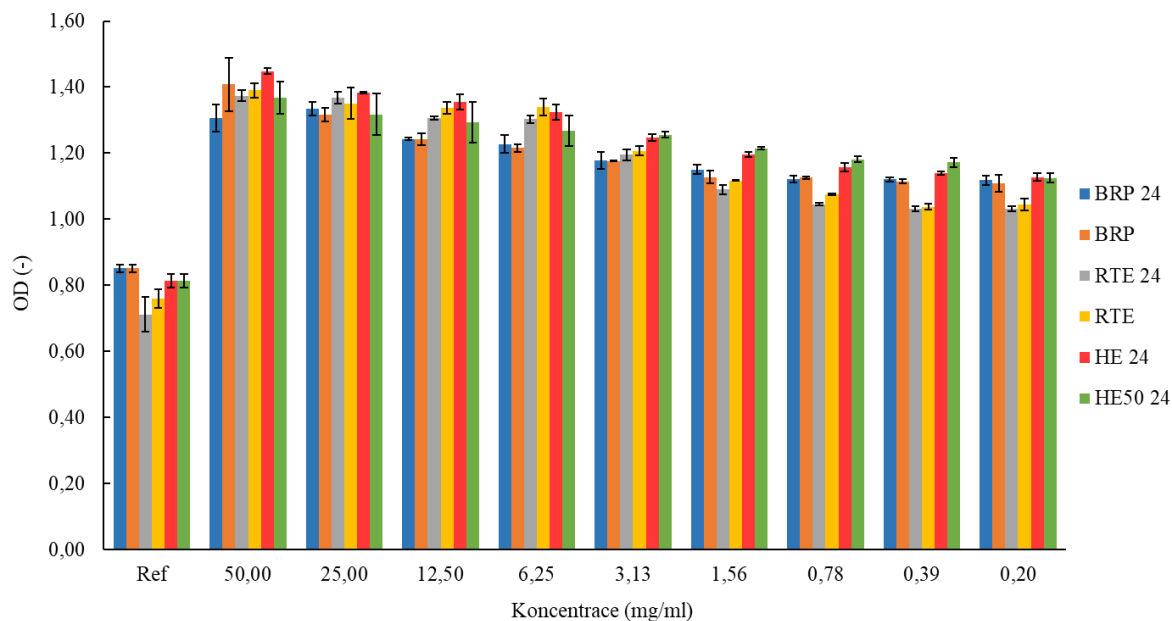
Ve všech vzorcích byla stanovena přítomnost vitaminu C, viz Tabulka 13. Nejvyšší naměřenou hodnotu (212,09 µg/g) vykazoval vzorek Reishi Triterpen Extrakt, dále Hericium (148,56 µg/g), nejmenší naopak Bio Reishi Pulvere (47,28 µg/g). Vitamin C je spolu s vitaminem E přirozeným antioxidantem, lze tedy pozorovat vzájemný vztah mezi celkovou antioxidační aktivitou vzorku, viz Tabulka 10, a detekovaným množstvím vitaminu C. Z hlediska antioxidační aktivity a obsahu vitaminu C byl nejlépe hodnocený vzorek Reishi Triterpen Extrakt, který v případě 24hodinové extrakce vykazoval antioxidační aktivitu 14,92 mg/g. Lze konstatovat, že data z jednotlivých analýz spolu vzájemně korelují. A vitamin C se spolu s dalšími látkami, jako jsou fenolické látky, vitamin E a mnoho dalších podílí na celkové antioxidační účinnosti.

5.5 Antimikrobiální test

Pro stanovení antimikrobiální účinnosti byla použita mikrodiluční bujónová metoda. Vodné extrakty analyzovaných vzorků hub byly podrobeny interakci s vybranými mikroorganismy. Konkrétně byla testována antimikrobiální účinnost vodných extraktů na dvou gramnegativních bakteriích, a to *Serratia marcescens* a *Escherichia coli*, a dvou grampozitivních bakterií, a sice *Micrococcus luteus* a *Staphylococcus epidermidis*.



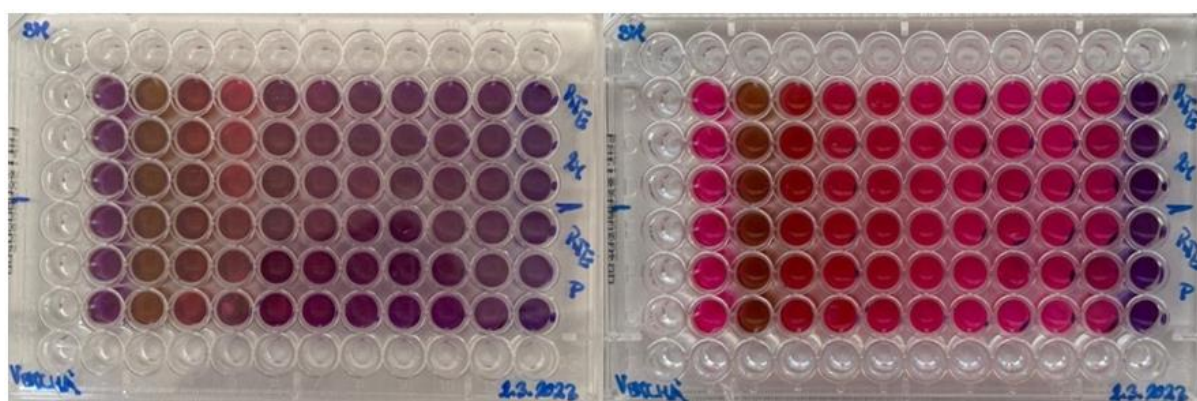
Obrázek 10 Grafické znázornění vlivu různých koncentrací vodných extraktů hub na *Escherichia coli*



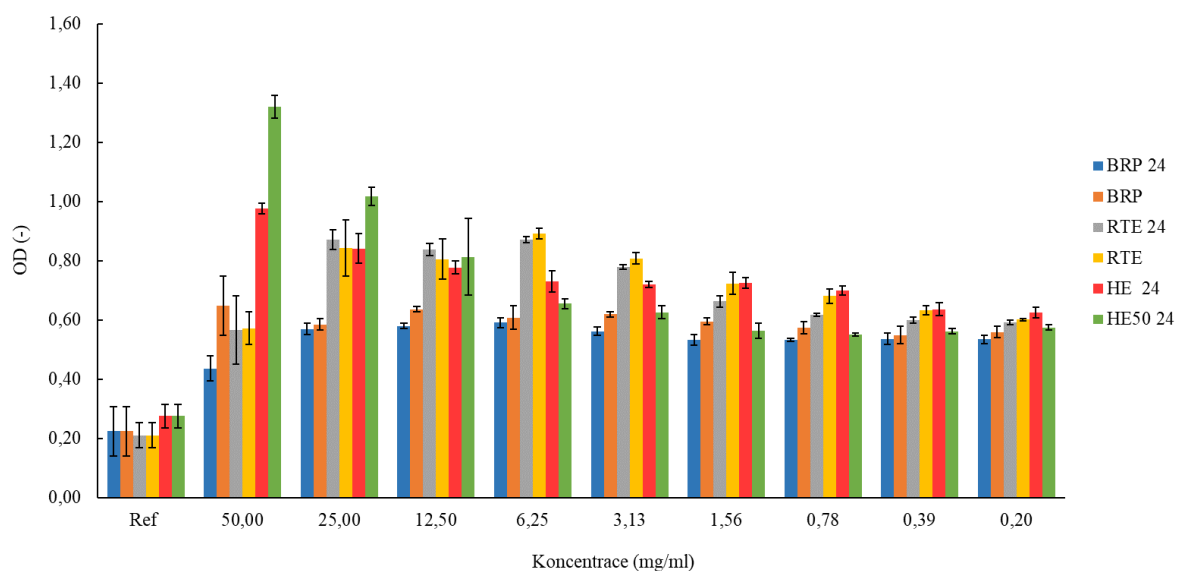
Obrázek 11 Grafické znázornění vlivu různých koncentrací vodných extraktů hub na *Serratia marcescens*

Z grafů na Obrázku 10 a Obrázku 11 můžeme pozorovat, že inhibice bakteriálního růstu nenastala ani v jednom případě gramnegativních bakterií. Vodný extrakt BRP (Bio Reishi Pulvere) způsobil u *Escherichia coli* nárůst bakteriální kultury ve všech koncentracích oproti referenční hodnotě. Vystavení *Escherichia coli* vodným extraktům RTE (Reishi Triterpen Extrakt) o koncentraci 50 mg/ml zapříčinilo nárůst bakteriální kulturu až o 125% při srovnání s referencí bez ohledu na způsob extrakce vzorku. Dále je možné pozorovat trend klesající optické hustoty s klesající koncentrací u vzorků RTE, HE 24 a HE 50 24. Použití různé doby a teploty extrakce neukázalo výrazně odlišné výsledky u vzorků BRP a RTE.

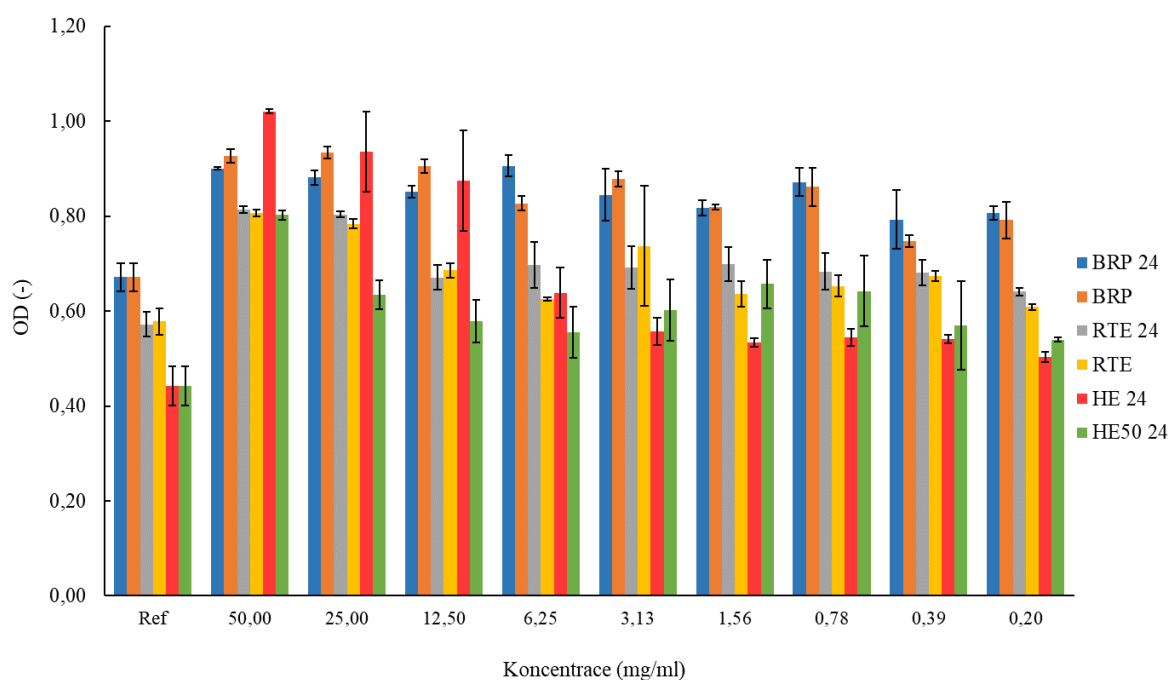
Extrémní nárůst bakteriální kultury lze pozorovat u modelového mikroorganismu *Serratia marcescens*, kdy u všech vodných extraktů hub došlo k signifikantnímu nárůstu bakteriální kultury, která se s klesající koncentrací pouze mírně snižovala. Lze tedy konstatovat, že v případě použitých zástupců gramnegativních bakterií nebyl prokázán antimikrobiální účinek u žádného z testovaných extraktů. Tento závěr nám potvrdil i resazurinový test, který ukázal stimulační účinek vodných extraktů na viabilitu použitých mikroorganismů. Viz Obrázek 12, kdy růžové zbarvení signalizuje viabilitu bakteriálních buněk, které jsou schopné přeměnit modrý resazurin na růžový resorufin.



Obrázek 12 Vlevo destička obsahující bakterii *Serratia marcescens* ihned po napipetování resazurinu, vpravo destička po 30 kultivaci



Obrázek 13 Grafické znázornění vlivu různých koncentrací vodných extraktů hub na *Staphylococcus epidermidis*



Obrázek 14 Grafické znázornění vlivu různých koncentrací vodných extraktů hub na *Micrococcus luteus*

Ani v případě vystavení gram pozitivních bakterií vodným extraktům hub nedošlo v žádném případě k bakteriální inhibici, a neprojeví se tak antimikrobiální účinky látek obsažených v houbách korálovce ježatého a lesklokorky lesklé.

Studie zabývající se antimikrobiálními účinky hub korálovce ježatého a lesklokorky lesklé potvrzují antimikrobiální aktivitu látek v houbách při použití ethanolových, chloformových i v případě vodných extraktů. Vodná extrakce je nejčastější volbou při extrakci polysacharidů z lesklokorky lesklé. Před extrakcí polysacharidů je ale nutné odtučnění houbových prášků působením organických kyselin za účelem odstranění nízkomolekulárních látek. Studie konkrétně popisují bakteriální účinky látek obsažených v plodnici a extraktu z mycelia houby lesklokorky lesklé proti gramnegativní bakterii *Escherichia coli* a gram pozitivnímu mikroorganismu *Micrococcus luteus* a mnoha dalším zástupcům obou skupin. V případě lesklokorky lesklé je extrakce horkou vodou nejběžnější metodou získávání polysacharidů. Postupy extrakce začínají odtučněním houbových prášků organickými rozpouštědly za účelem odstranění sloučenin s nízkou molekulovou hmotností [70,71].

Jedním z důvodů, proč došlo ke stimulaci růstu bakteriálních kultur, může být právě vysoký obsah polysacharidů, které patří mezi hydrofilní látky a jsou tedy solubilní ve vodném prostředí. Rozpuštění velkého množství polysacharidů mohlo tak stimulovat růst bakterií. To lze vnímat i jako pozitivum, velké množství polysacharidů může posloužit jako substrát pro růst a metabolickou aktivitu zdraví prospěšných bakterií, konkrétně probiotických bakterií rodu *Lactobacillus*, osidlujících střevní epitel. Tím, že nestravitelné polysacharidy poslouží

jako prebiotikum pro přátelské bakterie, podpoří nejen jejich viabilitu, ale i četnost, a tak mohou zabránit proliferaci patogenním mikroorganismům [70].

Dalším námětem k diskusi může být růstová křivka mikroorganismů, kdy mohlo dojít k přidavku vodných vzorků hub v nevhodnou dobu a kdy modelové mikroorganismy měly živiny z kultivačního média již spotřebované, ale ještě se nevyskytovaly z hlediska růstové křivky na vrcholu růstové fáze. Přídavek vodných extraktů tak mohly využít jako vhodný substrát pro potřebný růst.

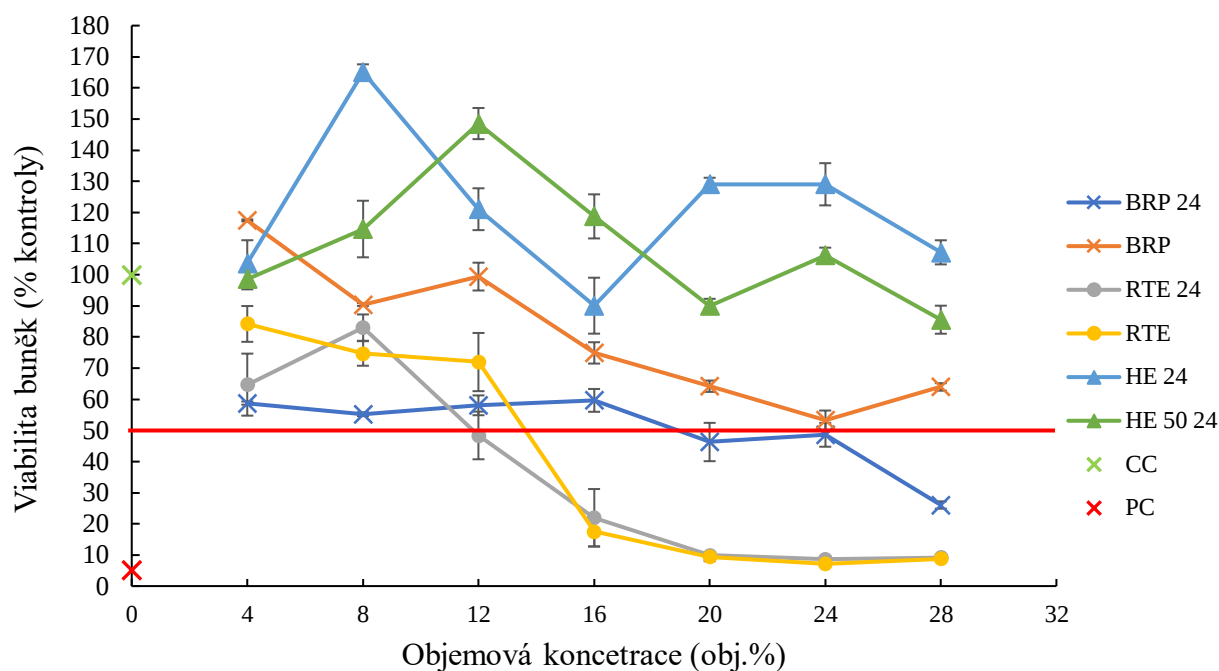
5.6 Stanovení cytotoxicity

Bezpečnost vybraných vodných extraktů byla ověřena pomocí testů cytotoxicity. Cytotoxicita byla testována na buněčné linii imortalizovaných keratinocytů HaCaT a na buněčné linii střevních nádorových buněk Caco-2. Vodné extrakty hub byly testovány v rozmezí koncentrací 4–28 %. Výchozí koncentrace všech testovaných vzorků byla 100 mg/ml. Každý vzorek byl otestován ve třech opakováních, ze kterých byl vypočten průměr a směrodatná odchylka.

5.6.1 MTT test

Proliferace buněk HaCaT a Caco-2 byla stanovena pomocí kolorimetrického MTT, přesný postup je uveden v kapitole 4.15.3. Tento test je založen na schopnosti viabilních buněk produkovat mitochondriální reduktázový enzym sukcinátdehydrogenázu, který je schopný redukovat žluté tetrazoliové barvivo MTT na fialový formazan. Vodné extrakty hub připraveny dle postupu uvedeného v kapitole 4.9 byly testovány v objemových koncentracích, a to 4%, 8%, 16%, 20%, 24% a 28%. Výchozí koncentrace všech vodných extraktů byla 100 mg/ml.

Každý vzorek byl otestován ve třech paralelních opakováních, ze kterých byl vypočten průměr a směrodatná odchylka. Získaná optická hustota byla přepočtena na viabilitu buněk vztaženou na kontrolu buněčného růstu (CC), která představovala 100% viabilitu. Pro porovnání byla provedena i pozitivní kontrola (PC), která představovala hranici 100% mortality.



Obrázek 15 Vliv různých koncentrací vodných extraktů na viabilitu buněk HaCaT při MTT testu

Buněčná linie HaCaT, kterou představují kultivované primární lidské keratinocyty, je běžně používána pro testování kosmetických a farmaceutických preparátů, dále pro testování bezpečnosti potravin nebo sledování toxicity látek [47].

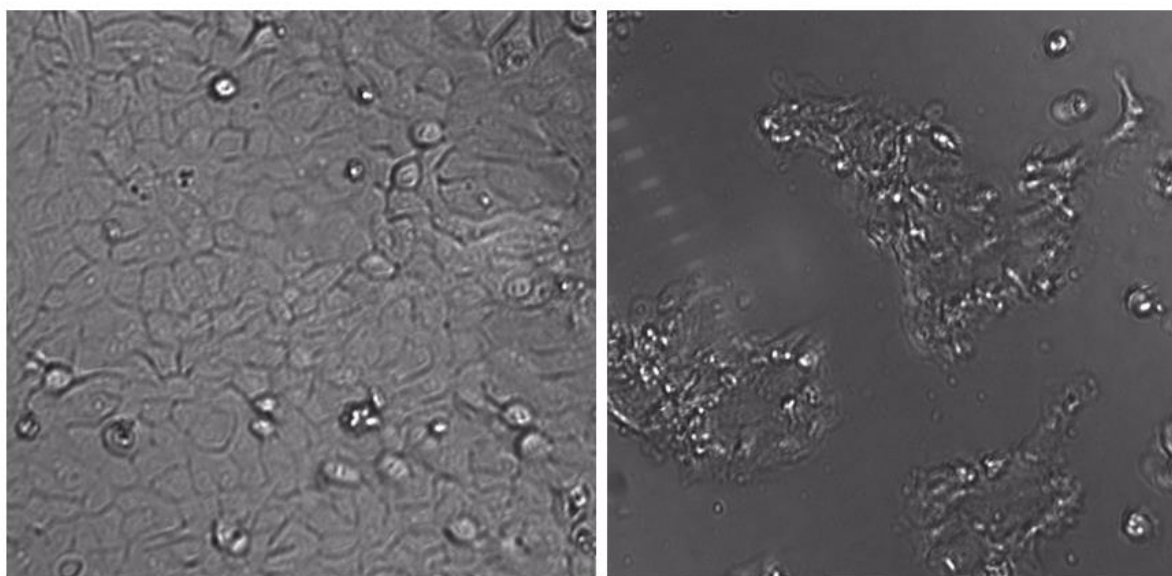
Z Obrázku 15 je zřejmé, že nižší koncentrace vodných extraktů v případě vzorku BRP (Bio Reishi Pulvere), HE 24 (Hericium 24hodinová extrakce) a HE 50 24 (Hericium 50 24hodinová extrakce) zvýšila proliferaci buněk v porovnání s buněčnou kontrolou. U vzorku HE 24 došlo po přidavku 8% vzorku k nárůstu viability o 60 %. Lze tedy konstatovat, že výše zmíněné vzorky v nízkých koncentracích neovlivnily buněčný cyklus primárních keratinocytů.

U vodných extraktů BRP 24 (Bio Reishi Pulvere 24hodinová extrakce), RTE 24 (Reishi Triterpen Extrakt 24hodinová extrakce) a RTE (Reishi Triterpen Extrakt) došlo již při nízkých koncentracích k poklesu životaschopnosti buněk. Zlomový bod nastal při použití vzorků o 16% objemové koncentraci. Taková koncentrace vystavila keratinocyty stresové situaci, buňky ztrácely schopnost proliferace a jejich plazmatická membrána byla narušena. S rostoucí koncentrací vzorku došlo k signifikantnímu poklesu viability, konkrétně u vzorků RTE 24, RTE a BRP 24. Jejich viabilita byla na stejné úrovni s viabilitou pozitivní kontroly.

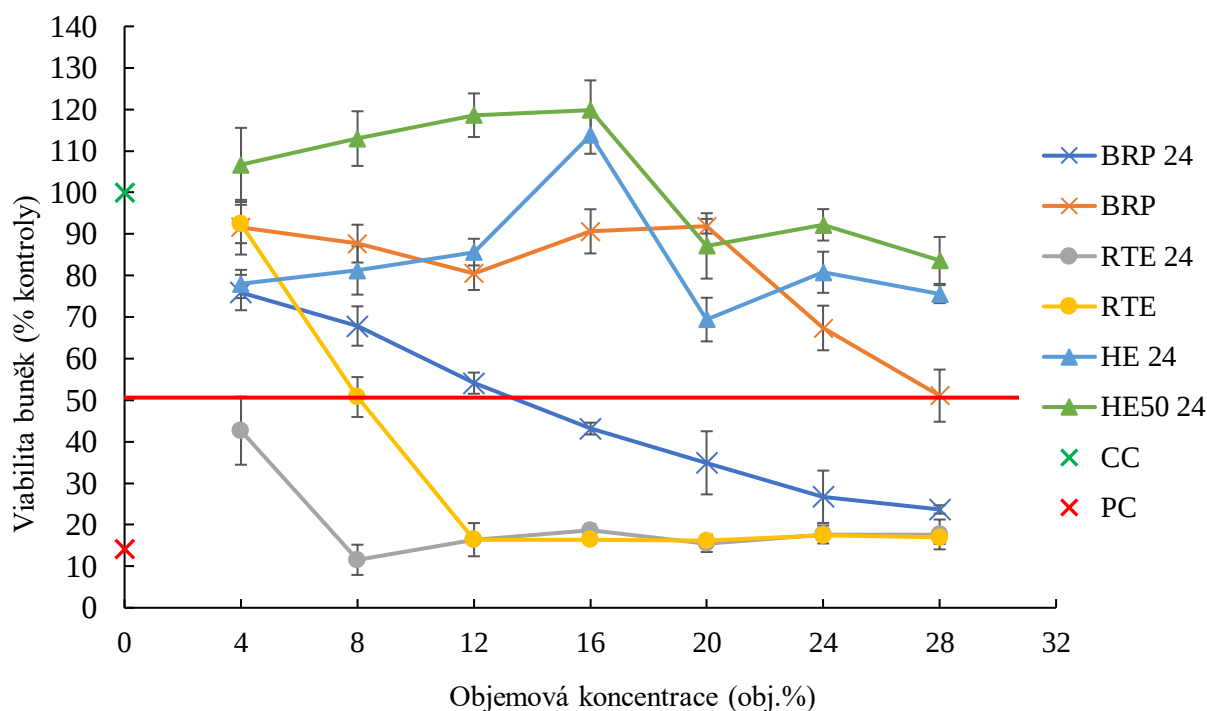
Studie zkoumající ethanolové extrakty houby reishi dospěla k podobným výsledkům. Ethanolové extrakty za účelem aplikace do kosmetického produktu byly nejprve podrobeny testu bezpečnosti na stejné buněčné linii HaCaT jako v našem případě. Při použití ethanolových extraktů došlo až k 90% inhibici životaschopnosti buněk [72].

Jiná studie zabývající se prozánětlivými triterpenoidy a steroidy obsaženými v houbě reishi detekovala kyselinu 3-oxo-5 α -lanosta-8,24-dien-21-ovou jako látku schopnou chránit lidské keratinocyty před fotopoškozením vyvolaným ultrafialovým zářením. Vyizolovaný triterpenoid byl shledán jako vhodný pro aplikaci do prostředku pečujícího o pleť [73].

V případě vodných extraktů připravených z korálovce ježatého nedošlo ani při vyšších koncentracích k poklesu viability více než na 80 %. Z toho lze vyvodit, že vzorek HE 24 a HE 50 24 jsou bezpečné pro konzumaci, a ani při vyšších koncentracích nedochází k signifikantnímu narušení proliferace buněk.



Obrázek 16 Vlevo snímek buněčné kontroly HaCaT buněk (CC), vpravo snímek HaCaT buněk po expozici 28% vodného extraktu RTE



Obrázek 17 Vliv různých koncentrací vodných extraktů na viabilitu Caco-2 při MTT testu

V roce 2012 se vědci z Univerzity v Singapuru věnovali problematice testování ethanolových extraktů z houby reishi na buněčné linii Caco-2. Testování podrobili samotnou plodnou houby reishi a pro porovnání obohatili prášek z plodnice o triterpenoidy. Přestože výzkumníci používali ethanolové extrakty na rozdíl od našeho případu, kdy byly testovány extrakty vodné, lze říci, že v závěru se naše výsledky shodují a houba reishi významně inhibuje životaschopnost buněk. V případě vzorku BRP 24 (Bio Reishi Pulvere 24hodinová extrakce) lze pozorovat, jak s rostoucí koncentrací postupně klesá viabilita buněk. U vzorku RTE 24 (Reishi Triterpen Extrakt 24hodinová extrakce) můžeme pozorovat, že signifikantní inhibice nastala již v případě 8% vodného extraktu a při vyšších koncentracích se viabilita buněk pohybovala na úrovni pozitivní kontroly, která je považována za hranici 100% buněčné smrti. Singapurští vědci přišli s výsledky, že prášek z houby reishi obohacený o triterpenoidy může indikovat v buňkách karcinomu tlustého střeva apoptózu. Toto zjištění může být jedním z důvodů, proč na v našem případě i přidavek 2% vodného extraktu RTE 24 způsobil pokles pod hranici 50% viability, která je hraniční pro označení látky za cytotoxickou [19].

Z grafu, viz Obrázek 17, můžeme dále vyvodit, že u vzorků BRP a RTE extrakce po dobu 24 hodin ukázala, že tyto vzorky i při nízké koncentraci ovlivnily viabilitu buněk více než vzorky BRP a RTE při extrakci horkou vodou.

Salvatore a kolektiv se ve své studii z roku 2020 zabývali dvěma typy extrakce hydrofilních nízkomolekulárních látek z houby reishi a jejich vlivu na buněčnou linii Caco-2 a HTC-116. Zkoumali vliv extrakce při použití horké vody ve srovnání s rychlou dynamickou extrakcí pevná látka-kapalina. Výsledky přinesly zjištění, že použití druhého typu extrakce vede k výraznějšímu vlivu na testované linie. Použitím vyšší teploty při zalití vzorků horkou vodou nedocílíme lepší extrakce nízkomolekulárních látek. Lze tedy polemizovat nad dobou působení vyšší teploty. Delší doba extrakce při vysoké teplotě by mohla způsobit lepší extrakci nízkomolekulárních látek z matrice hub. Tuto úvahu nám potvrzuje výsledek MTT testu, a to tak že vystavení extraktů vysoké teplotě nebylo dostačující, což mohlo v negativní míře ovlivnit obsah bioaktivní látky z hub. Proto použití 24hodinové extrakce vedlo k vyšší inhibici viability buněk karcinomu tlustého střeva [74].

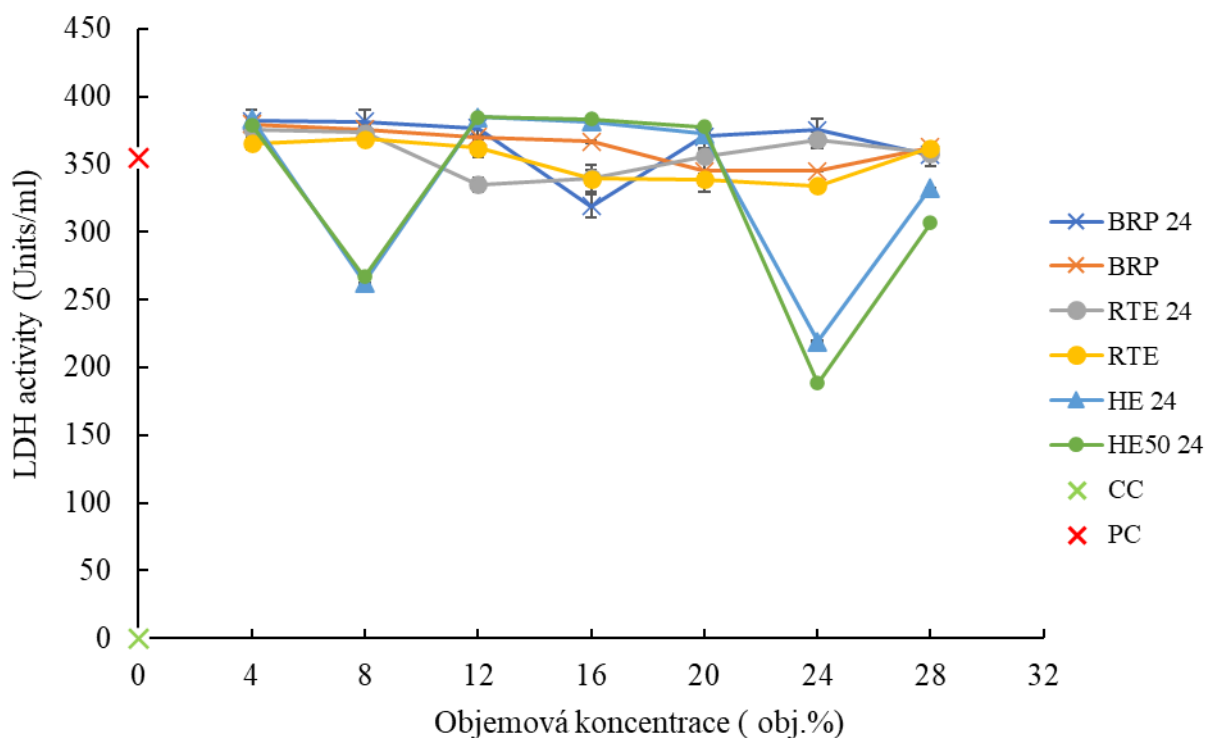
U vzorků HE 24 (Heridium 24hodinový extrakt) a HE 50 (Heridium 50 24hodinový extrakt) lze pozorovat stejný výsledek jako v případě provedení MTT testu na buněčné linii HaCaT. Testovaný vzorek HE 50 u buněčné linie karcinomu tlustého střeva naopak zvýšil viabilitu buněk v nižších koncentracích okolo 10–20 %. Ve vyšších koncentracích jeho viabilita klesla pouze o 10 % v porovnání s kontrolou. U vzorku HE 24 došlo u 16% koncentrace k nejvyššímu stimulu buněk, naopak zlomová byla 20% koncentrace vodného extraktu, kdy došlo k výraznému poklesu viability buněk, a to na hodnotu okolo 75 % v porovnání s kontrolou.

Obecně tedy je možné konstatovat, že houba korálovec ježatý není cytotoxická, a tedy není vhodnou volbou jako chemoterapeutikum, na rozdíl od houby reishi, která prokázala výrazné cytotoxické vlastnosti a lze ji praktikovat jako chemoterapeutikum při léčbě rakoviny.

5.6.2 LDH test

Aktivita laktátdehydrogenázy byla měřena dle postupu uvedeného v kapitole 4.15.4. Tento test je založen na měření aktivity enzymu laktátdehydrogenázy uvolněného do kultivačního média [67]. Pro stanovení byly použity buněčné supernatanty HaCaT, které byly získány odpipetováním z destiček v průběhu MTT testu. Supernatanty z buněčné linie Caco-2 nemohly být použity kvůli přítomnosti pyruvátu v kultivačním médiu, který by při LDH testu zkresloval výsledky.

Všechny vzorky byly otestovány ve třech paralelních opakováních, ze kterých byl vypočten průměr a směrodatná odchylka. Z rovnice kalibrační křivky byla vypočtena výsledná aktivita laktátdehydrogenázy. V grafu na Obrázku 18 je znázorněna aktivita laktátdehydrogenázy, pro porovnání je zahrnuta buněčná kontrola (CC), která neobsahovala žádnou testovanou látku, a dále pozitivní kontrola (PC), kde byl použit 40% ethanol a předpokládá se 100% úmrtnost buněk a nejvyšší aktivita LDH.



Obrázek 18 Aktivita LDH enzymu při použití různých koncentrací vodných extraktů při kultivaci HaCaT

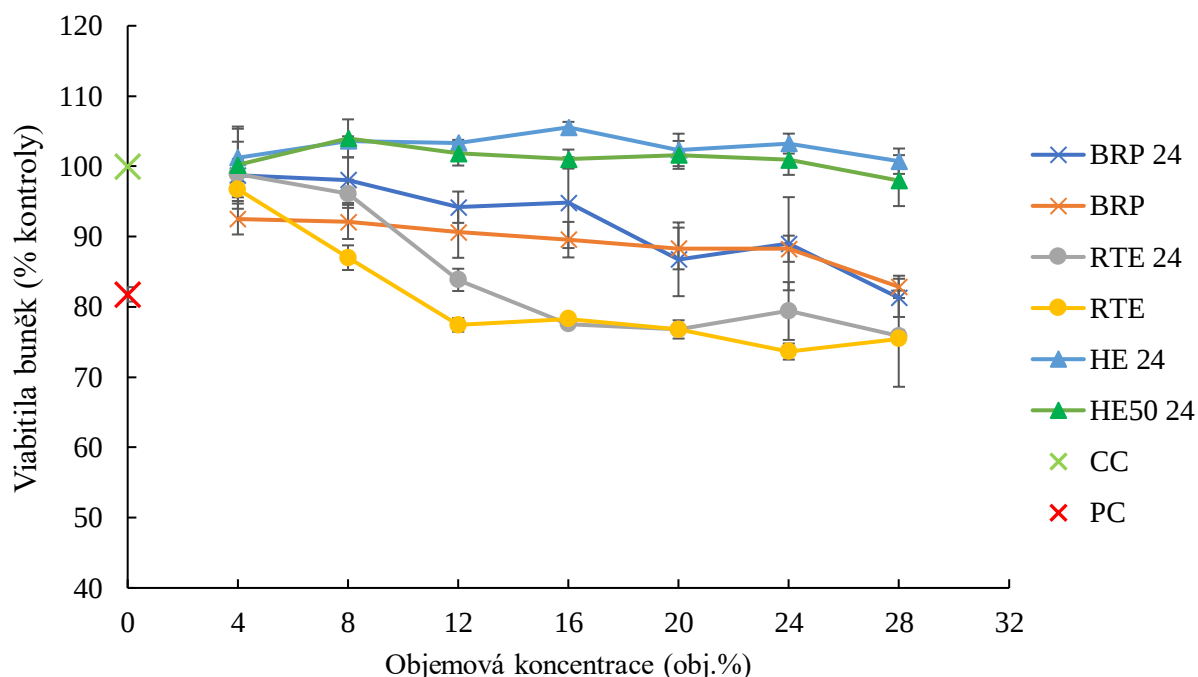
Metoda stanovení LDH aktivity funguje na jiném principu než test buněčné proliferace MTT a je považována za méně citlivější metodu [75]. Při porovnání grafu na Obrázku 15 a grafu na Obrázku 18 můžeme pozorovat, jak spolu jednotlivé testy cytotoxicity do jisté míry korelují. V případě vzorků RTE bez ohledu na extrakci byla provedením MTT testu prokázána výrazná míra cytotoxicity. Na Obrázku 18 vidíme, že stejné vzorky vykazovaly již v malých koncentracích nejvyšší aktivitu laktátdehydrogenázy, která se shodovala s aktivitou pozitivní kontroly. Viabilita buněk po expozici vzorků BRP 24 a BRP se v případě MTT testu lišila, u LDH aktivity můžeme konstatovat, že u vzorků nenastal tak vlivný rozdíl. To může být způsobeno právě citlivostí metody, která je v případě MTT vyšší.

Vzájemný vztah vysoké viability detekované při MTT testu a nízké aktivity laktátdehydrogenázy můžeme pozorovat u vzorků HE 24 a HE 50 24, které naopak na buňky působí do jisté míry protektivně. Toto zjištění nás ještě více ujistilo, že korálovec ježatý je látkou bezpečnou pro potravinářský či kosmetický průmysl, ale protirakovinné účinky nevykazuje ani při vysokých koncentracích.

5.6.3 AlamarBlue test

Viabilita buněk byla dále testována fluorometrickou metodou AlamarBlue, která je založena na nevratné enzymatické reakci, kdy dochází k redukci modrého barviva resazurinu na růžový resorufin. Měření bylo provedeno dle postupu uvedeného v kapitole 4.15.5. Vodné extrakty připraveny dle postupu uvedeného v kapitole 4.9 byly testovány v objemových koncentracích, a to 4%, 8%, 16%, 20%, 24% a 28%. Výchozí koncentrace všech vodných extraktů byla 100 mg/ml.

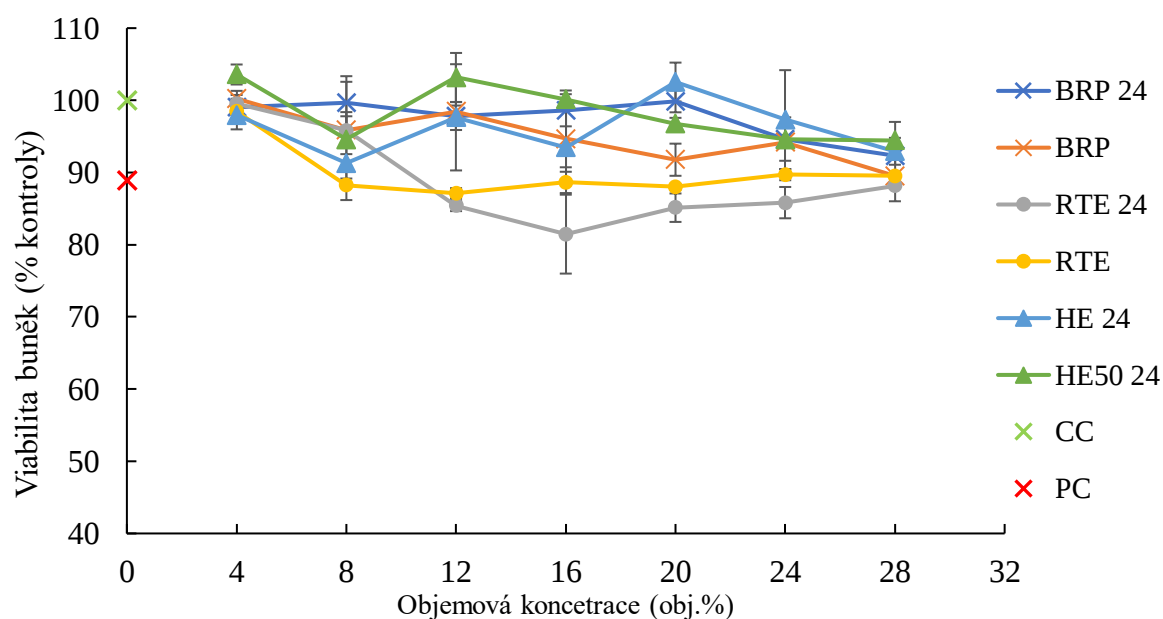
Analyzované vzorky byly otestovány v triplicátech, ze kterých byl vypočten průměr a směrodatná odchylka. Získaná optická hustota byla přepočtena na viabilitu buněk vztaženou na kontrolu buněčného růstu (CC), která představovala 100% viabilitu. Pro porovnání byla součástí testu také pozitivní kontrola (PC), která představuje 100% mortalitu.



Obrázek 19 Vliv různých koncentrací vodných extraktů na viabilitu buněk HaCaT při AlamarBlue testu

Přestože každý z testů cytotoxicity je založen na jiném principu, můžeme při porovnání grafu na Obrázku 15 a grafu na Obrázku 19 zaznamenat analogický trend u vzorků RTE 24 a RTE. Vzorky je nutné porovnávat s pozitivní kontrolou, která by měla značit nejvyšší mortalitu a její viabilita se pohybuje okolo 80 %. U vzorků RTE 24 a RTE došlo dokonce k vyššímu poklesu vitality než v případě pozitivní kontroly. Lze tedy říct, že látky obsažené v houbě reishi měly vyšší cytotoxický účinek na buněčnou linii HaCaT než expozice buněk 40% ethanolu. U vzorků BRP 24 a BRP pozorujeme stejný průběh jako při MTT testu, kdy s rostoucí koncentrací klesá viabilita buněk. Naopak stimulace buněk, a tak nárůst viability je zaznamenán u vzorků HE 24 a HE 50 24, kdy ani buňky vystavené nejvyšší koncentraci neprojevily nižší viabilitu než buněčná kontrola.

Ziemlewska a spol. ve své studii z roku 2022 testovali vodné extrakty hub reishi a korálovce ježatého, jejich výsledky studie korelují s námi vyvozenými závěry. Výzkumníci pozorovali pozitivní zvýšení viability keratinocytů při použití vodného extraktu korálovce o koncentraci 500 $\mu\text{g/ml}$. Ani další testované koncentrace v případě korálovce neovlivnily viabilitu buněk negativním způsobem [76].



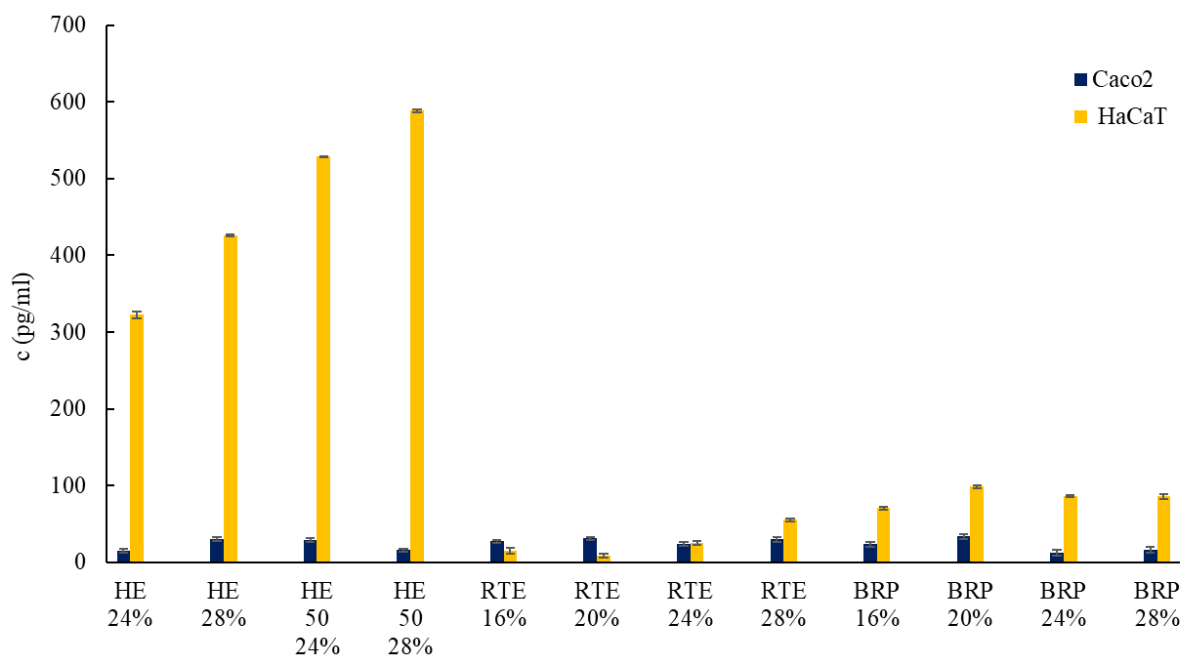
Obrázek 20 Vliv různých koncentrací vodných extraktů na viabilitu buněk Caco-2 při AlamarBlue testu

Test redukce resazurinu na resorufin tedy potvrzuje výsledky i předešlých testů cytotoxicity, vzorky korálovce, konkrétně HE 24 a HE 50 24, neshledává cytotoxickými, a to jak v případě buněčné linie HaCaT, tak v případě buněk tlustého střeva Caco-2, viz Obrázek 20. Na rozdíl od houby reishi, kdy došlo jak u extraktů (RTE 24 a RTE), tak u vzorků pomleté plodnice (BRP 24 a BRP) k ovlivnění viability, lze tedy konstatovat, že houby mají cytotoxické účinky.

5.7 Analýza produkce prozánětlivých interleukinů IL-6 a IL-8

Součástí testování toxického účinku vybraných vzorků hub bylo stanovení produkce prozánětlivých cytokinů IL-6 a IL-8. Pro stanovení byly použity buněčné supernatanty z obou buněčných linií, které byly získány odpipetováním z destiček v průběhu MTT a AlamarBlue testu. Na základě průběžných výsledků testů cytotoxicity, viz kapitola 5.6.1, byly pro toto stanovení vybrány vzorky s 24hodinovou extrakcí, u kterých byl zaznamenán výrazný vliv na viabilitu buněk.

V případě vzorku BRP (Bio Reishi Pulvere) a RTE (Reishi Triterpen Extrakt) byly testovány koncentrace 16%, 20%, 24% a 28%. U HE (Hericium) a HE 50 (Hericium 50) byly vybrány pouze koncentrace 24% a 28%. Při stanovení interleukinů-8 byly součástí komerčního kitu také dvě kontroly (C1 a C2). Přičemž kontrola 1 (C1) značí minimální detekovatelnou koncentraci v analyzovaném vzorku.

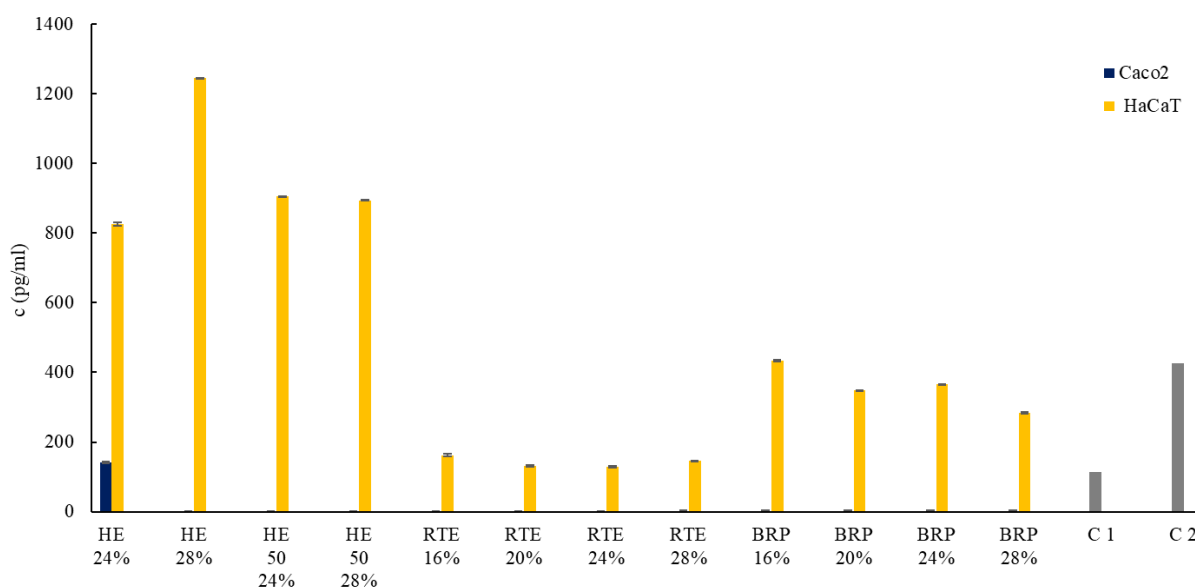


Obrázek 21 Vliv vodných extraktů na produkci cytokinu IL-6 u buněčných linií HaCaT a Caco-2

Z grafu na Obrázku 21 je patrné, že největší produkce prozánětlivého interleukinu-6 (IL-6) nastala po expozici buněčné linie HaCaT vzorkům HE a HE 50, kdy je možné zaznamenat i nárůst koncentrace interleukinu-6 s vyšší koncentrací vzorku. Stejný případ nastal i v případě produkce interleukinu-8 (IL-8), kdy opět vzorky HE a HE 50 prokázaly signifikantně větší produkci prozánětlivého interleukinu-8 oproti vzorkům RTE a BRP. Vzorky RTE a BRP Yang a kolektiv potvrdili imunomodulační účinky ve vodě rozpustného polysacharidu vyizolovaného z čerstvé plodnice korálovce ježatého. Tento polysacharid označený jako HEP-1 vyvolal proliferaci lymfocytů a zvýšil expresi prozánětlivých cytokinů IL-6 i další jako IL-1 β [77].

Interleukin-6 i interleukin-8 jsou signální molekuly, které se podílejí na aktivaci dalších signálních drah vedoucích ke spouštění imunitní odpovědi a produkci imunitních cytokinů [67]. Zajímavým porovnáním jsou testy cytotoxicity, při kterých vzorky HE a HE 50 podporovaly viabilitu buněk i v nízkých koncentracích a při vyšších koncentracích jejich viabilita neklesla pod viabilitu buněčné kontroly. Důvodem může být právě to, že látky obsažené v korálovci ježatém neprojevují protirakovinné účinky na buněčné úrovni, neovlivňují proliferaci a tím jejich viabilitu, ale pracují na úrovni imunomodulačních látek, kdy jako imunostimulátory zvyšují aktivitu NK buněk (přirozených zabijáků) a podporují sekreci prozánětlivých cytokinů.

U buněčné linie Caco-2 došlo k velmi nízké produkci IL-6, vzorky neprokázaly prozánětlivé účinky, nenacházely se v rozmezí kalibrace. U stanovení IL-8 byly v případě buněčné linie Caco-2 získané hodnoty pod detekčním limitem použité metody. Hranici detekce představovala kontrola 1 (C1).



Obrázek 22 Vliv vodných extraktů na produkci cytokinu IL-8 buněčnou linií HaCaT a Caco-2

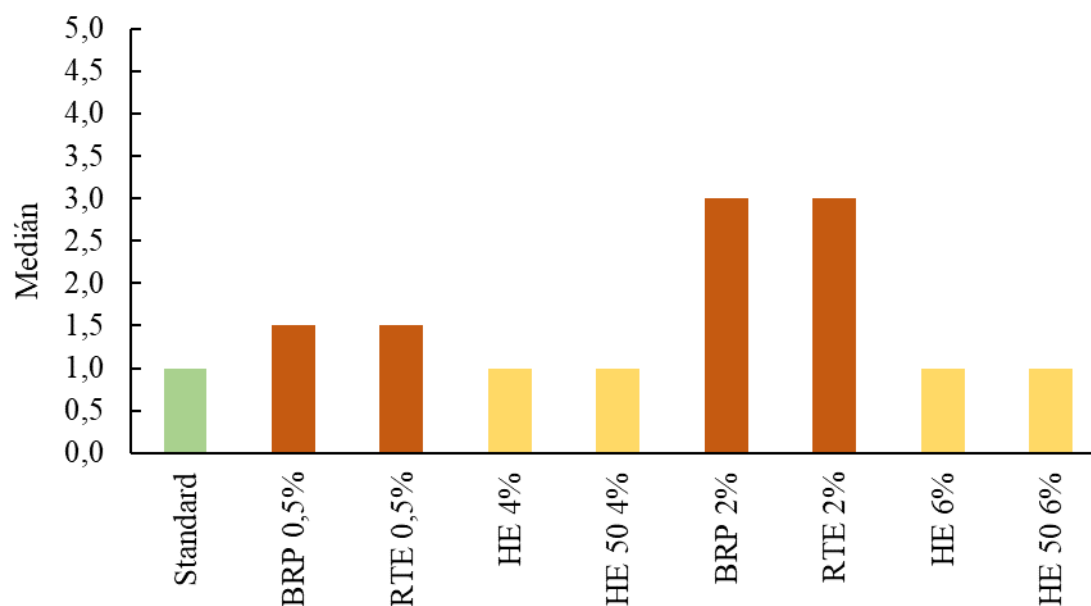
U vzorků RTE byla zjištěna velmi nízká produkce IL-6 a produkce IL-8 se pohybovala na hranici detekce, viz Obrázek 22. Tyto vzorky ovšem vykazovaly mortalitu téměř shodující se s pozitivní kontrolou. Lze tedy konstatovat, že vzorek RTE ovlivňuje životaschopnost buněk zamezením proliferace až k úplnému usmrcení, ale v oblasti imunitní odpovědi neovlivňuje produkci prozánětlivých cytokinů. Stejný trend je možné aplikovat i u vzorku BRP, kdy jeho nižší koncentrace neměly výrazný vliv na vitalitu, ale naopak vykazovaly vyšší produkci IL-8 v porovnání s koncentrovanějšími, které již vitalitu buněk ovlivňovaly.

5.8 Vyhodnocení senzorické analýzy

U připravených polévek s obsahem hub hodnotitelé hodnotili 7 deskriptorů pomocí známkování na stupnici od 1–výborná až po 5–nevyhovující. Podrobné vysvětlení stupnice pro každý deskriptor je zobrazeno v hodnotitelském protokolu viz PŘÍLOHY. V dalších částech je využíván pořadový test. Degustace se zúčastnilo 10 hodnotitelů z nichž bylo 8 žen a 2 muži, mezi kterými se vyskytovali dva kuřáci. Hodnotitelé byli také dotazováni na jejich vztah k instantním polévkám. Čtyři odpověděli, že instantní polévky mají rádi a konzumují je pravidelně. Další čtyři zvolili možnost, že instantní polévky nejsou oblíbeným pokrmem, ale i tak je konzumují. Pouze dva dotazovaní zvolili odpověď, že instantní polévky nemají rádi a nekonzumují je.

5.8.1 Celkový vzhled

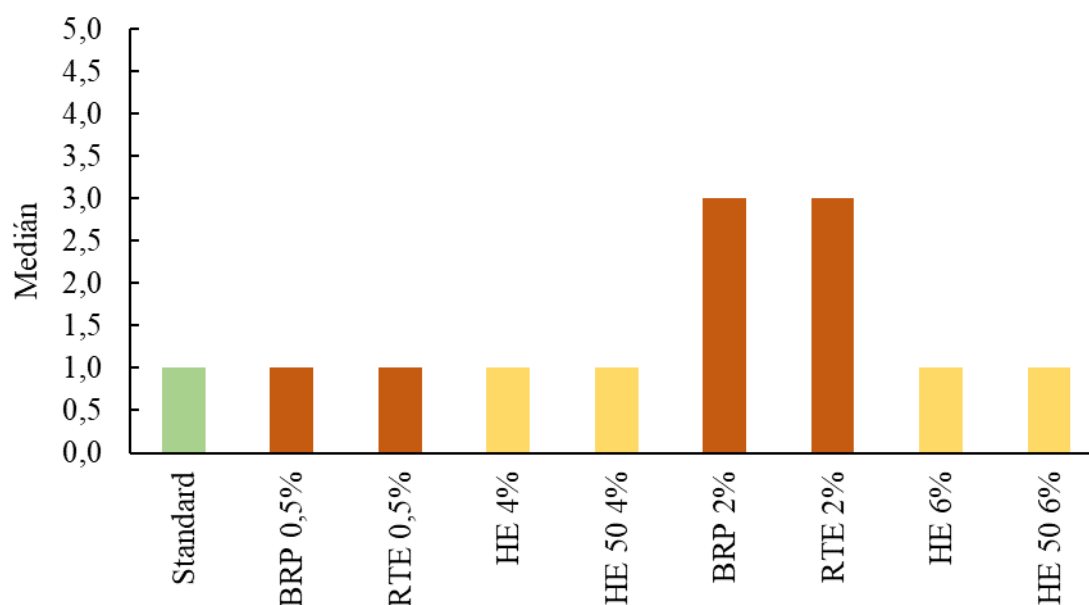
Celkový vzhled je u potravin jeden ze stěžejních parametrů, jelikož udává první dojem a významně ovlivňuje rozhodnutí hodnotitele. Z grafu na Obrázku 23 lze vypožorovat, že nejlepší celkový vzhled s hodnocením 1 měly vzorky HE a HE 50 s obsahem korálovce ježatého v nižší (2%) i vyšší (4%) koncentraci, z toho vyplývá, že vyšší koncentrace neovlivnila celkový vzhled. U lesklokorky lesklé ovšem tato situace nenastala. Nejhorše hodnocené vzorky se známkou 3 byly vzorky BRP a RTE s 2% přídavkem houbových prášků. Z dat vyplývá, že přídavek vyššího množství houbového prášku ze samotné pomleté plodnice, tak houbového extraktu obohaceného triterpenoidy, negativně ovlivňuje celkový vzhled polévky, hodnotitelé tak udělovali horší hodnocení. Dále z dat vyplývá, že u celkového vzhledu nebylo rozhodující, zda se jednalo o houbový prášek nebo o obohacený prášek, ale rozhodovala koncentrace samotného přídavku hub.



Obrázek 23 Výsledky senzoričkého hodnocení celkového vzhledu

5.8.2 Barva

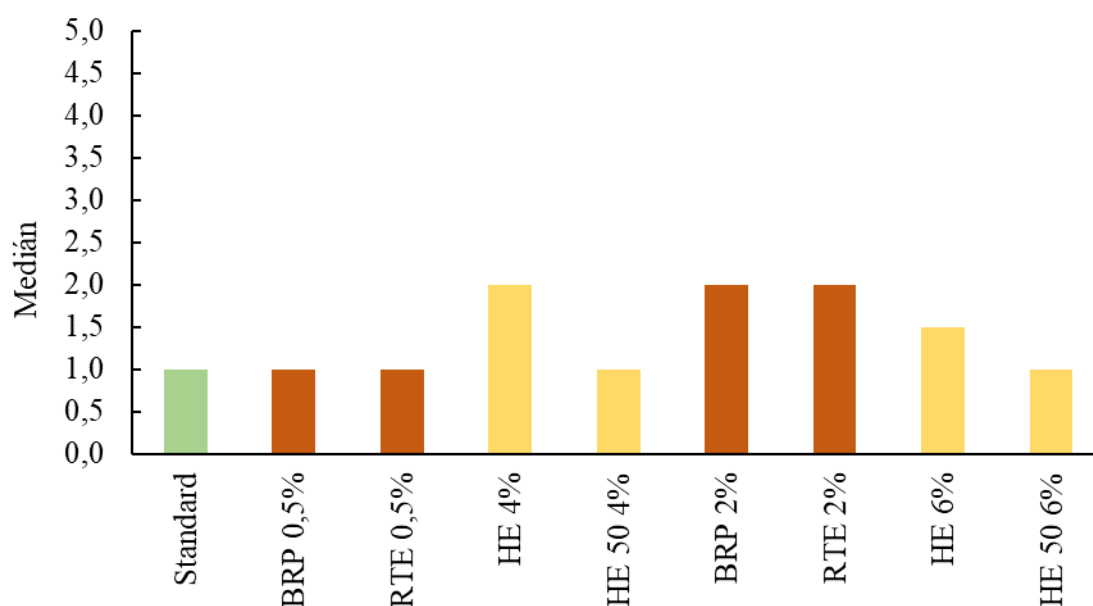
Zabarvení úzce souvisí s celkovým vzhledem. Jak lze vypožorovat z grafu na Obrázku 24 téměř u všech vzorků hodnotitelé usoudili, že barva odpovídala použité zelenině a prášku z hub. Ovšem vzorky BRP a RTE s vyšší koncentrací houbového prášku získaly nejhorší hodnocení, a to známkou 3. Všechny ostatní vzorky byly hodnoceny známkou 1 jako nejlepší. To znamená, že vysoká koncentrace přidané houby negativně ovlivnila zabarvení polévky a pro hodnotitele nebyla atraktivní.



Obrázek 24 Výsledky senzoričkého hodnocení barvy

5.8.3 Konzistence

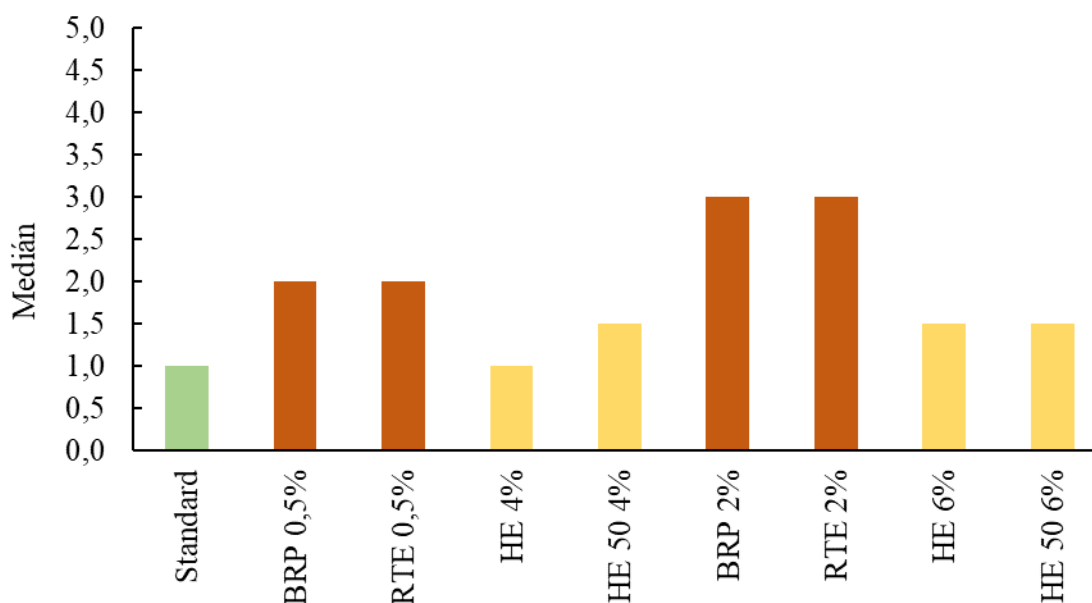
Konzistence připravené polévky měla být lehce zhoustlá. Houba reishi ovlivnila konzistenci pouze ve vyšší koncentraci, jak lze pozorovat na grafu na Obrázku 25. Nižší koncentrace vzorku BRP a RTE byly ohodnoceny známkou 1, dostaly tedy stejně výborné hodnocení jako standard. U korálovce ježatého nastala jiná situace. Z dat vyplývá, že houbový prášek obohacený o 50 % polysacharidů a 20 % β -glukanů (HE 50) měl přijatelnější konzistenci než prášek ze samotné pomleté plodnice (HE). To mohlo být pravděpodobně způsobeno vyšším obsahem polysacharidů, které patří mezi hydrofilní látky a ve vodě se velmi snadno rozpustí, jejich přítomnost tak ovlivnila konzistenci na příjemně hustou. Nejhorší hodnocenými vzorky se známkou 2 byly vzorky s vyšším přídatkem houbových prášků BRP a RTE.



Obrázek 25 Výsledky senzoričského hodnocení konzistence

5.8.4 Vůně

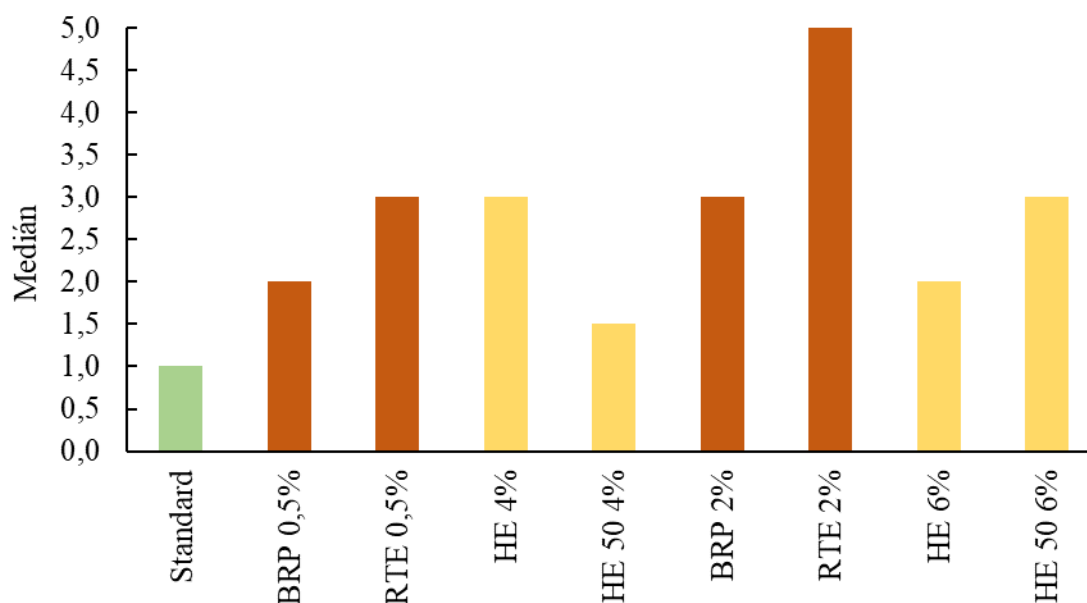
Mezi hodnocené deskriptory byla zařazena také vůně. Ta byla do jisté míry ovlivněna vybranou polévkou. Z grafu na Obrázku 26 je patrné, že přídatek houby reishi v nižší i vyšší koncentraci vůni ovlivnil spíše negativně oproti standardu. Vyšší přídatek vzorků BRP a RTE byl hodnotiteli nejhorší hodnocen, a to známkou 3. Lze pozorovat i rostoucí trend, čím vyšší koncentrace, tím horší hodnocení vzorek získal. Přídatek prášku ze samotné pomleté plodnice korálovce ježatého o nižší koncentraci hodnotitelé ohodnotili výborně jako standard, a to známkou 1.



Obrázek 26 Výsledky senzorického hodnocení vůně

5.8.5 Chut'

Chut' je jeden z hlavních deskriptorů. Z vyhodnocených dat vyplývá, že chut' je závislá na použitém houbovém prášku a jeho koncentraci. U vzorků BRP a RTE dochází k postupnému nárůstu horšího hodnocení v závislosti na zvyšující se koncentraci. Hodnotitelé také hodnotili lépe vzorek BRP, kdy byl použit prášek ze samotné pomleté plodnice houby reishi oproti vzorku RTE, kdy je houbový prášek obohacen o triterpenoidy. Vzorek s vyšší koncentrací RTE byl ohodnocen nejhůře, a to známkou 5. Co se týče koncentrace, stejný trend lze pozorovat i u vzorků korálovce ježatého označených HE a HE 50. Ovšem u nižší koncentrace hodnotitelé udělovali lepší hodnocení vzorku HE 50, což u vyšší koncentrace bylo naopak. To může být způsobeno právě obohacením prášku o 50 % polysacharidů a 20 % β -glukanů. Polysacharidy jsou látky snadno rozpustné ve vodě a jsou nositeli sladké chuti, která naopak mohla podtrhnout chut' použité zeleniny. To může být důvodem, proč tento vzorek byl celkově nejlépe hodnoceným vzorkem se známkou 1, poměrně sladší chut' mohla být pro hodnotitele atraktivnější než stejný vzorek s nižší koncentrací, viz Obrázek 27.

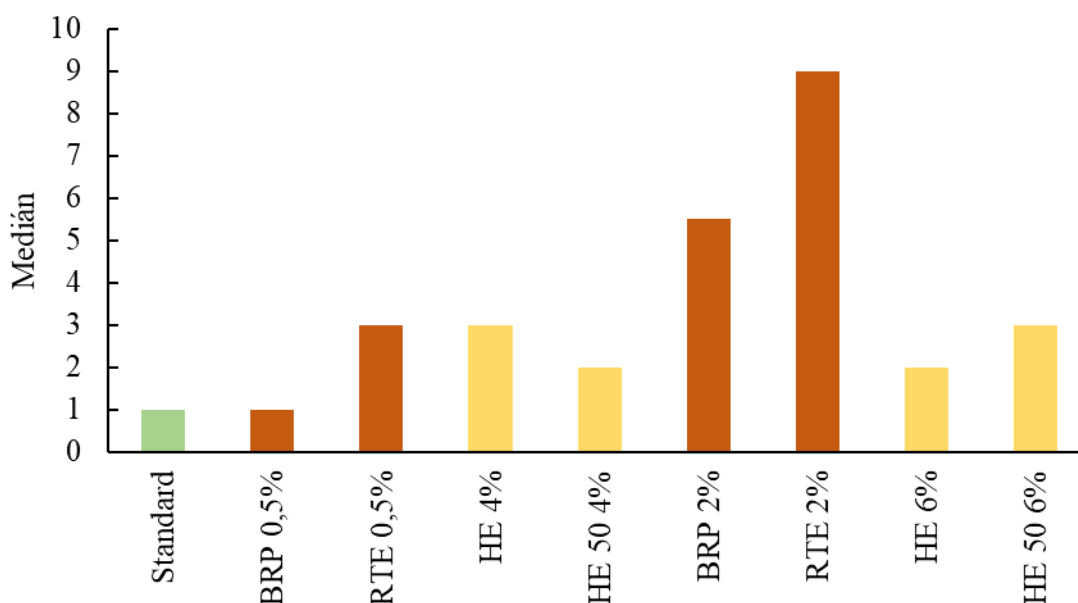


Obrázek 27 Výsledky senzorického hodnocení chuti

5.8.6 Hořkost

Pro hodnocení hořkosti byla využita bodová stupnice od 1 do 10, z čehož označení 1 znamená nejméně hořký a označení 10 nejvíce hořký. Při sledování tohoto deskriptoru vyplývají podobné trendy jako u chuti. Vzorek RTE byl pro hodnotitelé více hořký než vzorek BRP. Na základě koncentrace lze pozorovat rostoucí trend, což znamená, že se zvyšující se koncentrací byla hořkost intenzivnější. Nejhorší hodnoceným vzorkem se známkou 9 byl 2% přídavek houbového extraktu obohaceného o triterpenoidy (RTE). V případě korálovce došlo k podobné situaci jako při hodnocení chuti. Při nízkých koncentracích hodnotitelé hodnotili prášek obohacený o polysacharidy a β -glukany (HE 50) jako méně hořký než prášek ze samotné pomleté plodnice (HE). Ovšem při vyšší koncentraci vykazoval vzorek HE menší hořkost než vzorek HE 50.

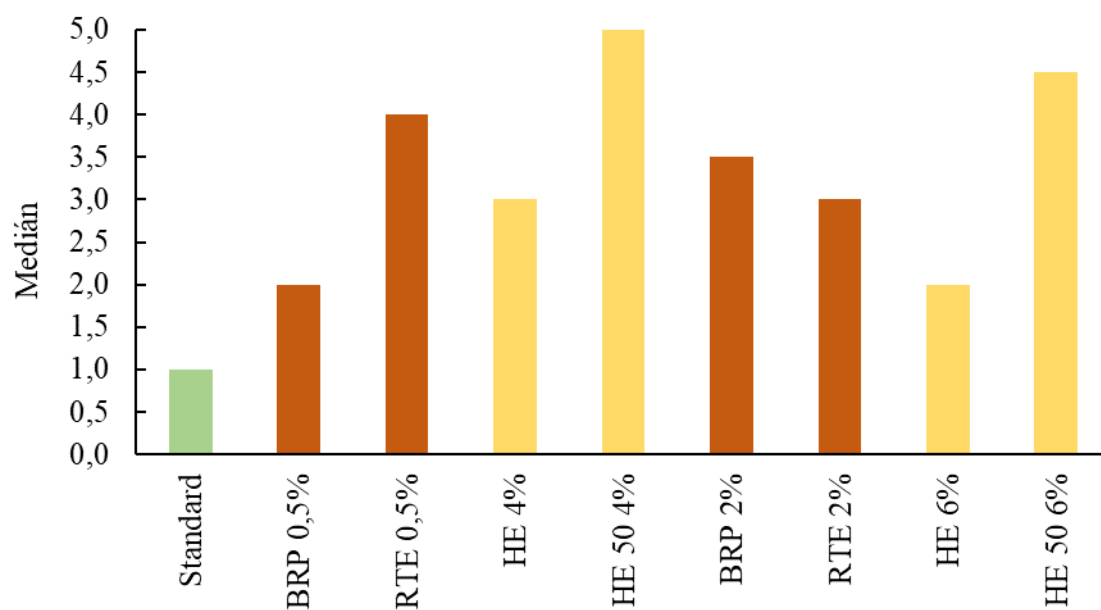
Nositelem hořké chuti jsou v případě prášku z houby lesklokorky lesklé triterpenoidy, kterými byl prášek obohacen. Hořkost způsobuje konkrétně kyselina ganoderová a kyselina lucidenová [78].



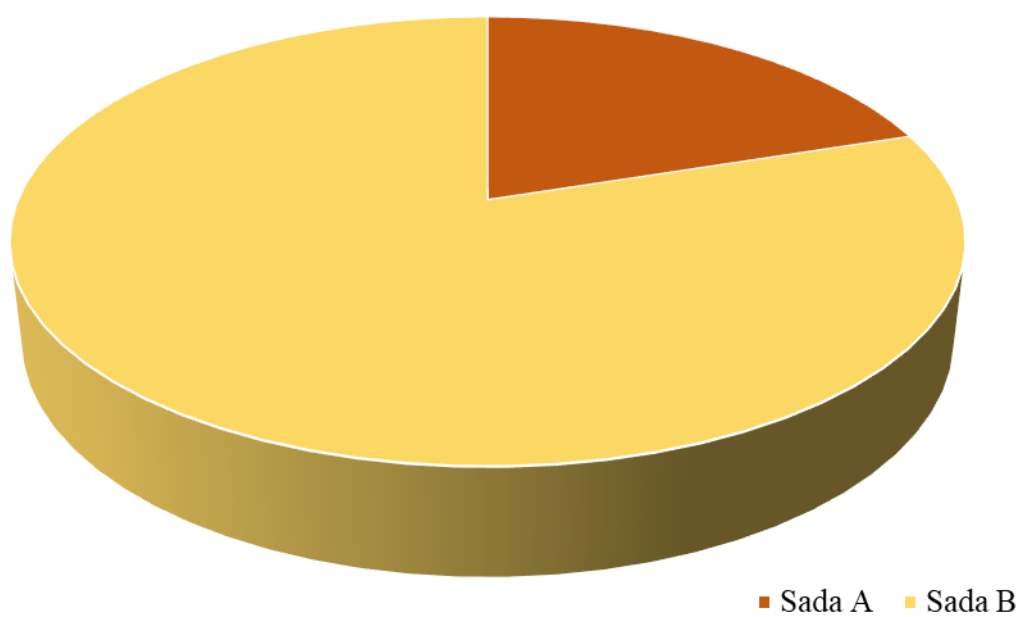
Obrázek 28 Výsledky senzorického hodnocení hořkosti

5.8.7 Celková přijatelnost

Při hodnocení celkové přijatelnosti měli hodnotitelé za úkol vzít v potaz všechny deskriptory a na jejich základě určit celkovou přijatelnost vzorku. Z vyhodnocených dat vyplývá, že nejprijatelnější je standard. Nejlépe hodnoceným vzorkem se známkou 2 byl 2% přídavek prášku z pomleté plodnice houby reishi (BRP), stejné hodnocení získal i vzorek, který obsahoval 6% přídavek prášku z pomleté plodnice korálovce ježatého (HE). Nejhorší byl hodnocen vzorek HE 50 o koncentraci 4 %. Z tohoto hodnocení vyplývá, že při aplikaci těchto vybraných druhů hub a jejich forem je nutno brát v potaz nejenom jejich biologické účinky, ale také senzorické vlastnosti. Cílem je tedy dosáhnout co nejlepšího senzorického hodnocení a zároveň polévku obohatit o látky, které houby obsahují. Na závěr dotazníku byli hodnotitelé tázáni, které sadě polévek by dali přednost. Z grafu na Obrázku 30 vyplývá, že většina hodnotitelů by upřednostnila sadu B, tedy sadu, ve které byly použity vzorky korálovce ježatého ve formě prášku z pomleté plodnice (HE) a prášku obohaceného o polysacharidy a β -glukany (HE 50).



Obrázek 29 Výsledky senzoričkého hodnocení celkové přijatelnosti vzorku



Obrázek 30 Výsledky volby výběru mezi sadami

6 ZÁVĚR

Předložená diplomová práce se zabývá charakterizací nutričně významných látek ve vybraných vzorcích hub z hlediska biologického účinku a jejich vlivu na lidské buněčné linie. V neposlední řadě je zkoumán přídavek prášku z plodnice vybraných druhů hub nebo přídavek houbového extraktu do instantní zeleninové polévky za účelem vylepšení nutričního skóre potravinového doplňku.

Teoretická část diplomové práce charakterizuje houby, pojednává o jejich vývoji a taxonomickém zařazení do systému živé říše, popisuje jejich morfologické znaky a zabývá se účinky jedlých a léčivých hub. Dále se orientuje na detailní popis vybraných zástupců vzácných druhů hub, a to konkrétně na lesklokorku lesklou, houževnatce jedlého, trsnatce lupenitého, penízovku sametonohou, korálovce ježatého a hlívu ústřičnou, a jejich účinky, využití a možnosti aplikace v potravinářství či farmacii. Dotýká se problematiky negativního vlivu hub na zdraví konzumenta. Dále informuje o metodách využití hub v potravinářském průmyslu a jejich technologickém zpracování do práškové podoby metodou “shell broken“.

V poslední řadě se orientuje na možnosti testování toxicity *in vitro* a poskytuje stručný přehled běžně používaných testů cytotoxicity, při ověřování bezpečnosti potravin, léčiv, zavádění nových kosmetických přípravků nebo stanovení cytotoxického účinku apod.

V první části experimentální práce byly připraveny vodné extrakty ze čtyř vzorků hub v práškové formě, a to Bio Reishi Pulvere (BRP), Reishi Triterpen Extrakt (RTE), Hericium (HE) a Hericium s přídavkem 50 % polysacharidů a 20 % β -glukanů (HE 50). U vzorků BRP a RTE byly provedeny dva typy extrakce, a to 24hodinová extrakce (BRP 24 a RTE 24) a extrakce zalití horkou vodou. Na základě průběžných výsledků byla u vzorků HE a HE 50 použita pouze 24hodinová extrakce. Vodné extrakty byly z hlediska obsahu biologických látek charakterizovány pomocí běžných spektrofotometrických metod. Stanovení celkového obsahu sacharidů bylo provedeno metodou dle Duboise, stanovení redukujících sacharidů metodou Nelson-Somogyi a pro analýzu obsahu bílkovin bylo použito stanovení dle Biureta. Nejvyšší obsah celkových sacharidů byl zjištěn u vzorku RTE 24, a to $903,54 \pm 7,58$ mg/g, u stejného vzorku byl stanoven i nejvyšší obsah redukujících sacharidů ($47,69 \pm 1,69$ mg/g) a nejvyšší obsah bílkovin ($83,77 \pm 3,34$ mg/g). Pro stanovení antioxidační účinnosti vodných extraktů z hub byla použita metoda využívající roztok ABTS, kdy byla analyzována schopnost vzorku zhaset kation-radikál ABTS^{•+}. Největší antioxidační aktivita ($18,64 \pm 0,64$ mg/g) i nejvyšší obsah celkových polyfenolů ($13,75 \pm 1,14$ mg/g) byl zjištěn u vzorku RTE. Druhý vzorek

vykazující nejvyšší antioxidační účinnost a obsah polyfenolů byl stejný vzorek RTE, ale s použitou 24hodinovou extrakcí.

V další části experimentální práce byly vzorky ve formě prášku analyzovány z hlediska obsahu celkových glukanů, α -glukanů a β -glukanů. Nejvíce celkových glukanů obsahoval vzorek Bio Reishi Pulvere (okolo 73 %). V tomto vzorku bylo obsaženo až 71 % β -glukanů. Vzorek Hericium 50 měl obsahovat minimálně o 20 % více β -glukanů než vzorek Hericium, skutečný rozdíl činil 29,5 % β -glukanů.

Vzorky hub byly dále podrobeny vysokoúčinné kapalinové chromatografii, kdy byly analyzovány z hlediska obsahu lipofilních látek a obsahu množství vitamínu C. Nejvíce lipofilních látek jako provitamin D₂, provitamin A, koenzym Q₁₀ a karotenoid lykopen bylo zaznamenáno ve vzorku Hericium. Použitá metoda extrakce nebyla dostačující pro analýzu lipofilních látek ve všech vzorcích, v případě vzorku Hericium 50 nebyly detekovány lipofilní látky ve vzorku. Koncentrace vitamínu C ve vzorcích hub byla detekována také pomocí HPLC. Nejvíce vitamínu C obsahoval vzorek Reishi Triterpen Extrakt, a to $212,09 \pm 10,60$ mg/g.

Biologický účinek vybraných vzorků hub byl zkoumán provedením antimikrobiálního testu a několika testů cytotoxicity. Pro stanovení antimikrobiální účinnosti byl proveden antimikrobiální test na čtyř modelových mikroorganismech, dvou gramnegativních bakteriích, a to *Serratia marcescens* a *Escherichia coli*, a dvou grampozitivních mikroorganismech, a sice *Micrococcus luteus* a *Staphylococcus epidermidis*. Vodné extrakty hub neprojevovaly inhibiční účinnost u žádného z vybraných modelových mikroorganismů. Antimikrobiální účinnost připravených extraktů vzorků hub nebyla v našem případě potvrzena. Naopak lze polemizovat o využití těchto extraktů pro zvýšení viability prospěšných bakterií střevní mikrobioty, jako je například *L. plantarum*. Pro stanovení cytotoxicity byl proveden test buněčné proliferace, test aktivity enzymu laktátdehydrogenázy a test životaschopnosti buněk na buněčné linii HaCaT, kterou představují imortalizované keratinocyty, a buněčné linii Caco-2 tvořenou buňkami karcinomu tlustého střeva. Na základě těchto testů vykazoval vzorek RTE 24 nejvyšší cytotoxicitu a lze ho považovat za chemoterapeutikum.

Z hlediska produkce prozánětlivých cytokinů IL-6 a IL-8, které představují důležité signální molekuly v imunitní odpovědi na akutní zánět nebo infekci, byla signifikantní produkce těchto glykoproteinových molekul stanovena u vzorků korálovce ježatého HE a HE 50 po expozici buněčné linie HaCaT.

V rámci aplikace prášků z hub byly připraveny paštiky dle běžné receptury, které byly obohaceny houbovými prášky Bio Reishi Pulvere a Reishi Triterpen Extrakt. Kombinace masa a houbových prášků z lesklokorky lesklé nebyla vyhovující. Při senzorické analýze byly

otestovány dva adekvátní přídavky každého vzorku do sypké směsi komerčně dostupné instantní polévky zeleninového základu. Z výsledků senzorického hodnocení byly nejlépe hodnoceny polévky s nižším přídavkem vzorku BRP a HE. Z výsledků dotazování hodnotitelů vyplynulo, že by 80 % hodnotících upřednostnilo polévky s přídavkem houbových prášků z korálovce ježatého. Přídavek houbového prášku by pro konzumenta mohl být prospěšný jak z důvodu biologických účinků hub, jako jsou antioxidační vlastnosti nebo protirakovinné účinky, ale také z hlediska chuťové atraktivity. Přídavek houbového prášku by mohl pomoci konzumentovi v případě dysbiózy střevní mikrobioty. Díky vysokému obsahu polysacharidů je schopen tento přídavek podpořit viabilitu i četnost zdraví prospěšných bakterií, a zajistit tak konzumentovi lepší kondici gastrointestinálního traktu, a tím také důležitou psychickou pohodu.

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] KOUKOL, Ondřej. Původ hub. *ŽIVA* [online]. Academia, 2017, (5), 198 [cit. 2023-02-06]. Dostupné z: <https://www.ziva.avcr.cz/2017-5/puvod-hub.html>
- [2] SEMERDŽIEVA, Marta a Jaroslav VESELSKÝ. *Léčivé houby dříve a nyní*. Praha: Academia, 1986. ISBN 21-129-86.
- [3] JABLONSKÝ, Ivan, Václav ŠAŠEK a Martin KOUDELA. *Jedlé a léčivé houby a jak je pěstovat*. Praha: Profi Press, 2019. ISBN 978-80-88306-03-0.
- [4] JABLONSKÝ, Ivan a Václav ŠAŠEK. *Jedlé a léčivé houby: pěstování a využití*. Praha: Brázda, 2006. ISBN 80-209-0341-0.
- [5] NARANJO-ORTIZ, Miguel A. a Toni GABALDÓN. Fungal evolution: diversity, taxonomy and phylogeny of the Fungi. *Biological Reviews* [online]. 2019, 29, **94**(6), 2101-2137 [cit. 2023-02-06]. ISSN 1464-7931. Dostupné z: doi:10.1111/brv.12550
- [6] BABULA, Petr. *Archebakterie, bakterie, houby, protista*. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, 2008. ISBN 978-80-7305-057-3.
- [7] JELÍNEK, Jan. *Biologie prokaryot, nižších a vyšších rostlin, hub*. 4. dopl. vyd. Olomouc: Nakladatelství Olomouc, 1997. ISBN 80-718-2026-1.
- [8] SVRČEK, Mirko. *Houby*. 5. české vyd. [Praha]: Aventinum, 2005, c1996. Průvodce přírodou (Aventinum). ISBN 80-868-5808-1.
- [9] KOUT, Jiří. *Vybrané kapitoly z mykologie*. V Plzni: Západočeská univerzita, Ústav celoživotního vzdělávání, 2014. ISBN 978-80-261-0349-3.
- [10] VÁŇA, Pavel. *Léčivé houby podle bylináře Pavla*. Praha: Eminent, 2003. ISBN 80-728-1113-4.
- [11] KALINA, Tomáš a Jiří VÁŇA. *Sinice, řasy, houby, mechorosty a podobné organismy v současné biologii*. Praha: Karolinum, 2005. ISBN 80-246-1036-1.
- [12] SOCHA, Radomír a Aleš VÍT. *Houby z Boží lékárny: léčivé houby v terapii a kuchyni : fotoatlas 100 druhů hub s popisem jejich léčivých účinků a s recepty na nejen kulinářské zpracování*. Praha: Eminent, 2020. ISBN 978-80-7281-551-7.
- [13] RONCERO-RAMOS, Irene a Cristina DELGADO-ANDRADE. The beneficial role of edible mushrooms in human health. *Current Opinion in Food Science* [online]. 2017, **14**, 122-128 [cit. 2023-02-09]. ISSN 22147993. Dostupné z: doi:10.1016/j.cofs.2017.04.002
- [14] KEIZER, Gerrit J. *Houby: encyklopedie*. 2. vyd. Čestlice: Rebo, 2005. Encyklopedie (Rebo). ISBN 80-723-4479-X.

- [15] SOCHA, Radomír a Alexandr JEGOROV. *Encyklopedie léčivých hub*. Praha: Academia, 2014. ISBN 978-80-200-2312-4.
- [16] GALAPPATHTHI, Mahesh C. A., Nimesha M. PATABENDIGE, Bhagya M. PREMARATHNE, et al. A Review of Ganoderma Triterpenoids and Their Bioactivities. *Biomolecules* [online]. 2023, **13**(1) [cit. 2023-02-06]. ISSN 2218-273X. Dostupné z: doi:10.3390/biom13010024
- [17] KOZARSKI, Maja, Anita KLAUS, Leo van GRIENSVEN, Dragica JAKOVLJEVIC a Nina TODOROVIC. Mushroom β -glucan and polyphenol formulations as natural immunity boosters and balancers: nature of the application. *Food Science and Human Wellness* [online]. 2023, **12**(2), 378-396 [cit. 2023-02-06]. ISSN 2213-4530. Dostupné z: doi:10.1016/j.fshw.2022.07.040.
- [18] ZHAO, Ruolin, Qilong CHEN a Yu-min HE. The effect of Ganoderma lucidum extract on immunological function and identify its anti-tumor immunostimulatory activity based on the biological network. *Scientific Reports* [online]. 2018, **8**(1) [cit. 2023-02-06]. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/s41598-018-30881-0
- [19] RUAN, Weimei a David G. POPOVICH. *Ganoderma lucidum triterpenoid extract induces apoptosis in human colon carcinoma cells (Caco-2)* [online]. 2012, **2**(3), 203-209 [cit. 2023-02-06]. ISSN 22105239. Dostupné z: doi:10.1016/j.bionut.2012.03.004
- [20] VALÍČEK, Pavel. *Houby a jejich léčivé účinky*. Benešov: Start, 2011. ISBN 978-80-86231-54-9.
- [21] DOMINGO, Guido, Luca CHIODAROLI, Simone PAROLA, Milena MARSONI, Marcella BRACALE a Candida VANNINI. Proteomic characterization of Shiitake (*Lentinula edodes*) post-harvest fruit bodies grown on hardwood logs and isolation of an antibacterial serine protease inhibitor. *Fungal Biology* [online]. 2023, **127**(1-2), 881-890 [cit. 2023-02-06]. ISSN 18786146. Dostupné z: doi:10.1016/j.funbio.2022.11.004
- [22] MAU, Jeng-Leun, Jim TSENG, Cheng-Rong WU, Chien-Hung CHEN a Sheng-Dun LIN. Chemical, nutritional, and bioactive compositions of fresh, washed, and blanched shiitake. *Czech Journal of Food Sciences* [online]. 2021, **39**(6), 426-434 [cit. 2023-02-06]. ISSN 12121800. Dostupné z: doi:10.17221/214/2020-CJFS
- [23] ROSZCZYK, Aleksander, Jadwiga TURŁO, Radosław ZAGOŹDŹON a Beata KALETA. Immunomodulatory Properties of Polysaccharides from *Lentinula edodes*. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2022, **23**(16) [cit. 2023-02-06]. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms23168980

- [24] KOUR, Harpreet, Divjot KOUR, Satvinder KOUR, et al. Bioactive compounds from mushrooms: Emerging bioresources of food and nutraceuticals. *Food Bioscience* [online]. 2022, **50** [cit. 2023-02-06]. ISSN 22124292. Dostupné z: doi:10.1016/j.fbio.2022.102124
- [25] GUILLAMÓN, Eva, Ana GARCÍA-LAFUENTE, Miguel LOZANO, Matilde D'ARRIGO, Mauricio A. ROSTAGNO, Ana VILLARES a José Alfredo MARTÍNEZ. Edible mushrooms: Role in the prevention of cardiovascular diseases. *Fitoterapia* [online]. 2010, **81**(7), 715-723 [cit. 2023-02-06]. ISSN 0367326X. Dostupné z: doi:10.1016/j.fitote.2010.06.005
- [26] ANTONÍN, Vladimír. *Houby jako lék*. Praha: Ottovo nakladatelství, 2013. ISBN 978-80-7451-257-5.
- [27] WU, Jian-Yong, Ka-Chai SIU a Ping GENG. Bioactive Ingredients and Medicinal Values of *Grifola frondosa* (Maitake). *Foods* [online]. 2021, **10**(1) [cit. 2023-02-06]. ISSN 2304-8158. Dostupné z: doi:10.3390/foods10010095
- [28] HE, Xirui, Xiaoxiao WANG, Jiacheng FANG, et al. Polysaccharides in *Grifola frondosa* mushroom and their health promoting properties: A review. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 2017, **101**, 910-921 [cit. 2023-02-06]. ISSN 01418130. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijbiomac.2017.03.177
- [29] GARCIA, Juliana, Francisca RODRIGUES, Maria José SAAVEDRA, Fernando M. NUNES a Guilhermina MARQUES. Bioactive polysaccharides from medicinal mushrooms: A review on their isolation, structural characteristics and antitumor activity. *Food Bioscience* [online]. 2022, **49** [cit. 2023-02-06]. ISSN 22124292. Dostupné z: doi:10.1016/j.fbio.2022.101955
- [30] ANTONÍN, Vladimír. *Encyklopedie hub a lišejníků*. Praha: Libri, 2006. ISBN 80-200-1476-4.
- [31] TANG, Calyn, Pearl Ching-Xin HOO, Loh Teng-Hern TAN, Priyia PUSPARAJAH, Tahir Mehmood KHAN, Learn-Han LEE, Bey-Hing GOH a Kok-Gan CHAN. Golden Needle Mushroom: A Culinary Medicine with Evidenced-Based Biological Activities and Health Promoting Properties. *Frontiers in Pharmacology* [online]. 2016, **7** [cit. 2023-02-06]. ISSN 1663-9812. Dostupné z: doi:10.3389/fphar.2016.00474

- [32] SMIDERLE, Fhernanda R., Elaine R. CARBONERO, Guilherme L. SASSAKI, Philip A.J. GORIN a Marcello IACOMINI. Characterization of a heterogalactan: Some nutritional values of the edible mushroom *Flammulina velutipes*. *Food Chemistry* [online]. 2008, **108**(1), 329-333 [cit. 2023-02-06]. ISSN 03088146. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodchem.2007.10.029
- [33] CHONG, Pit Shan, Man-Lung FUNG, Kah Hui WONG a Lee Wei LIM. Therapeutic Potential of *Hericium erinaceus* for Depressive Disorder. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2020, **21**(1) [cit. 2023-02-06]. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms21010163
- [34] HE, Xirui, Xiaoxiao WANG, Jiacheng FANG, et al. Structures, biological activities, and industrial applications of the polysaccharides from *Hericium erinaceus* (Lion's Mane) mushroom: A review. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 2017, **97**, 228-237 [cit. 2023-02-06]. ISSN 01418130. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijbiomac.2017.01.040
- [35] THONGBAI, Benjarong, Sylvie RAPIOR, Kevin D. HYDE, Kathrin WITTSTEIN a Marc STADLER. *Hericium erinaceus*, an amazing medicinal mushroom. *Mycological Progress* [online]. 2015, **14**(10) [cit. 2023-02-06]. ISSN 1617-416X. Dostupné z: doi:10.1007/s11557-015-1105-4
- [36] LI, I-Chen, Li-Ya LEE, Tsai-Teng TZENG, Wan-Ping CHEN, Yen-Po CHEN, Young-Ju SHIAO a Chin-Chu CHEN. Neurohealth Properties of *Hericium erinaceus* Mycelia Enriched with Erinacines. *Behavioural Neurology* [online]. 2018, **2018**, 1-10 [cit. 2023-02-06]. ISSN 0953-4180. Dostupné z: doi:10.1155/2018/5802634
- [37] CORRÊA, Rúbia Carvalho Gomes, Tatiane BRUGNARI, Adelar BRACHT, Rosane Marina PERALTA a Isabel C.F.R. FERREIRA. Biotechnological, nutritional and therapeutic uses of *Pleurotus* spp. (Oyster mushroom) related with its chemical composition: A review on the past decade findings [online]. 2016, **50**, 103-117 [cit. 2023-02-06]. ISSN 09242244. Dostupné z: doi:10.1016/j.tifs.2016.01.012
- [38] RAMAN, Jegadeesh, Kab-Yeul JANG, Youn-Lee OH, Minji OH, Ji-Hoon IM, Hariprasath LAKSHMANAN a Vikineswary SABARATNAM. Cultivation and Nutritional Value of Prominent *Pleurotus* spp: An Overview. *Mycobiology* [online]. 2021, **49**(1), 1-14 [cit. 2023-02-06]. ISSN 1229-8093. Dostupné z: doi:10.1080/12298093.2020.1835142

- [39] KAŁA, Katarzyna, Agata KRYCZYK-POPRAWA, Aleksandra RZEWIŃSKA a Bożena MUSZYŃSKA. *Fruiting bodies of selected edible mushrooms as a potential source of lovastatin* [online]. 713-722 [cit. 2023-02-06]. Dostupné z: doi:10.1007/s00217-020-03435-w
- [40] HO, Lee-Hoon, Noroul ASYIKEEN ZULKIFLI a Thuan-Chew TAN. Edible Mushroom: Nutritional Properties, Potential Nutraceutical Values, and Its Utilisation in Food Product Development. *An Introduction to Mushroom* [online]. IntechOpen, 2020, 2020-7-1 [cit. 2023-02-06]. ISBN 978-1-78985-955-3. Dostupné z: doi:10.5772/intechopen.91827
- [41] YADAV, Divya a Pradeep Singh NEGI. Bioactive components of mushrooms: Processing effects and health benefits. *Food Research International* [online]. 2021, **148** [cit. 2023-04-23]. ISSN 09639969. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodres.2021.110599
- [42] MARÇAL, Sara, Ana Sofia SOUSA, Oludemi TAOFIQ, et al. *Impact of postharvest preservation methods on nutritional value and bioactive properties of mushrooms* [online]. 2021, **110**, 418-431 [cit. 2023-04-23]. ISSN 09242244. Dostupné z: doi:10.1016/j.tifs.2021.02.007
- [43] HUANG, Bo, Meng-Chuan CHEN, Xue-Qiang ZHA, Jing-Yuan WEN a Xing-Zhong LIU. *Preparation of Reishi shell-broken spore powder at temperature difference ultrahigh pressure by wet process*. 2014. Čína. CN104223038A. Uděleno 19.8.2014. Zapsáno 24.12.2014.
- [44] EISENBRAND, G, B POOL-ZOBEL, V BAKER, et al. Methods of in vitro toxicology. *Food and Chemical Toxicology* [online]. 2002, **40**(2-3), 193-236 [cit. 2023-02-09]. ISSN 02786915. Dostupné z: doi:10.1016/S0278-6915(01)00118-1
- [45] ESKES, Chantra, Ann-Charlotte BOSTRÖM, Gerhard BOWE, et al. *Toxicology in Vitro* [online]. 2017, **45**, 272-277 [cit. 2023-02-09]. ISSN 08872333. Dostupné z: doi:10.1016/j.tiv.2017.04.022
- [46] LEA, Tor. Caco-2 Cell Line. In: VERHOECKX, Kitty, Paul COTTER, Iván LÓPEZ-EXPÓSITO, et al., ed. *The Impact of Food Bioactives on Health* [online]. Cham: Springer International Publishing, 2015, 2015, s. 103-111 [cit. 2023-04-23]. ISBN 978-3-319-15791-7. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-319-16104-4_10

- [47] COLOMBO, Irma, Enrico SANGIOVANNI, Roberta MAGGIO, et al. HaCaT Cells as a Reliable In Vitro Differentiation Model to Dissect the Inflammatory/Repair Response of Human Keratinocytes. *Mediators of Inflammation* [online]. 2017, **2017**, 1-12 [cit. 2023-04-23]. ISSN 0962-9351. Dostupné z: doi:10.1155/2017/7435621
- [48] ASLANTÜRK, Özlem Sultan. In Vitro Cytotoxicity and Cell Viability Assays: Principles, Advantages, and Disadvantages. *Genotoxicity - A Predictable Risk to Our Actual World* [online]. InTech, 2018, 2018-07-11 [cit. 2023-02-09]. ISBN 978-1-78923-418-3. Dostupné z: doi:10.5772/intechopen.71923
- [49] ADAN, Aysun, Yağmur KIRAZ a Yusuf BARAN. Cell Proliferation and Cytotoxicity Assays. *Current Pharmaceutical Biotechnology* [online]. 2016, **17**(14), 1213-1221 [cit. 2023-02-09]. ISSN 13892010. Dostupné z: doi:10.2174/1389201017666160808160513
- [50] KUMAR, Priti, Arvindhan NAGARAJAN a Pradeep D. UCHIL. *Analysis of Cell Viability by the MTT Assay* [online]. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2018 [cit. 2023-02-09]. ISSN 1559-6095. Dostupné z: doi:10.1101/pdb.prot095505
- [51] *MTT Assay for Cytotoxicity* [online]. [cit. 2023-02-09]. Dostupné z: <https://www.gbiosciences.com/>
- [52] KUMAR, Priti, Arvindhan NAGARAJAN a Pradeep D. UCHIL. Analysis of Cell Viability by the Lactate Dehydrogenase Assay. *Cold Spring Harbor Protocols* [online]. 2018, **2018**(6) [cit. 2023-02-09]. ISSN 1940-3402. Dostupné z: doi:10.1101/pdb.prot095497
- [53] KAMILOGLU, Senem, Gulce SARI, Tugba OZDAL a Esra CAPANOGLU. Guidelines for cell viability assays. *Food Frontiers* [online]. 2020, **1**(3), 332-349 [cit. 2023-02-09]. ISSN 2643-8429. Dostupné z: doi:10.1002/fft.2.44
- [54] MUSHROOM and YEAST BETA-GLUCAN: ASSAY PROCEDURE. *Megazyme* [online]. 2021 [cit. 2023-05-05]. Dostupné z: https://www.megazyme.com/documents/Assay_Protocol/K-YBGL_DATA.pdf
- [55] TODOROVIĆ-RAKOVIĆ, Nataša a Jelena MILOVANOVIĆ. Interleukin-8 in Breast Cancer Progression. *Journal of Interferon & Cytokine Research* [online]. 2013, **33**(10), 563-570 [cit. 2023-04-28]. ISSN 1079-9907. Dostupné z: doi:10.1089/jir.2013.0023
- [56] DINARELLO, Charles A. Historical insights into cytokines. *European Journal of Immunology* [online]. 2007, **37**(S1), S34-S45 [cit. 2023-04-28]. ISSN 00142980. Dostupné z: doi:10.1002/eji.200737772

- [57] Human IL-6 ELISA Kit Product Information Sheet. *ThermoFisher Scientific* [online]. [cit. 2023-05-05]. Dostupné z: https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets%2FFLSG%2Fmanuals%2FMAN0014630_KHC0061_62_61C_Hu_IL-6_ELISA_PI.pdf
- [58] Human IL-8 ELISA Kit Product Information Sheet. *ThermoFisher Scientific* [online]. [cit. 2023-05-05]. Dostupné z: https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets%2FFLSG%2Fmanuals%2FMAN0018696_KAC1301_Hu_IL8_PI.pdf
- [59] CHOONG, Yew-Keong, Kavithambigai ELLAN, Xiang-Dong CHEN a Shaiful AZUAR MOHAMAD. Extraction and Fractionation of Polysaccharides from a Selected Mushroom Species, *Ganoderma lucidum*: A Critical Review. In: AL- HAJ IBRAHIM, Hassan, ed. *Fractionation* [online]. IntechOpen, 2019, 2019-2-6 [cit. 2023-05-05]. ISBN 978-1-78984-964-6. Dostupné z: doi:10.5772/intechopen.78047
- [60] LIU, Yang a Gangliang HUANG. Extraction and derivatisation of active polysaccharides. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* [online]. 2019, **34**(1), 1690-1696 [cit. 2023-05-05]. ISSN 1475-6366. Dostupné z: doi:10.1080/14756366.2019.1660654
- [61] LI, Liu-Dingji, Pei-Wen MAO, Ke-Di SHAO, Xiao-Hui BAI a Xuan-Wei ZHOU. *Ganoderma* proteins and their potential applications in cosmetics. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. 2019, **103**(23-24), 9239-9250 [cit. 2023-05-05]. ISSN 0175-7598. Dostupné z: doi:10.1007/s00253-019-10171-z
- [62] CHEN, Diling, Chaoqun ZHENG, Jian YANG, Jian LI, Jiyan SU, Yizhen XIE a Guoxiao LAI. Immunomodulatory Activities of a Fungal Protein Extracted from *Herichium erinaceus* through Regulating the Gut Microbiota. *Frontiers in Immunology*. 2017, (8). ISSN 1664-3224. Dostupné z: doi:10.3389/fimmu.2017.00666
- [63] SÁNCHEZ, Carmen. Reactive oxygen species and antioxidant properties from mushrooms. *Synthetic and Systems Biotechnology* [online]. 2017, **2**(1), 13-22 [cit. 2023-05-05]. ISSN 2405805X. Dostupné z: doi:10.1016/j.synbio.2016.12.001

- [64] MINH, Nguyen Phuoc, NHAN, Nguyen Phu Thuong. PHA, Pham Thi Le, NGOC, Nguyen Hong a THAO, Tien Phuong (2019). Effect of technical variables on the total phenolic and antioxidant activity in cooking of canned white lingzhi (*ganoderma lucidum*) fruit. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 11(3), 708-711. Retrieved from <https://www.proquest.com/scholarly-journals/effect-technical-variables-on-total-phenolic/docview/2206969359/se-2>
- [65] RUSSO, Pasquale, Paloma LÓPEZ, Vittorio CAPOZZI, Pilar Fernández DE PALENCIA, María Teresa DUEÑAS, Giuseppe SPANO a Daniela FIOCCO. Beta-Glucans Improve Growth, Viability and Colonization of Probiotic Microorganisms. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2012, 13(5),
- [66] *B-Glucan Assay Kit (Yeast and Mushroom): Data Calculator* [online]. [cit. 2023-05-05]. Dostupné z: <https://www.megazyme.com/beta-glucan-assay-kit-yeast-mushroom>
- [67] YANG, Yang, Haiqing YE, Changhui ZHAO, Li REN, Cuina WANG, Milen I. GEORGIEV, Jianbo XIAO a Tiehua ZHANG. Value added immunoregulatory polysaccharides of *Hericium erinaceus* and their effect on the gut microbiota. *Carbohydrate Polymers* [online]. 2021, 262 [cit. 2023-04-27]. ISSN 01448617. Dostupné z: doi:10.1016/j.carbpol.2021.117668
- [68] SYNYTSYA Andriy, NOVÁK Miroslav Structural analysis of glucans. *Ann Transl Med*. 2014 Feb;2(2):17. doi: 10.3978/j.issn.2305-5839.2014.02.07. PMID: 25332993; PMCID: PMC4202478.
- [69] JIANG, Qiyong, Min ZHANG a Arun S. MUJUMDAR. UV induced conversion during drying of ergosterol to vitamin D in various mushrooms: Effect of different drying conditions. *Trends in Food Science & Technology* [online]. 2020, 105, 200-210 [cit. 2023-04-27]. ISSN 09242244. Dostupné z: doi:10.1016/j.tifs.2020.09.011
- [70] EL SHEIKHA, Aly Farag El. Nutritional Profile and Health Benefits of *Ganoderma lucidum* “Lingzhi, Reishi, or Mannentake” as Functional Foods: Current Scenario and Future Perspectives. *Foods* [online]. 2022, 11(7) [cit. 2023-04-28]. ISSN 2304-8158. Dostupné z: doi:10.3390/foods11071030
- [71] FERREIRA, Isabel C.F.R., Sandrina A. HELENO, Filipa S. REIS, Dejan STOJKOVIC, Maria João R.P. QUEIROZ, M. Helena VASCONCELOS a Marina SOKOVIC. Chemical features of *Ganoderma* polysaccharides with antioxidant, antitumor and antimicrobial activities. *Phytochemistry* [online]. 2015, 114, 38-55 [cit. 2023-04-28]. ISSN 00319422. Dostupné z: doi:10.1016/j.phytochem.2014.10.011

- [72] TAOFIQ, Oludemi, Francisca RODRIGUES, Lillian BARROS, Maria F. BARREIRO, Isabel C.F.R. FERREIRA a M. Beatriz P.P. OLIVEIRA. Mushroom ethanolic extracts as cosmeceuticals ingredients: Safety and ex vivo skin permeation studies. *Food and Chemical Toxicology* [online]. 2019, **127**, 228-236 [cit. 2023-04-24]. ISSN 02786915. Dostupné z: doi:10.1016/j.fct.2019.03.045
- [73] KO, Horng-Huey, Chi-Feng HUNG, Jih-Pyang WANG a Chun-Nan LIN. Antiinflammatory triterpenoids and steroids from *Ganoderma lucidum* and *G. tsugae*. *Phytochemistry* [online]. 2008, **69**(1), 234-239 [cit. 2023-04-24]. ISSN 00319422. Dostupné z: doi:10.1016/j.phytochem.2007.06.008
- [74] SALVATORE, Maria Michela, Vincenza DE GREGORIO, Monica GALLO, et al. Evaluation of Two Extraction Methods for the Analysis of Hydrophilic Low Molecular Weight Compounds from *Ganoderma lucidum* Spores and Antiproliferative Activity on Human Cell Lines. *Applied Sciences* [online]. 2020, **10**(11) [cit. 2023-04-26]. ISSN 2076-3417. Dostupné z: doi:10.3390/app10114033
- [75] FOTAKIS, George a John A. TIMBRELL. In vitro cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicology Letters* [online]. 2006, **160**(2), 171-177 [cit. 2023-04-26]. ISSN 03784274. Dostupné z: doi:10.1016/j.toxlet.2005.07.001
- [76] ZIEMLEWSKA, Aleksandra, Magdalena WÓJCIAK, Kamila MROZIAK-LAL, Martyna ZAGÓRSKA-DZIOK, Tomasz BUJAK, Zofia NIZIOŁ-ŁUKASZEWSKA, Dariusz SZCZEPANEK a Ireneusz SOWA. Assessment of Cosmetic Properties and Safety of Use of Model Washing Gels with Reishi, Maitake and Lion's Mane Extracts. *Molecules* [online]. 2022, **27**(16) [cit. 2023-04-24]. ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules27165090
- [77] YANG, Yang, Jihong LI, Qing HONG, Xuehong ZHANG, Zhenmin LIU a Tiehua ZHANG. Polysaccharides from *Hericium erinaceus* Fruiting Bodies: Structural Characterization, Immunomodulatory Activity and Mechanism. *Nutrients* [online]. 2022, **14**(18) [cit. 2023-04-27]. ISSN 2072-6643. Dostupné z: doi:10.3390/nu14183721
- [78] NISHITOBA, Tsuyoshi, Sato SATO a Sadao SAKAMURA. New Terpenoids from *Ganoderma lucidum* and Their Bitterness. *Agricultural and Biological Chemistry* [online]. 2014, **49**(5), 1547-1549 [cit. 2023-04-28]. ISSN 0002-1369. Dostupné z: doi:10.1080/00021369.1985.10866944

8 PŘÍLOHY

HODNOTITELSKÝ PROTOKOL

Senzorické hodnocení instantní polévky s přidavkem různých vzácných druhů hub

Datum:

Hodnotitel: žena / muž

kuřák / nekuřák

Jaký je Váš vztah k instantním polévkám?

- Instantní polévky mám rád/a, konzumuji je pravidelně.
- Instantní polévky nejsou mým oblíbeným pokrmem, ale i tak je konzumuji.
- Instantní polévky nemám rád/a, nekonzumuji je.

1. Senzorické hodnocení

U předložených vzorků zhodnoťte sledovaný parametr pomocí stupnice 1–5.

Sada A

Celkový vzhled

Kód vzorku					
Hodnocení					

1 – výborný (lákový vzhled, kompaktní krémovitá struktura, zbarvení dle použitých surovin)

2 – velmi dobrý (nepatrné odchylky)

3 – dobrý (lehké odchylky)

4 – uspokojivý (velké odchylky)

5 – nevyhovující (neatraktivní vzhled, nekompaktní struktura, nerozpuštěné hrudky, zbarvení neodpovídá použitým surovinám)

Barva

Kód vzorku					
Hodnocení					

1 – výborná (příjemná po použité zelenině a houbách)

2 – velmi dobrá (nepatrné odchylky, nepatrně světlejší nebo tmavší zbarvení povrchu)

3 – dobrá (lehké odchylky)

4 – uspokojivá (velké odchylky, nepříjemná barva, nepřírozená)

5 – nevyhovující (nepříjemná barva, neodpovídá použitým surovinám)

Konzistence

Kód vzorku					
Hodnocení					

- 1 – výborná (instantní polévka je zcela rozpuštěná, neobsahuje žádné hrudky, textura je krémovitá)
- 2 – velmi dobrá (nepatrné odchylky)
- 3 – dobrá (lehké odchylky)
- 4 – uspokojivá (velké odchylky)
- 5 – nevyhovující (směs instantní polévky není rozpuštěná, přítomnost hrudek, příliš vodnatá konzistence, nebo příliš hustá)

Vůně

Kód vzorku					
Hodnocení					

- 1 – výborná (příjemná, zeleninová vůně s houbovým podtónem, typická pro zeleninovou polévku)
- 2 – velmi dobrá (nepatrné odchylky – málo intenzivní vůně)
- 3 – dobrá (lehké odchylky – vůně nevýrazná, či příliš výrazná houbová vůně)
- 4 – uspokojivá (velké odchylky – nepříjemná až hořká, ostrá vůně)
- 5 – nevyhovující (silně nepříjemná vůně, přítomnost cizích pachutí)

Chut'

Kód vzorku					
Hodnocení					

- 1 – výborná (vyvážená lahodná chuť, příjemná po zelenině a houbách)
- 2 – velmi dobrá (nepatrné odchylky)
- 3 – dobrá (lehké odchylky, polévka mírně slanější, lehce hořká po houbách)
- 4 – uspokojivá (velké odchylky, nepříjemná hořká chuť po houbách, slanější)
- 5 – nevyhovující (velmi nepříjemná ostře hořká chuť po houbách, slanější chuť, cizí pachutě)

Chuť – Hořkost

Zakroužkujte číslo na stupnici od 1 do 10 podle intenzity hořkosti daného vzorku.

(1–nejméně hořký, 10–nejvíce hořký)

Kód vzorku										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10

Sada B

Celkový vzhled

Kód vzorku					
Hodnocení					

- 1 – výborný (lákový vzhled, kompaktní krémovitá struktura, zbarvení dle použitých surovin)
- 2 – velmi dobrý (nepatrné odchylky)
- 3 – dobrý (lehké odchylky)
- 4 – uspokojivý (velké odchylky)
- 5 – nevyhovující (neatraktivní vzhled, nekompaktní struktura, nerozpuštěné hrudky, zbarvení neodpovídá použitým surovinám)

Barva

Kód vzorku					
Hodnocení					

- 1 – výborná (příjemná po použité zelenině a houbách)
- 2 – velmi dobrá (nepatrné odchylky, nepatrně světlejší, nebo tmavší zbarvení povrchu)
- 3 – dobrá (lehké odchylky)
- 4 – uspokojivá (velké odchylky, nepříjemná barva, nepřírozená)
- 5 – nevyhovující (nepříjemná barva, neodpovídá použitým surovinám)

Konzistence

Kód vzorku					
Hodnocení					

- 1 – výborná (instantní polévka je zcela rozpuštěná, neobsahuje žádné hrudky, textura je krémovitá)
- 2 – velmi dobrá (nepatrné odchylky)
- 3 – dobrá (lehké odchylky)
- 4 – uspokojivá (velké odchylky)
- 5 – nevyhovující (směs instantní polévky není rozpuštěná, přítomnost hrudek, příliš vodnatá konzistence, nebo příliš hustá)

Vůně

Kód vzorku					
Hodnocení					

- 1 – výborná (příjemná, zeleninová vůně s houbovým podtónem, typická pro zeleninovou polévku)
- 2 – velmi dobrá (nepatrné odchylky – málo intenzivní vůně)
- 3 – dobrá (lehké odchylky – vůně nevýrazná, či příliš výrazná houbová vůně)
- 4 – uspokojivá (velké odchylky – nepříjemná až hořká, ostrá vůně)
- 5 – nevyhovující (silně nepříjemná vůně, přítomnost cizích pachutí)

Chuť

Kód vzorku					
Hodnocení					

- 1 – výborná (vyvážená lahodná chuť, příjemná po zelenině a houbách)
- 2 – velmi dobrá (nepatrné odchylky)
- 3 – dobrá (lehké odchylky, polévka mírně slanější, lehce hořká po houbách)
- 4 – uspokojivá (velké odchylky, nepříjemná hořká chuť po houbách, slanější)
- 5 – nevyhovující (velmi nepříjemná ostře hořká chuť po houbách, slanější chuť, cizí pachutě)

Chuť – Hořkost

Zakroužkujte číslo na stupnici od 1 do 10 podle intenzity hořkosti daného vzorku.

(1–nejméně hořký, 10–nejvíce hořký)

Kód vzorku										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10

2. Hodnocení celkové přijatelnosti vzorku

Seřaďte předložené vzorky podle celkové přijatelnosti.

Sada A

Pořadí	1. (nejlepší)	2.	3.	4.	5. (nejhorší)
Kód vzorku					

Sada B

Pořadí	1. (nejlepší)	2.	3.	4.	5. (nejhorší)
Kód vzorku					

Které sadě vzorků byste dali přednost ?

- Sada A
- Sada B