

**Česká zemědělská univerzita v Praze**

**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**

**Katedra kvality a bezpečnosti potravin**



**Vliv hlívy ústříčné na produkci krátkých mastných kyselin  
střevní mikrobiotou**

**Diplomová práce**

**Autor práce: Bc. Irena Němečková**

**Obor studia: Kvalita a zpracování zemědělských produktů**

**Vedoucí práce: doc. Ing. Pavel Klouček Ph.D.**

© 2020 ČZU v Praze

## **Čestné prohlášení**

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Vliv hlívy ústřičné na produkci krátkých mastných kyselin střevní mikrobiotou" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 24. 7. 2020

---

## **Poděkování**

Ráda bych touto cestou poděkovala doc. Ing. Pavlovi Kloučkovi Ph.D. za ochotu, cenné konzultace, připomínky a odborné vedení v průběhu vytváření této diplomové práce, která byla financována v rámci projektu QK1910209 - Výzkum a vývoj produkce léčivých hub v ČR a jejich inovativní aplikace ve funkčních potravinách. Zároveň bych ráda poděkovala mé rodině za pochopení, podporu a trpělivost, kterou projevila při psaní této diplomové práce.

# Vliv hlívy ústříčné na produkci krátkých mastných kyselin střevní mikrobiotou

## Souhrn

Jedlé houby mohou být významným zdrojem vlákniny, zejména beta–glukanů. Beta–glukany vykazují mnoho příznivých účinků jako je například podpora imunitního systému člověka, silný antioxidační účinek nebo snižování vedlejších účinků chemoterapie. Když se beta–glukany dostanou do tlustého střeva, tak jsou fermentovány střevní mikrobiotou za vzniku mastných kyselin s krátkým řetězcem, které jsou pro lidské tělo velmi důležité. Mezi tyto kyseliny řadíme acetát, propionát a butyrát.

Není přesně známo, jak se v produkci krátkých mastných kyselin liší jednotlivé kmeny hub rodu *Pleurotus*, proto bylo cílem této diplomové práce vyhodnotit jednotlivé kmeny z hlediska produkce mastných kyselin s krátkým řetězcem mikrobiotou člověka v *in vitro* experimentu.

Bylo zkoumáno množství vzniklých mastných kyselin s krátkým řetězcem po fermentaci vybraných druhů hub rodu *Pleurotus*. Pro pokus bylo vybráno 6 kmenů ze tří druhů hlív: *P. flabellatus*, *P. pulmonarius*, *P. ostreatus opuntiae*, *P. ostreatus ivory*, *P. ostreatus 5175* a *P. ostreatus X*. Jako zdroj střevních bakterií pro experiment byly použity lidské stolice od tří zdravých dárců. Vzorky hub se stolicí byly fermentovány v třepací lázni při teplotě 37 °C. Odběr vzorků probíhal v časových intervalech 0, 4, 8 a 24 hodin. Následně byly měřeny na NMR spektrometru Bruker Avance III 500 MHz. Výsledná spektra byla manuálně fázována a referencována na TSP 0.00 ppm v programu Topspin. Alignment a export spekter byl proveden v programu Mestrenova, cílové profilování látek a kvantifikace v programu Chenomx 8.5.

Všechny druhy hub vykazovaly po fermentaci zvýšený obsah mastných kyselin s krátkým řetězcem. Nejvyšší obsah acetátu vykazovali *Pleurotus flabellatus* a *Pleurotus ostreatus ivory* s průměrnou hodnotou 370,4 mg.dL<sup>-1</sup>. Nejvyššího obsahu propionátu dosáhl *Pleurotus pulmonarius*, který vykazoval hodnotu 150,50 mg.dL<sup>-1</sup>. Nejvyšších hodnot butyrátu dosáhli *Pleurotus pulmonarius* a *Pleurotus ostreatus X*, jejichž hodnoty se lišily o 0,6 mg.dL<sup>-1</sup>, průměrně jejich hodnota činila 184,4 mg.dL<sup>-1</sup>.

Z dosažených výsledků vyplývá, že z použitých kmenů hub se jako nejvhodnější pro produkci mastných kyselin s krátkým řetězcem jeví *Pleurotus flabellatus* a *Pleurotus pulmonarius*. Naopak jako nejméně vhodný kmen se zdá *Pleurotus ostreatus 5175*.

Tento experiment byl jeden z prvních pokusů porovnávajících jednotlivé kmeny rodu *Pleurotus*, proto by bylo vhodné pokračovat dál například v *in vivo* studiích.

**Klíčová slova:** *Pleurotus ostreatus*, beta–glukany, krátké mastné kyseliny, NMR

# Influence human microbiota short-chain fatty acids production by oyster mushroom

## Summary

Edible mushrooms can be an important source of fiber, especially beta-glucans. Beta-glucans have many beneficial effects, such as supporting the human immune system, a strong antioxidant effect or reducing the side effects of chemotherapy. When beta-glucans enter the large intestine, they are fermented by the intestinal microbiota to produce short-chain fatty acids, which are very important to the human body. These acids include acetate, propionate and butyrate.

It is not known exactly how the individual strains of fungi of the genus *Pleurotus* differ in the production of short fatty acids, so the aim of this diploma thesis was to evaluate individual strains in terms of production of short chain fatty acids by microbiota in an in vitro experiment.

The amount of short-chain fatty acids formed after fermentation of selected species of fungi of the genus *Pleurotus* was investigated. Six strains from three species of mushrooms were selected for the experiment: *P. flabellatus*, *P. pulmonarius*, *P. ostreatus opuntiae*, *P. ostreatus ivory*, *P. ostreatus 5175* and *P. ostreatus X*. Human stools from three healthy donors were used as a source of intestinal bacteria for the experiment. Stool mushroom samples were fermented in a shaking bath at 37 ° C. Sampling took place at time intervals of 0, 4, 8 and 24 hours. They were then measured on a Bruker Avance III 500 MHz NMR spectrometer. The resulting spectra were manually phased and referenced to a TSP of 0.00 ppm in the Topspin program. Alignment and export of spectra was performed in the program Mestrenova, target profiling of substances and quantification in the program Chenomx 8.5.

All types of fungi showed an increased content of short-chain fatty acids after fermentation. *Pleurotus flabellatus* and *Pleurotus ostreatus ivory* showed the highest acetate content with an average value of 370.4 mg.dL<sup>-1</sup>. The highest propionate content was reached by *Pleurotus pulmonarius*, which had a value of 150.50 mg.dL<sup>-1</sup>. The highest values of butyrate were reached by *Pleurotus pulmonarius* and *Pleurotus ostreatus X*, whose values differed by 0.6 mg.dL<sup>-1</sup>, their average value was 184.4 mg.dL<sup>-1</sup>.

The results obtained show that *Pleurotus flabellatus* and *Pleurotus pulmonarius* appear to be the most suitable fungus strains used for the production of short-chain fatty acids. In contrast, *Pleurotus ostreatus 5175* appears to be the least suitable strain.

This experiment was one of the first experiments comparing individual strains of the genus *Pleurotus*, so it would be appropriate to continue, for example, in vivo studies.

**Key words:** *Pleurotus ostreatus*, beta-glucans, short fatty acids, NMR



# Obsah

<b>1</b>	<b>Úvod</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Vědecká hypotéza a cíle práce</b>	<b>2</b>
<b>3</b>	<b>Literární rešerše</b>	<b>3</b>
<b>3.1</b>	<b>Houby rodu hlíva a jejich historie</b>	<b>3</b>
<b>3.2</b>	<b>Specifikace hlívy ústříčné</b>	<b>5</b>
3.2.1	Podmínky vhodné pro pěstování hlívy	6
3.2.2	<i>Pleurotus pulmonarius</i>	8
3.2.3	<i>Pleurotus flabellatus</i>	10
3.2.4	<i>Pleurotus ostreatus opuntiae</i>	11
<b>3.3</b>	<b>Sacharidy obsažené v hlívě</b>	<b>11</b>
3.3.1	Beta–glukany	12
3.3.1.1	Mechanismus beta–glukanů	14
3.3.1.2	Léčivé účinky beta–glukanů	15
<b>3.4</b>	<b>Mastné kyseliny</b>	<b>17</b>
3.4.1	Mastné kyseliny s krátkým řetězcem	17
3.4.1.1	Tvorba propionátu ze sacharidů	19
3.4.1.2	Tvorba butyrátu ze sacharidů	20
3.4.1.3	Tvorba propionátu a butyrátu z proteinů a aminokyselin	21
3.4.1.4	Analýza krátkých mastných kyselin	22
3.4.1.5	Princip NMR spektroskopie	23
<b>3.5</b>	<b>Střevní mikrobiota</b>	<b>24</b>
3.5.1	Střevní mikrobiota a její vývoj	25
3.5.2	Střevní mikrobiota a její ovlivňování	26
3.5.3	Střevní mikrobiota a její produkty	26
<b>4</b>	<b>Metodika</b>	<b>27</b>
<b>4.1</b>	<b>Materiál</b>	<b>27</b>
4.1.1	Chemikálie	27
4.1.2	Vzorky vybraných hlív	27
4.1.3	Stolice dárců	27
4.1.4	Odběr stolice	28
<b>4.2</b>	<b>Metodika</b>	<b>28</b>
4.2.1	Příprava zásobních roztoků	28
4.2.2	Fermentace vzorků	29
4.2.3	NMR analýza	29
4.2.4	Zpracování výsledků	30

<b>5</b>	<b>Výsledky .....</b>	<b>31</b>
<b>6</b>	<b>Diskuze .....</b>	<b>39</b>
<b>7</b>	<b>Závěr .....</b>	<b>42</b>
<b>8</b>	<b>Literatura.....</b>	<b>43</b>
<b>9</b>	<b>Samostatné přílohy.....</b>	<b>I</b>



# 1 Úvod

Houby jsou po celém světě již od starověku ceněny v kuchyni kvůli své jedinečné a jemné chuti. Jsou také považované za zdroje důležitých živin včetně minerálů, vitaminů a vlákniny. Bílkoviny obsažené v houbách obsahují všech 9 esenciálních aminokyselin, které člověk musí přijímat potravou. Na světě existuje více než 2000 druhů hub, ale jako potrava je přijímáno zhruba 25. Kvůli jejich potenciálně prospěšným účinkům na lidské zdraví jsou v poslední době využívány jako funkční potravinu. *Agaricus bisporus* (pečárka dvouvýtrusá) je na světě nejrozsáhleji pěstovaná. V roce 2012 bylo sklizeno 7 959 979 tun hub na celém světě, většinu vyprodukovala Čína (Correa et al. 2016).

Houby rodu *Pleurotus* (hlíva) se vyskytují na celé naší planetě. Tyto houby mají vysokou nutriční hodnotu a v produkci hub jsou na třetí pozici. Ve velkém jsou pěstovány *Pleurotus ostreatus* a *Pleurotus pulmonarius*, přičemž někteří producenti uvádí na trh *Pleurotus pulmonarius* pod nesprávným názvem *Pleurotus sajor-caju*. Pravá *sajor-caju* byla zařazena do rodu *Lentinus* a nese tedy název *Lentinus sajor-caju* (Correa et al. 2016).

Pro chutnou a výživnou hlívu jsou typické její fyziologické vlastnosti (Smiderle et al. 2012). Hlíva je běžně využívána na přípravu polévek. Podává se taky grilovaná, restovaná, vařená nebo dušená (Reis et al. 2012).

Jedlé houby mohou být významným zdrojem vlákniny, zejména beta-glukanů. Beta-glukany vykazují mnoho příznivých účinků jako například podpora imunitního systému člověka, silný antioxidační účinek nebo snižování vedlejších účinků chemoterapie. Když se beta-glukany dostanou do tlustého střeva, tak jsou fermentovány střevní mikrobiotou za vzniku mastných kyselin s krátkým řetězcem, které jsou pro lidské tělo velmi důležité. Mezi tyto kyseliny řadíme acetát, propionát a butyrát. Střevní mikrobiota umí fermentovat i bílkoviny za vzniku mastných kyselin s krátkým řetězcem, ale preferuje sacharidy. Při fermentaci vznikají nejen tyto kyseliny, ale také meziproducty, kterými jsou například sukciát, fumarát nebo laktát.

Střevní mikrobiota je důležitou součástí tlustého střeva. Zpracovává nestravitelné části potravy, produkuje tělu prospěšné látky a vitaminy a také se podílí na udržení epiteliální bariéry. Na mikrobiotu má vliv mnoho faktorů, proto se lidé svou mikrobiotou liší. Záleží na způsobu narození, výživě v kojeneckém období, hygienických podmínkách, na užívání antibiotik a především stravovacích návycích jedince (Voreades et al. 2014).

V lidském těle hrají mastné kyseliny s krátkým řetězcem důležité role a zatím není dostatečně prozkoumáno, jak se v produkci krátkých mastných kyselin liší jednotlivé kmeny hub různých rodů *Pleurotus*. Pravděpodobně nejdůležitější mastnou kyselinou s krátkým řetězcem pro lidské zdraví je butyrát. Hamer et al. (2008) uvádí, že butyrát má řadu účinků, například ovlivňuje sliznici tlustého střeva, inhibuje zánět a také karcinogenezi.

## **2 Vědecká hypotéza a cíle práce**

Cílem diplomové práce je vyhodnotit jednotlivé kmeny hlívy z hlediska jejich schopnosti být zdrojem krátkých mastných kyselin v trávicím traktu člověka.

Dílčím cílem diplomové práce je zpracovat přehled literatury o hlívě ústřičné a jejím vlivu na produkci krátkých mastných kyselin střevní mikrobiotou.

Hypotéza: Různé kmeny rodu hlíva se liší v potenciálu sloužit jako prekurzor tvorby mastných kyselin s krátkým řetězcem. Pomocí experimentů lze zjistit rozdíly u jednotlivých kmenů.

### 3 Literární rešerše

#### 3.1 Houby rodu hlíva a jejich historie

Houby rodu hlíva (*Pleurotus*) patří do třídy stopkaté neboli stopkovýtrusé houby (*Basidiomycetes*). Na obvykle dvoujaderném myceliu (podhoubí) se za příznivých podmínek vytváří plodnice, která produkuje kyjovité bazidie (buňky stopkovýtrusých hub) (Valíček 2011). Z vrcholu bazidií vyrůstají až čtyři stopečky (sterigmaty), na kterých se tvoří výtrusy (Kaizer 2005). Výtrusy (*basidiospory*) slouží k rozmnožování (Lynch 2019).

Dále se rod hlíva (*Pleurotus*) řadí do řádu lupenotvaré (*Agaricales*). Na spodní straně klobouku se nacházejí lupeny pokryté vrstvou bazidií a výtrusů (Valíček 2011) Tato vrstva se nazývá rouško neboli *hymenium* (Svrček 1996).

**Tabulka 1:** Zařazení hlívy ústřičné (Monolea 2006)

<b>Říše:</b>	houby ( <i>Fungi</i> )
<b>Oddělení:</b>	stopkovýtrusné ( <i>Basidiomycota</i> )
<b>Třída:</b>	stopkovýtrusé ( <i>Basidiomycetes</i> )
<b>Podtřída:</b>	rouškaté ( <i>Agaricomycetidae</i> )
<b>Řád:</b>	lupenotvaré ( <i>Agaricales</i> )
<b>Čeleď:</b>	hlívovité ( <i>Pleurotaceae</i> )
<b>Rod:</b>	hlíva ( <i>Pleurotus</i> )
<b>Druh:</b>	ústřičná ( <i>ostreatus</i> )

Starověcí Řekové věřili, že houby poskytovaly vojákům a bojovníkům sílu potřebnou do bojů a válek. Nejen houby rodu hlíva, ale i jiné houby získaly patřičný zájem, jelikož byly a stále jsou významným nositelem chutného pokrmu s léčivými vlastnostmi. Houby, tudíž i hlívy obsahují vysoký obsah vitamínů, organických a mastných kyselin či sterolů. Ne nadarmo nazývají Číňané již po staletí houby elixírem života. Mimo jiné jsou v Číně houby předepisovány jako součást léčebných procedur. Proto většina farmaceutických společností v jihovýchodní Asii, zejména Čína, využívá léčivé houby jako zdroj bioaktivních molekul (Maftoun 2015).

Se sběrem hlívy se začalo již před mnoha staletími. Nejstarší možnou doloženou zprávou o využití hub k léčení je recept z Indie, jenž je datovaný k roku 3 000 let př. n. l. Ve stejném časovém úseku se houby staly posvátnou potravou prodlužující život například i v Egyptě. Zmínku o hlívě ústřičné nalezneme i v jedné z básní z dob dynastie Sung (Čína) (960–1279). S cíleným pěstováním se však začalo mnohem později. V Evropě se začala pěstovat hlíva ústřičná v polovině minulého století (Valíček 2011).

Nejdelší tradici v pěstování jedlých hub rostoucích na dřevě má Japonsko a Čína. První úspěšné vypěstování hlívy ústříčné v laboratoři doložil německý badatel Falck. Výsledky své práce publikoval v roce 1917. Postupy pěstování hlívy na dřevěných špalcích se prvotně v praxi aplikovaly na evropském kontinentě, na území Maďarska. Na území tehdejšího Československa, přesněji v letech mezi 1969–1971, proběhly první zkoušky s pěstováním hlívy ústříčné. Samotný technologický postup výroby, sadby a následné pěstování hlív vyvinula RNDr. Anastázia Ginterová (Lepšová 2001).

Odhaduje se, že existuje více než 200 druhů hub rodu *Pleurotus*, z nichž všechny jsou jedlé a oceňované pro svou chuť, vůni a strukturu, jakož i pro bioaktivní potenciál podporující zdraví (Barbosa et al. 2020). Hlíva ústříčná poskytuje široké spektrum biologicky aktivních látek, které posilují fyziologický stav našeho organismu. Beta–glukan obsažen v hlívě ústříčné stimuluje imunitní systém těla. Je prospěšný při rakovině, cukrovce i mikrobiálních infekcích (Mowsurni & Chowdhury 2010). Beta–glukany patří mezi fyziologicky aktivní sloučeniny označované jako modifikátory biologické (imunitní) odpovědi, které se dělí na cytokiny a imunomodulátory. Imunomodulátory jsou schopny pozitivně (imunopotenciace) či negativně (imunoprese) manipulovat s imunitním systémem.

Existuje více druhů hlív, přičemž charakteristiky z odborné literatury vychází z obecného dogmatu samotné hlívy ústříčné. Můžeme se proto mnohdy setkat s prolínáním popisnosti hlív jako takových a hlívy ústříčné.

Na našem území jsou mimo jiné rozšířeny tyto druhy hlív:

- hlíva plicní,
- hlíva miskovitá,
- hlíva dubová,
- hlíva máčková,
- hlíva topolová,
- hlíva čepičkatá (Lepšová 2001).

V tropických oblastech a na jižní polokouli je potvrzen výskyt:

- *Pleurotus djamor*,
- *Pleurotus cystidiou*,
- *Pleurotus lewis*,
- *Pleurotus tuberregium*,
- *Pleurotus australis*,
- *Pleurotus puprpureo-olivaceus* a jiné (Lepšová 2001).

## 3.2 Specifikace hlívy ústřičné

Hlíva ústřičná (*Pleurotus ostreatus* (JACQ. Ex FR.) P. KUMM.) je dřevokazná lupenitá houba. Má šedivý masitý klobouk o velikosti 5-35 centimetrů. Je to velmi rozšířený druh, jemuž se jako i jiným houbám připisují léčivé vlastnosti. Hlíva pochází z Číny, své druhové jméno získala díky tvaru připomínajícímu tvar ústřice (Valíček 2011).

Hlíva ústřičná má bokem přirostlý anebo protažený krátký třeň. Plodnice hlívy ústřičné tvoří bohaté trsy, které jsou zařazeny stupňovitě nad sebou. Jejich hmotnost může dosáhnout až jednoho kilogramu. Pokožka je hladká, s lysou strukturou. Zbarvení pokožky je od šedé přes černou až po šedohnědou barvu. Třeň i jeho dužina bývá bílé barvy, lupeny jsou též bílé až naředlé. Velikost třeně se pohybuje v rozmezí 1 až 4 cm a je zhruba 2 cm tlustý, válcovitého tvaru. Mladá plodnice je měkká a postupem stáří tuhne (Valíček 2011).

Hlíva roste v mírném klimatickém pásmu, kde parazituje na mrtvých i živých kmenech, a to především na listnatých stromech. Vytváří bílou hnilobu, kterou poškozují kmeny. V přírodě jí můžeme vidět od konce léta až do zimy, nepoškodí jí ani mráz (Volk & Volk 2004). Z hlediska aktivního využití pěstování hlívy je v posledních letech záležitostí zcela komerční. Na konci devadesátých let minulého století se v Číně ročně vypěstovalo až 85 % veškeré světové produkce hlívy ústřičné. Mezi evropskou velmoc v pěstování této houby patří Maďarsko (Jablonský & Šašek 1997).

Při pěstování ve velkých pěstírnách je nezbytné používat ochrannou masku vybavenou ventilátorem a filtrem. Nebezpečí vzniká při dozrávání hlívy, kdy dochází k postupnému vytváření spor. Citlivým osobám se při vdechnutí spory může projevit alergická reakce. Stane se tak, když spory vniknou do plicních sklípků a způsobí tím onemocnění, takzvanou alveolitidu. Následná alergická reakce se dostaví po 6 až 8 hodinách, po vdechnutí spor. Průvodním charakteristickým znakem alergie je bolest hlavy, zvýšená teplota, suchý kašel a nevolnost (Jablonský & Šašek 1997).

Plodnice hlívy ústřičné obsahují až 2,5 % bílkovin, 5 % sacharidů a pouze 0,1 až 0,2 % tuku, jsou tedy energeticky málo vydatné. Přibližná energetická hodnota 100 g sušiny hlívy ústřičné je velmi nízká, v průměru obsahuje kolem 340 kcal (1423kJ) (Lepšová 2005). Díky tomu řadíme hlívu ústřičnou mezi dietetické potraviny (Klán 1989). Poslední doložené studie hovoří o tom, že hlíva obsahuje celkem 18 mastných kyselin. Jedná se zejména o kyselinu linolenovou a kyselinu olejovou. Mimo jiné je hlíva obohacena o širokou škálu aminokyselin, největší procentuální zastoupení má kyselina glutamová (Valíček 2011).

V plodnicích hlívy byl rozpoznán specifický  $\beta$ -(1,3)-D-glukan, nazývaný pleuran ( $\beta$ -D glukopyranóza), který má patrné protinádorové účinky a též výrazně podporuje imunitu. Proti odbourávání cholesterolu aktivně působí další objevená látka nazývaná lovastin (mevinolin, monakolin K, levastacin). Lovastin patří do skupinu statinů, které řadíme mezi inhibitory HMG-CoA reduktázy (koenzym hydroxymethylglutaryl-koenzym A). Další přítomnou chemickou látkou jsou steroly, například ergosterol a také nízké obsahy vitaminů

skupiny B, C a K. Obsahuje také minerální látky jako jsou: železo, draslík a fosfor a také stopové prvky, mezi které řadíme selen zinek bor jod (Phan 2018).

Alkaloid eritadenin přítomný v hlívě má schopnost regulace hladiny cukru a cholesterolu v krvi. Další obsaženou látkou je terpen pleurotin, vykazující antimikrobiální a protirakovinnou aktivitu. Další významnou látkou podílející se na zachycení cholesterolu je chitin (Valíček 2011).



**Obrázek číslo 1:** Hlívá ústříčná (Socha & Jegorov 2014)

### **3.2.1 Podmínky vhodné pro pěstování hlívy**

Pěstování hlívy je snadno dostupné a poměrně jednoduché. Je však nutné při tomto procesu dodržet několik podmínek. První podmínkou je příprava vhodného pěstebního substrátu, tak, aby jej neobsadily jiné druhy hub než právě zmiňované hlívy. Další nezbytnou podmínkou je zabránit při kultivaci podhoubí vysychání substrátu. Mimo jiné je nutné zachovat tepelný režim jednotlivých pěstebních kroků, a to v souladu s tím, jak to vyžaduje pěstovaný druh hlívy. Literatura dále uvádí nepostradatelnost vhodného větracího režimu, kdy je důležité dodržet potřebnou koncentraci oxidu uhličitého při prorůstání mycelia a při nasazování a tvorbě plodnic. Neboť pro optimální vývoj plodnice je zcela nezbytné, aby plodnice dosahovala nízké koncentrace oxidu uhličitého společně s dostatečným osvětlením (Jablonský & Šašek 2006).

Při pěstování hlívy ústříčné je nutné myslet na fakt, že tento druh houby je citlivý na teplotu. Fruktifikuje neboli tvoří plodnice jen v případě, že je okolní teplota nižší než 15°C. Nastane-li situace, kdy je teplota trvale jen o několik stupňů vyšší, nedojde k tvorbě zárodků plodnic. Pro zahájení tvorby plodnic stačí, aby během noci okolní teplota klesla pod 10–12 °C. Naopak ve dne může teplota dosáhnout i 20 °C, při těchto podmínkách vývoj plodnic pokračuje. Z množiny hlavních fyzikálních faktorů je dále nezbytná vzdušná vlhkost, kdy je pro dokonalý vývoj plodnic nezbytná vysoká relativní vlhkost vzduchu, pohybující se v rozmezí 80 až 90 %. Za optimální hodnotu pH během růstu podhoubí hlívy ústříčné považujeme rozmezí 5,5 až 6,5 (Jablonský & Šašek 2006).

Methoxybenzaldehyd je plynná látka, kterou hlíva ústříčná uvolňuje pro svou ochranu. Látka methoxybenzaldehyd potlačuje vývoj grampozitivních i gramnegativních bakterií a hub. Mimo jiné zastavuje i klíčení a růst podhoubí z výtrusů konkurenčních hub. Protibakteriální ochrana plodnice je zabezpečována látkou obsahující oktenol, ta plodnici umožní dostatečně dlouhý čas pro proces dozrávání a uvolňování výtrusů (Jablonský & Šašek 2006).

Samotný způsob pěstování hlívy provádíme intenzivní a extenzivní formou. Při intenzivním pěstování se jako substrát využívá především sláma či další lignocelulózové odpady, mezi které řadíme například rýžovou, kukuřičnou a řepkovou slámu, hrachovinu, piliny, kukuřičná vřetena, bavlníkový odpad, papír, kokosová vlákna, zelenou hmotu z vodního hyacintu a jiné. Těmito příklady hmot houba rychle prorůstá, čímž se zkracuje pěstitelský cyklus. Extenzivní pěstování hlívy je označováno za jednoduchý způsob pěstování. Mezi výhody extenzivního pěstování patří dlouhodobé plození (Holubová 2009).

Dle vyhlášky č. 157/2003 Sb. Ministerstva zemědělství ze dne 12. května 2003 je v České republice povoleno pěstovat k přímému prodeji nebo dalšímu průmyslovému zpracování pro potravinářské účely 15 druhů hub ze třídy stopkovýtrusných (*Basidiomycetes*). Patří sem hlíva ústříčná (*Pleurotus ostreatus*), hlíva plicní (*Pleurotus pulmonarius*), hlíva miskovitá (*Pleurotus cornucopiae*), hlíva máčková (*Pleurotus eryngii*), žampion hnědý (*Agaricus brunescens*), žampion zahradní (*Agaricus hortensis*), penízovka sametonohá (*Flammulina velutipes*), límcovka obrovská - hnědá a žlutá forma (*Stropharia rugosoannulata*), houževnatec jedlý - *shii-ta-ke* (*Lentinus edodes*), polnička topolová (*Agrocybe aegerita*), hnojník obecný (*Coprinus comatus*), kukmák sklepní (*Volvariella volvacea*), opeňka měnlivá (*Kuehneromyces mutabilis*) a ucho Jidášovo (*Hirneola auricula-judae*). Nejčastěji se u nás z povolených druhů pěstují žampiony a hlíva ústříčná (Lepšová 2005).



**Obrázek číslo 2:** Hlíva ústříčná (Socha & Jegorov 2014)

### **3.2.2 *Pleurotus pulmonarius***

Hlíva plicní (*Pleurotus pulmonarius* (Fr.) Quél.) se řadí mezi jedlé, dřevokazné houby z čeledi hlívovitých. Hlíva plicní roste od května do listopadu, a to na živých či odumřelých kmenech listnatých stromů, nejčastěji roste na bucích a lípách. Hlíva plicní je nejkultivovanějším druhem hlív (*Pleurotus*) v Evropě a Severní Americe. Hlíva plicní, též známá jako indická ústřice či italská ústřice, je houba velmi podobná hlívě ústříčné. Od sebe jsou rozeznatelné díky několika znatelným rozdílům. Klobouk hlívy plicní je mnohem bledší a velikostně menší než u hlívy ústříčné. Hlíva plicní dále upřednostňuje teplejší počasí. Výskyt tohoto druhu hlívy je rozšířen na území mírných a subtropických lesů po celém světě. Na východě Spojených států amerických roste hlíva plicní v listnatých lesích, zatímco na západě se tato hlíva vyskytuje spíše na stromech jehličnatých (Stamets 2000).

Hlíva plicní je po staletí využívána nejen jako jedlá houba, ale také pro své jedinečné chuťové vlastnosti a jedinečnou vůni. Obsahuje velké množství proteinů, polysacharidů, esenciálních aminokyselin a vitaminů, včetně niacinu a riboflavinu. Dále má také vysoký poměr draslík k sodíku. V posledních letech vznikly studie, které potvrzují fakt, že hlíva plicní má pozitivní farmakologické vlastnosti. Působí antibakteriálně, protinádorově, imunostimulačně, protizánětlivě, pomáhá bránit potenciálním vaskulárním komplikacím a může snižovat hladinu cukru v krvi (Wu et al. 2019).





**Obrázek číslo 3:** Hlíva plicní (Socha & Jegorov 2014)

Několik studií, které byly s hlívou plicní provedeny, prokázaly pozitivní léčivé účinky. Hlíva plicní byla testována v souvislosti se snížením citlivosti na bolest. Kde významnou roli sehrál beta–glukan. Experimentální testy byly provedeny na myších. Poznatky z těchto studií by se v budoucnu mohly stát základem pro nové analgetické léky. V dalších studiích hlíva plicní vykazovala také protizánětlivé a protinádorové účinky. Ty měly původ v methanolovém extraktu z hlívy plicní (Stamets 2000).

Hlavními materiály pro tradiční pěstování hlívy plicní jsou piliny a bavlníkové slupky. Tyto suroviny jsou ovšem drahé. V Číně se pro pěstování hlívy plicní dále využívá pšeničná sláma, rýžová sláma, kukuřičné klasy, sójová sláma, arašídová sláma, kukuřičná sláma a řepková sláma. Výběr substrátu hraje významnou roli ve výživovém složení hlív (Wu et al. 2019).

Vědci se snaží i o šlechtění hlívy plicní. Při studii z roku 2016 se pokusili vypěstovat vylepšené kmeny tohoto druhu vytvořením systematického schématu využívajícího genetiku a hybridní šlechtění. Po vyhodnocení vzorků byli pro křížení zvoleni tři zástupci parentální generace a následně 22 izolátů s jednou sporou. Provedeno bylo 231 křížení, z nichž bylo 88 kompatibilních a 46 hybridů bylo schopno vytvořit bazidiokarp (plodnice) v prvním cyklu kultivace. Genetické variace a analýzy heritability ukázaly, že většina z celkových genetických variací pozorovaných u většiny znaků byla spojena s geny, které měly dominantní efekt.

Z výsledků studie vyplývá, že tři vybrané nové hybridy vykazovaly výrazně vyšší produkci a heterózu než ostatní nové kmeny, včetně jejich rodičů (Avin et al. 2016).

### 3.2.3 *Pleurotus flabellatus*

Pro účely získání přesných informací ohledně nutričních hodnot *Pleurotus flabellatus* bylo použito syntetické médium. Na základě využití mnoha testovaných zdrojů uhlíku bylo zjištěno, že lidský organismus využívá hexóзовé cukry snadněji, nežli cukry jiné. Nejlepším zdrojem dusíku u *Pleurotus flabellatus* byl shledán citrát amonný. Dle provedených studií bylo zjištěno, že při vyšší koncentraci dusíku vně hlívy se i přímo úměrně zvyšuje podíl výtěžku ze samotné sušiny hlívy. Při tomto procesu vzrostl i obsah surových proteinů v myceliu. Mimo to byly provedeny i různé studie, které se zaměřovaly na účinek zastoupených látek a jejich živin v myceliu. Kdy právě tyto látky zvyšují obsah surových proteinů v myceliu, jedná se o látky jako jsou fosfor, draslík, vápník a hořčík. Optimální rozmezí pH bylo stanoveno mezi 4,5 a 7,5 (Srivastava & Bano 1970).

*Pleurotus flabellatus* jsou známé pro svůj vysoký zdroj bílkovin z esenciálních aminokyselin, jako je například leucin, isoleucin, valin, tryptofan, lysin, threonin, fenylalanin, methionin a histidin. V *Pleurotus flabellatus* je obsaženo 20-40 % bílkovin a až 72-83 % z této houby může být tráveno lidským tělem. Druh *Pleurotus flabellatus* obsahuje antioxidační složku, jako je flavonoid, kyselina askorbová, beta-karoten a lykopen (Waskito 2016).

Gasgupta et al. (2014) ve své studii uvádí, že *Pleurotus flabellatus* je potenciálním zdrojem přírodního antioxidantu, který by šlo použít jako doplněk stravy k léčbě různých onemocnění souvisejících s oxidativním stresem.

Hlívy rodu *Pleurotus* jsou známé pro svůj vysoký obsah bílkovin. V Indonésii se široce konzumuje například hlíva ústřičná a *Pleurotus flabellatus* (též známá jako houba-růžová ústřice), která je tzv. potenciální náhražkou masa pro lidi, kteří se právě konzumaci masa vyhýbají. Výzkum se zaměřil na fakt, že právě *Pleurotus flabellatus* by mohl být pěstován pro svůj vysoký obsah bílkovin, a tedy jako potenciální výživově srovnatelná náhrada jako je maso. Druhotným cílem bylo zjistit optimální vzorec masného analogu odvozeného z mycelia *Pleurotus flabellatus* metodou povrchové odezvy (RSM). Masný analog byl pro potřeby výzkumu vyroben parou. Do masové analogové formulace byla přidána další složka, jako je sójová mouka, tapiokový škrob a bramborová mouka. Produkt masového analogu byl vybrán na základě podobných texturních vlastností jako maso. Výsledek výzkumu prokázal, že nově vytvořený produkt se sestává ze 40 % mycelia, 30 % sójové mouky, 20 % tapiokového škrobu a 10 % sladké bramborové mouky. Obsahoval 50,14 % sacharidů, 19,30 % bílkovin, 27,50 % tuků, 3,06 % popelovin, 10,50 % vlákniny v potravě, 14,67 mg GAE.g<sup>-1</sup> celkové fenolické kapacity, DPPH (6,27 mg AEAC.g<sup>-1</sup> produktu) a FRAP (13,47 mg FeSO<sub>4</sub>.g<sup>-1</sup> produktu), glykemický index (20.06) a glykemická zátěž (10.06). Obsahoval také devět esenciálních aminokyselin a vysoký obsah nenasycených mastných kyselin (Waskito 2016).

### 3.2.4 *Pleurotus ostreatus opuntiae*

Název *Pleurotus ostreatus opuntiae* se bez rozdílu používá pro popis hub s bílým až šedobílým pruhovým a dimitickým podhoubím, jenž roste na rostlinách rodů *Opuntia*, *Yucca*, *Agave*, *Phytolacca* atd. Výsledek studie z roku 2019 dokazuje, že tento název by měl být vyhrazen pouze pro exempláře pocházející ze středomořské oblasti. Ze studie též vychází, že tento druh houby pochází z Itálie a je využitelný při léčbě velkého spektra onemocnění. Hlavním pozitivem *Pleurotus ostreatus opuntiae* je její využití při ovlivnění zdravotního stavu. Uvádí se například použití této houby při léčení a regeneraci vnitřních orgánů, při podpoře peristaltiky, respiračních problémech, opakujících se zánětech dýchacích cest či při kardio-vaskulárních problémech aj. (Zervakis et. al. 2019).

### 3.3 Sacharidy obsažené v hlívě

Sacharidy jsou nejrozšířenější organické sloučeniny v biosféře, jsou základními složkami všech živých organismů a biologicky aktivními molekulami. Pod názvem se vyznačují polyhydroxyaldehydy a polyhydroxyketony, obsahující v molekule minimálně tři alifyticky vázané uhlíkové atomy a též sloučeniny, jenž se z nich tvoří vzájemnou kondenzací za postupného vzniku glykosidových vazeb. Tyto vazby plní v živých biologických objektech převážně funkci strukturní a metabolickou (Hoza & Kramářová 2005).

V plazmě hub se nacházejí rezervní rozpustné sacharidy, jako jsou: glykogen, trehalosa, galaktany, ribosa a glukosa. Tyto rozpustné sacharidy jsou doprovázeny cukernými alkoholy, jako jsou: mannitol, volemitol, sorbitol, arabitol a erythrinol. Čerstvá hlíva ústříčná vykazuje méně než 1 % pro člověka přijatelných sacharidů. Hlavními obsahovými látkami hlívy jsou polysacharidy, ve vodě rozpustné i nerozpustné. Jsou to látky s výraznou biologickou aktivitou (Opletal 1993).

V hlívě ústříčné bylo rozpustných sacharidů nejméně, nejvyšší zastoupení má glukosa (10,6 mg.g<sup>-1</sup>), mannitol (3,6 mg.g<sup>-1</sup>) a trehalosa (2,8 mg.g<sup>-1</sup>) (Lepšová 2001). Základní složku nerozpustných polysacharidů tvoří komplex složený z chitinu (polysacharid tvořený aminocukry, zejména poly-N-acetylglukosaminem), chitosanu a některých glukánů, které jsou podstatou buněčné stěny hub. Společně s polysacharidy se v buněčné stěně čerstvé houby nachází celkem 7 % sacharidů (Opletal 1993).

Plodnice hlívy jsou významným zdrojem potravní vlákniny, sušina obsahuje zhruba 26 % nerozpustné a kolem 1 % rozpustné frakce. V porovnání s vlákninou ovoce, zeleniny a obilnin, se vláknina hub výrazně liší. Zatímco u ovoce, zeleniny a obilnin je hlavní součástí celulóza, hemicelulóza a pektiny, takzvané biopolymery kyselého charakteru, u hub je podstatnou částí vlákniny složka bazických polymerů, chitinu a chitosanu (Dore 2010).

Chitin je polymer ve kterém se navzájem váží N-acetyl- $\beta$ -D-glukosamin a  $\beta$ -D-glukosamin  $\beta(1\rightarrow4)$ -glykosidovou vazbou. Chitin je ve vodě nerozpustný a poměrně odolný vůči chemickým činidlům. Rozkládá se pouze bakteriálními enzymy chitinasami, enzymem lysozymem a koncentrovanými kyselinami. Chitosan vzniká alkalickou hydrolyzou chitinu,

ten se částečně rozpouští v kyselém prostředí, mimo jiné i v žaludeční šťávě, kde se jeho volné primární aminoskupiny protonizují a nově vzniklá látka dává takto přeměněnému chitosanu vlastnosti blízké cholestyraminu (Wonk 2006). Cholestyramin neboli styren-divinyl-benzenový kopolymer váže jako neresorbovatelný anex v tenkém střevě žlučové kyseliny, kterým se přisuzuje karcinogenní účinek na tlusté střevo, narušuje jejich entyrohepatální oběh a tím snižuje hladinu cholesterolu v plazmě (Opletal 1993).

Chitin a další složky stěny (beztvaré složené cukry – glukany a mannany) ve svých molekulách obsahují značné množství vazebných míst pro kovy které se mohou v houbové vláknině uvolňovat nebo naopak pevně vázat (Lepšová 2001). Houby jsou pro člověka stravitelné jen z části, jelikož lidský organismus není zcela schopen samotný chitin štěpit (Hoza & Kramářová 2005).

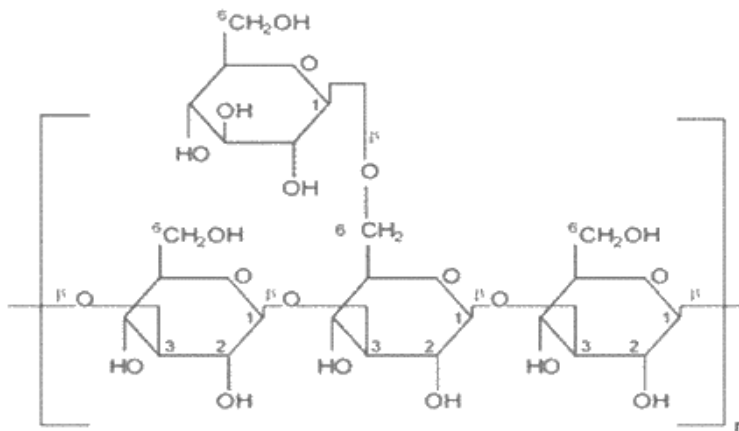
### 3.3.1 Beta–glukany

Hlíva ústříčná je zdrojem přírodní imunomodulační látky beta–glukanu, který se v odborné literatuře označuje jako pleuran. Podle některých názorů je potřeba beta–glukan z hlívy nejprve izolovat a purifikovat (očistit), aby mohl aktivně působit v lidském organismu. Beta–glukan se nachází v buněčných stěnách hub, kde je pevně vázaný s ostatními molekulami, jež jsou zdrojem pevnosti a udržování tvaru buňky. Buněčná stěna hlívy je kromě beta–glukanu tvořena i jinými sacharidy a proteiny. Ty jsou navzájem propojené a provázané tak, aby vytvořili pevnou stavební strukturu. Beta–glukan patří do skupiny imunomodulačních látek, které též nazýváme PAMP (pathogen associated molecular patterns) (Arumugam, 2011). Pomocí receptorů TLR–2 (toll-like receptor 2), lactosilceramidu, CR3 (complement receptor type 3), nacházející se na povrchu makrofágů, dokážou rozpoznat beta–glukan. Receptor CR3, dvouřetězcová molekula, se řadí mezi nejdůležitější pro rozpoznání beta–glukanu. Beta–glukan se váže na sacharidové (lektinové) místo, kdy se po navázání aktivuje fagocytóza. Glukanová aktivace je složena z několika procesů. Jedním z nich je chemokineze, kterou chápeme jako neřízený pohyb buněk. Dalším procesem je chemotaxe neboli řízený pohyb na chemický podnět; systematické postupování makrofágů k cizorodým částicím; degranulace a další prostup do tkání. Následuje proces stimulace, při němž nastane sekrece primárních a sekundárních cytokinů a aktivace T a B lymfocytů (imunocytů) (Novak & Vetvicka 2008).

Tyto molekuly jsou rozpoznávány nespecifickými složkami imunitního systému, jako ta část, vůči které je potřebné aktivovat imunitní odpověď. Následný účinek beta–glukanu je dán jeho přímým kontaktem s imonukompetentními buňkami-makrofágy (Arumugam 2011).

Beta–glukan chemicky patří do beta–1,3–glukanů, přesněji se jedná o poly-beta–1,3–D–glukopyranóza. Biologická dostupnost a imonomodulační účinek beta–glukanů je přímo závislý jak na struktuře konkrétního beta–glukanu, tak na čistotě získaných molekul. Celý proces závisí na tom, do jaké míry je beta–glukan purifikovaný, a tedy schopný vytvářet dokonalou vazbu s receptory na makrofázích. Za cíl procesu se považuje aktivace a uvolnění molekuly beta–glukanu z buněčných stěn hlívy ústříčné. V případě aktivní modulace imunitní

odpovědi je účinek samotné hlívy nejčastěji v sušené formě (prášek) diskutabilní (Ishibashi 2001).



**Obrázek číslo 4:** Strukturní vzorec beta–glukanu (Kidd 2000)

Beta–glukany jsou významnou složkou schopnou podporovat imunitní systém člověka. Dokážou stimulovat nespecifické rezistence vůči infekcím, radiačnímu poškození a nádorům. Beta–glukany jsou schopné zachytit volné radikály způsobující vznik zhoubných nádorů a jsou schopny snižovat vedlejší účinky chemoterapie. K praktickému využití beta–glukanů došlo ku příkladu ve Spojených státech amerických, kde byla prokázána možnost v jejich aplikaci při využití proti bioterorismu, kde v kombinaci s antibiotiky byly beta–glukany schopny chránit imunitu organismu zvířat naočkováných antraxem (Jablonský & Šašek 2006).

Beta–glukany jsou též známy pro svůj silný antioxidační účinek. Neutralizují volné radikály poškozující lipidy buněčných membrán a následně i genetický materiál v buňkách. Existuje několik druhů volných radikálů, kterým se v dnešním světě nelze vyhnout (Yadomae 2000). Kategoricky se jedná o rentgenové paprsky, ultrafialové paprsky ze slunečního záření, mammografy, mobilní telefony, obrazovky počítačů, cestování letadly a vedení vysokého napětí. U těchto forem záření beta–glukan aktivuje makrofágy tak, aby byly schopny zachytávat zbytky radiací poškozené buňky (Ishibashi 2001).

Nejvyšší biologickou aktivitu mají glukany se stupněm větvení v intervalu od 0,20-0,33 (př. lentinan, beta–glukan). Biologická aktivita se zvyšuje také tím, že glukan je ve tvaru šroubovice. Tyto šroubovice mají jednoduchý, polysacharidový řetězec nebo tři řetězce spojené vodíkovými můstky (Zekovic 2005).

Beta–glukany též vhodně působí při, stresu, nachlazení, rekonvalescenci po chirurgickém zákroku a při celkové únavě organismu. Je důležité upozornit na výskyt jednoho omezení, kdy se glukany nesmí užívat, jedná se o stav po transplantaci orgánů (například srdce nebo ledvin). V tomto případě by se tělo snažilo glukany vypudit. Tento fakt však neplatí pro implantáty (kloubní náhražky). Příznivé účinky glukanů se projevují zejména u stárnoucích lidí, kterým navrácí pocit vitality nebo u lidí pracujících pod vysokým fyzickým

či emocionálním stresem a v neposlední řadě u kohokoliv kdo aplikuje zásady zdravého způsobu života (Větvíčka 2011). Z toho vyplývá, že beta–glukany jsou velmi prospěšné pro sportovce, osoby s vysokou mírou fyzické námahy, ale i manažerům či studentům, a jiným kteří žijí pod vlivem stresu (Forejtová 2005).

Beta–glukany přímo aktivují buňky imunitního systému a z toho důvodu nenastává problém rezistence, který nastává při používání běžných antibiotik. Mimo jiné se jedná o přírodní látku působící, aniž by bylo tělo zaplavováno chemickými látkami. Beta–glukany díky takzvanému synergickému efektu urychlují způsob léčení a násobí účinky jednotlivých léčebných metod a zlepšují proces vstřebávání vitaminů a minerálů (Forejtová 2005).

Příznivé účinky dřevokazných hub, ke kterým patří i hlíva ústřičná, na lidský organismus jsou známé již řadu let. Za předpokladu, že se tyto houby konzumují pravidelně a ve velkých dávkách, mají díky vysokému obsahu vlákniny a přirozené produkci látek snižující tvorbu cholesterolu, příznivý vliv na lipidový profil v krvi. V hlívě jsou obsaženy též vitaminy B, D, C a K, minerály, stopové prvky jako jsou sodík, selen, zinek, měď, chrom, jod a některé mastné kyseliny (Salminen 1998).

### **3.3.1.1 Mechanismus beta–glukanů**

Po navázání beta–glukanu na makrofág dojde k následujícím procesům:

- vyšší schopnosti makrofágů pohlcovat cizorodé částice;
- aktivaci buněk specifického imunitního systému (T a B buňky);
- uvolňování faktorů stimulujícího tvorbu kolonií granulocytů, monocytů (kolonizační stimulační faktor GM-CSF) a interferonů;
- postupné uvolňování primárních, ale i sekundárních cytokinů (Zhuang 2016).

Mechanismus působení beta–glukanů je charakteristický tím, že podporuje všechny systémy organismu (nervový, imunitní i hormonální). Přestože princip účinku beta–glukanů není dostatečně známý, biologická aktivita s největší pravděpodobností spočívá v interakci se specifickými beta–glukopyranózovými receptory na leukocytech. Svým působením posilují částice imunitního systému tak, že urychlují tvorbu lymfocytů v kostní dřeni a zvyšují aktivitu leukocytů první linie imunity (makrofágů) a stimulují fagocytózu. Dále také stimulují aktivitu leukocytů druhého pásma imunity (T–lymfocytů) a tím udržují rovnováhu mezi leukocyty (Th–1 a Th–2) (Jablonský & Šašek 2006). Th–1 je odpovědná za imunitu proti intracelulárním parazitům a naopak Th–2 udržuje imunitu extracelulární. V případě, že nastane přerušení rovnováhy mezi lymfocyty, dochází poté k autoimunitním reakcím (Yadomaie 2000). Beta–glukan funguje nejen jako stimulátor imunocytů, ale též dokáže regulovat jejich počet. Je schopný stimulovat produkci prekurzorových buněk z kostní dřeni, kde to jsou zejména hematopoetické kmenové buňky, protože například při různých stresových situacích ztrácí organismus imunocyty a klesá obranyschopnost. Právě díky beta–glukanům vzniká větší počet

nově vytvořených imunocytů v krevním oběhu a v dalších orgánech, díky čemuž má organismus dohled nad imunitou (Novak & Vetvicka 2008).

Makrofágy neboli buňky první linie imunitního systému neustále kolují všemi orgány s cílem najít a odbourat vše cizí a pro naše tělo nežádoucí. Beta–glukany jsou schopny stimulovat makrofágy k maximální aktivitě a napomáhají tak nastartovat obranu našeho těla proti napadení mikroorganismy (Ohno 1995). Makrofágy patří mezi elektronové buňky, sehrávající důležitou funkci při obraně organismu proti bakteriím a virům (Novak & Vetvicka 2008). Za předpokladu, že buňky obranyschopnosti mají dostatečné množství glukanu, jsou odolnější vůči infekcím a rychleji probíhá i proces množení. Beta–glukan makrofágy aktivuje a ty následně pohlcují a ničí veškeré infekční organismy, v první řadě hlavně nádorové buňky. Právě na nádorové buňky má beta–glukan přímý cytostatický účinek, působí však zcela selektivně. To znamená, že ničí pouze buňky nádorového charakteru na rozdíl od klasické chemoterapie, která ničí veškeré buňky, a to i ty mladé a zdravé (Forejtová 2005).

Aktivované makrofágy společně s uvolněnými primárními i sekundárními cytokiny se podílí na nespecifikované imunitě, a to snížením hladiny přebytečných látek z výživy, například cholesterol. Dalším průvodním znakem je schopnost makrofágů pohlcovat cizorodé částice mezi které řadíme viry, bakterie, parazity a plísň. Dále dochází ke snížení hladiny přebytečných hormonů a v neposlední řadě slouží při léčbě onemocnění imunitního systému a zhoubných nádorů (Zhuang 2016).

Při izolaci beta–glukanů z hub lze použít modifikovanou metodu podle Freimunda, jenž zahrnuje extrakci 80% ethanolem, vroucí vodou a alkalickou extrakcí směsí 1M-NaOH a 0,05% NaBH<sub>4</sub>. Během samotného procesu izolace je nezbytné, aby došlo k odstranění glukanu vázaných  $\alpha$ -glykosidovými vazbami a také bílkoviny. Skladba jednotlivých polysacharidů je určena za pomoci Ramanovy, IČ a NMR (nukleární magnetická rezonance) spektroskopie (Distrutti et al. 2016).

### **3.3.1.2 Léčivé účinky beta–glukanů**

Účinky glukanu mají široké spektrum, jsou silným antioxidantem, slouží k prevenci proti kardiovaskulárním onemocněním, mají imunomodulační účinky a podporují růst kožních buněk. Využívají se jak u veterinářů, tak v zemědělství, nebo v kosmetice. Beta–glukany se využívají v protinádorové terapii, tedy u onemocnění, které známe pod pojmem rakovina. Při onemocnění rakovinou se nekontrolovatelně rozmnožují buňky vzniklé narušeným dělením nebo diferenciací. Důsledek vzniku karcinomu může mít původce z hlediska fyzikálního (ionizující záření), chemického (tabákový kouř) nebo biologického (produkty plísní). Tyto faktory spadají mezi externí karcinogeny. Genetické mutace jsou příkladem interních faktorů. Glukany napomáhají v léčbě karcinomu, neboť aktivují a zvyšují počet imunocytů, zejména makrofágů, které jsou schopné rozpoznat a zničit rakovinné buňky. Hlavní studie zabývající se léčbou rakoviny pomocí glukanu pochází z Japonska. Studií byl prokázán pozitivní

účinek při pravidelné aplikaci výluhů z houževnatce jedlého pacientům, kteří se léčí s karcinogenním onemocněním (Yadomae 2000).

U glukánů byly sledovány účinky proti infekci a několika studii bylo potvrzeno, že glukany jsou schopny stimulovat imunitní systém po infekci viry a bakteriemi. Přestože při léčbě snížíme dávku antibiotik nebo antivirotik, účinek antimikrobiální léčby se stále zvyšuje (Phan 2018).

Beta-glukany též aktivně bojují proti cholesterolu, organické látce, která se u teplokrevných živočichů vyskytuje v játrech, žlučníku a nadledvinkách. Dále také ovlivňuje metabolismus tuků. Cholesterol je v buňce syntetizován v izoprenoidní dráze a je regulován za pomoci specifického enzymu HMG-CoA reductáza (hydroxymethylglutarylCoA-reduktáza). Řada hub obsahuje látky, které jsou schopny ovlivnit hladinu cholesterolu. Účinek ovlivnění hladiny cholesterolu se vysvětluje tím, že beta-glukany vytvoří v tenkém střevě viskózní vrstvu, která je schopná snížit absorpci žlučových kyselin. Žlučové kyseliny jsou výsledným produktem odbourání cholesterolu. Beta-glukany se podílí na snížení hladiny cholesterolu, ale také tuku a cukru v krvi, aniž by se markantně snížilo množství inzulínu (Větvicka 2011).

Beta-glukany jsou preventivním lékem při diabetu neboli cukrovce, který se řadí do skupiny chronických onemocnění, které je charakteristické úplným nebo částečným nedostatkem inzulínu. Glukany představují autoimunitní mechanismy, související s ovlivněním činností Langerhansových ostrůvků, čímž mohou zpomalovat rozvoj diabetu (Větvicka 2011).

Léčivé vlastnosti beta-glukanů se připisují i při revitalizaci kůže. Beta-glukany jsou vhodné při léčbě kožních onemocnění, zejména různých povrchových zraněních. Též epidermální makrofágy aktivuje glukan, který působí fotoprotektivně, to znamená, že ochraňuje kůži před zářením, a tím zabraňuje mikrobům proniknout přes poranění. Glukan prostupuje do kožního epidermu a v menším množství i do dermis, do místa, kde vznikají vrásky. A právě v dermis se stimulují fibroblasty a dochází k ukládání kolagenu. Pro tyto účely se glukany izolují z hub či ovsu (Phan 2018).

Neměli bychom opomenout fakt, že existují negativní účinky hub. Houby mají totiž schopnost absorbovat a následně kumulovat z vnějšího prostředí těžké kovy, ty se po sléze uchovávají v myceliu nebo plodnici. Nakumulované těžké kovy mohou negativně ovlivnit náš zdravotní stav. Jedná se hlavně o vyšší hodnoty olova, kadmia a rtuti. Hrozbou pro naše zdraví mohou být také v houbách přítomné jedovaté  $\alpha$ -amanitiny. Požití těchto toxických polypeptidů může vyvolat otravu, která může v konečném důsledku dojít do fáze smrti (Valíček 2011)

Existují potraviny i houby, které nelze konzumovat s alkoholem, například hnojník inkoustový (*Coprinus atramentarius*). Plodnice hnojníku obsahuje látku zvanou coprin, který má v lidském těle funkci blokátoru enzymu štěpícího alkohol. Ten v lidském organismu způsobuje nevolnosti a zažívací potíže. Coprin má obdobný účinek jako látka antabus, používaný v protialkoholních léčebnách (Valíček 2011).



### 3.4 Mastné kyseliny

Mastné kyseliny (MK) jsou hlavní složkou lipidů, které jsou zdrojem energie pro organismus. Mastné kyseliny můžeme dělit do skupin podle délky řetězce. Do skupiny krátké mastné kyseliny (short chain fatty acids – SCFA) řadíme acetát (kyselina octová), propionát (kyselina propionová) a butyrát (kyselina máselná), tedy řetězce se 2-4 uhlíky (Grofová 2010). Mastné kyseliny s krátkým řetězcem jsou důležité pro buňky epitelu tlustého střeva a jsou produkovány střevní mikrobiotou (Wong 2006). Další skupinou jsou mastné kyseliny se středním řetězcem (medium chain fatty acids – MCFA), které obsahují 8-12 uhlíků. Mastné kyseliny s dlouhým řetězcem obsahující 14-22 uhlíků můžeme dělit na nasycené a nenasycené (obsahují dvojná a trojná vazby mezi uhlíky) (Grofová 2010). Nasycené mastné kyseliny obsahují nejčastěji sudý počet uhlíků. V následující tabulce číslo dva je uveden přehled důležitých mastných kyselin se sudým počtem atomů uhlíku v molekule (Velíšek 1999).

**Tabulka číslo 2:** Nasycené mastné kyseliny se sudým počtem atomů uhlíku (Velíšek 1999)

Mastná kyselina	Počet atomů uhlíku	Triviální název
butanová	4	máselná
hexanová	6	kapronová
oktanová	8	kaprylová
dekanová	10	kaprinová
dodekanová	12	laurová
tetradekanová	14	myristová
hexadekanová	16	palmitová
oktadekanová	18	stearová
eikosanová	20	arachová

#### 3.4.1 Mastné kyseliny s krátkým řetězcem

Mastné kyseliny s krátkým řetězcem (SCFA) vznikají v tlustém střevě jako hlavní metabolický produkt anaerobní fermentace střevní mikrobiotou, která osidluje střeva savců (Louis & Flint 2017). SCFA jsou z tlustého střeva transportovány do krve a následně jsou přijímány orgány, kde působí jako substráty nebo signální molekuly (Den Besten et al. 2013).

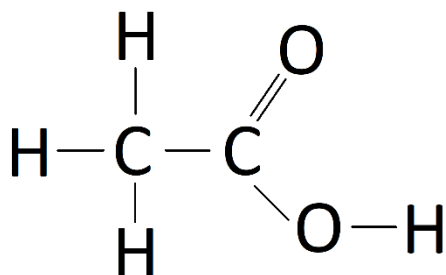
Střevní mikrobiota může fermentovat také endogenní proteiny za vzniku SCFA, ale většina mikroorganismů upřednostňuje fermentaci sacharidů před proteiny. Koncentrace SCFA je tím pádem nejvyšší v proximální části tlustého střeva, kde má mikrobiota k dispozici většinu substrátů pro fermentaci. Směrem k distální části tlustého střeva naopak koncentrace SCFA klesá (Liu et al. 2018). Při fermentaci proteinů jsou často tvořeny mastné kyseliny s rozvětveným řetězcem, jako například isobutyryát, 2-methylbutyryát nebo isovalerát,

kteře vznikají pouze z aminokyselin s rozvětveným řetězcem, jako je leucin, izoleucin a valin (Murugesan et al. 2018).

V lidském těle hrají SCFA velmi odlišné, ale důležité role. Pravděpodobně nejdůležitější SCFA pro lidské zdraví je butyrát, který pro lidské kolonocyty (epitelová buňka sliznice tlustého střeva) vytváří klíčový zdroj energie. Butyrát jeví potenciální protirakovinovou aktivitu, neboť má schopnost indukovat apoptózu (programovaná buněčná smrt) buněk rakoviny tlustého střeva. Zdrojem energie pro epitelové buňky je i propionát, který je přenášen do jater, kde je potřebný při glukogenezi (tvorba glukózy z látek nesacharidové povahy).

Acetát je naopak nezbytný pro růst dalších bakterií (např. *Faecalibacterium*) a je to nejhojnější SCFA (Rowland 2018). Odhaduje se, že SCFA pokrývají ze 60-70 % energetickou potřebu epitelních buněk (Brahe et al. 2013). Vliv na koncentraci SCFA v tlustém střevě má složení stravy, především druh a množství (Duncan et al. 2004). Ve slepém střevě a tlustém střevě je 95 % produkovaných SCFA rychle absorbováno kolonocyty, zatímco zbývajících 5 % je vylučováno ve stolici (Den Besten et al. 2013).

Z krátkých mastných kyselin s krátkým řetězcem dosahuje acetát nejvyšší koncentrace. Velké množství bakterií v tlustém střevě využívá acetát pro svou potřebu. Patří mezi ně několik důležitých skupin produkujících butyrát – *Faecalibacterium prausnitzii*, *Roseburia intestinalis* a *Eubacterium rectale*. Acetát pro svůj optimální růst však využívá i mnoho dalších kmenů. Ne vždy je acetát konečným produktem, neboť bývá důležitý i při syntéze butyrátu. (Duncan et al. 2004). V lidském těle je acetát transportován do periferních tkání a používán při metabolismu cholesterolu a lipogenezi (Nwoko et al. 2017).



**Obrázek číslo 5:** Strukturní vzorec acetátu

Střevní mikrobiota produkuje nejen SCFA, ale také meziproducty fermentace, včetně fumarátu, sukcinátu a laktátu. Tyto meziproducty jsou ovšem normálně detekovány v nízkých hladinách ve stolici zdravých jedinců, neboť jsou jinými bakteriemi dále využívány. Laktát je například obvykle přeměňován jinými bakteriemi na propionát nebo butyrát. Ve stolici je tedy přítomen v zanedbatelných hodnotách (Nwoko et al. 2017).

Acetát je produkován mnoha bakteriemi na rozdíl od propionátu a butyrátu, které bývají produkovány specifickými bakteriemi. Producenti butyrátu v gastrointestinálním traktu (GIT) převládají (například *Lachnospiraceae* a *Faecalibacterium prausnitzii*). Druhy

*Bacteroides*, *Negativicutes* a také některé druhy *Clostridium* produkují propionát (Nwoko et al. 2017).

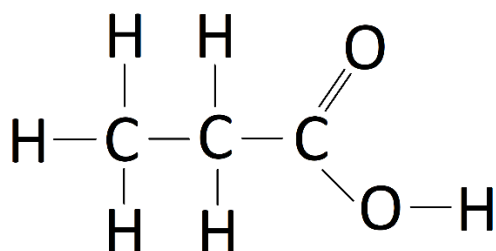
Je zapotřebí zdůraznit, že propionát a butyrát vzniká také fermentací peptidů a aminokyselin, což mají na starost některými druhy bakterií *Bacteroidetes* a *Firmicutes*. Studie in vitro ukazují, že hlavními zdroji propionátu jsou aspartát, alanin, threonin a methionin. Butyrát je převážně získáván fermentací glutamátu, lysinu, histidinu, cysteinu, serinu a methioninu (Rowland 2018).

Ze studie (2014) vyplývá, že většina bakterií buď má schopnost produkovat propionát nebo butyrát. Pouze výjimečně mají genetickou předpoklady pro produkci obou (Reichardt et al. 2014). Některé bakterie však mohou, v závislosti na substrátu, změnit svou fermentaci a vytvářet různé SCFA. *Roseburia inulinivorans* produkuje obvykle butyrát. Ovšem pokud roste na fukóze, pak je schopen zcela změnit svůj vzorec genové exprese, zapnout sadu genů potřebných k využití fukózy jako zdroj energie a produkovat propionát a propanol. *Ruminococcus posum* rostoucí na glukóze produkuje acetát, mravenčan a laktát, ale během růstu na fukóze vytváří propionát. Schopnost bakterie rychle využít metabolický přepínač a měnit jeho metabolismus a metabolické produkty může poskytnout bakterii konkurenční výhodu v období nízké dostupnosti substrátu (Nwoko et al. 2017).

Změna obsahu sacharidů ve stravě může vést k ovlivnění bakteriální skladby a tím ke změně profilu SCFA. Duncan et al. (2004) uvádí, že při snížení obsahu sacharidů ve stravě dochází k významnému snížení jak koncentrace butyrátu, tak počtu skupin *Roseburia*.

#### 3.4.1.1 Tvorba propionátu ze sacharidů

Jsou známy dvě cesty tvorby propionátu střevními bakteriemi ze sacharidů. Sukciátová cesta zpracovává většinu hexózových a pentózových sacharidů, zatímco propandiolovou cestou jsou metaboliovány deoxysacharidy fukóza a ramnóza (Louis & Flint 2017).



**Obrázek číslo 6:** Strukturní vzorec propionát

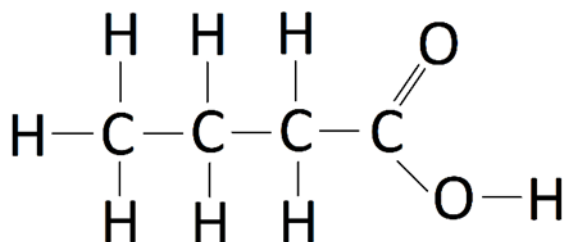
Pro tvorbu propionátu je hlavní cesta sukciátová, kterou poskytují hlavně *Bacteroidetes* a *Firmicutes*. Prekurzorem je právě propionát, který se ovšem může akumulovat v *Bacteroides* například při vysokých hodnotách CO<sub>2</sub> a vysoké rychlosti ředění. Zejména *Prevotella copri* zřejmě produkuje spíše sukcinát než propionát jako svůj hlavní produkt fermentace. Jako další lze uvést například *Ruminococcus flavefaciens*, který také produkuje sukcinát spíše než

propionát jako konečný produkt. Na druhou stranu některé bakterie patřící do třídy *Firaticutes* *Negativicutes* (např. *Phascolarctobacterium succinatutens*) mají schopnost převést sukcinát na propionát. Jiné bakterie (např. *Negativicutes*) pak umí přeměňovat laktát na propionát buď sukcinátovou cestou (např. *Veillonella*) nebo akrylátovou cestou (*Megasphaera elsdenii*) (Louis & Flint 2017).

Propandiolová cesta při tvorbě propionátu z deoxysachyridů rhamnózy a fukózy byla prokázána u druhu *Lachnospiraceae*, včetně *Roseburia inulinivorans* a *Blautia*. Jiné bakterie jsou schopné degradovat deoxysacharidy propandiolovou dráhou, ale jako konečný produkt vytvářejí meziprodukt 1,2-propandiol (např. *Anaerostipes rhamnosivorans*). 1,2-propandiol může vznikat také z glykolýzových meziproduktů, dihydroxyaceton-fosfát a methylglyoxal, na čemž se podílí *Escherichia coli*, *Clostridium sphenoides* a kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*. Methylglyoxal je dále metabolizován na 1,2-propandiol buď hydroxyacetonem nebo laktaldehydem. Další cesta k tvorbě 1,2-propandiolu prostřednictvím laktaldehydu probíhá z laktátu v *Lactobacillus buchneri* (Louis & Flint 2017). 1,2-propandiol dále využívají k tvorbě propionátu *E. Hallii* a *Lactobacillus reuteri*, i když nejsou schopni růst na fukóze nebo rhamnóze (Engels et al. 2016).

#### 3.4.1.2 Tvorba butyrátu ze sacharidů

Glykolýzou sacharidů vzniká butyrát. Děje se tak následovně. Nejprve je molekula acetyl-CoA metabolizován na acetoacetyl-CoA a poté postupně redukována na butyryl-CoA. Dalším krokem je tvoření butyrát buď enzymy fosfotransbutyrylázou, butyrát-kinázou a butyryl fosfátu nebo pomocí butyryl-CoA: acetát CoA-transferáza (Louis & Flint 2009).



**Obrázek číslo 7:** Strukturní vzorec butyrát

Druhy produkující butyrát se vyskytují rozptýlené s druhy butyrát neprodukcujícími. Butyrát produkující druhy převládají. Jsou jimi: *Firmicutes*, *Ruminococcaceae* a *Lachnospiraceae*. Nutno podotknout, že mnoho *Firmicutes* postrádá schopnost tvořit butyrát přímo ze sacharidů (Louis & Flint 2017).

Jedním z nejhojnějších druhů v lidské mikrobiotě je *Faecalibacterium prausnitzii*, který produkuje butyrát prostřednictvím butyryl-CoA: acetát CoA-transferázy, přičemž acetát stimuluje jeho růst na sacharidových zdrojích energie. Ačkoli jsou *Faecalibacterium prausnitzii* anaerobní bakterie, tak vykazují stimulaci růstu při nízké koncentraci kyslíku v přítomnosti riboflavinu a redukovaných sloučenin (př. cystein nebo glutathion). Spotřeba kyslíku je ale

doprovázena snížením tvorby butyrátu (Louis & Flint 2017). Podle Lopez-Siles et al. (2012) vykazují *Faecalibacterium prausnitzii* omezenou schopnost využívat pro svůj růst polysacharidy, jako je škrob a hemicelulóza, ale některé kmeny preferují deriváty inulinu a pektinu.

*Eubacterium rectale* a blízké příbuzné druhy *Roseburia* tvoří hlavní skupinu bakterií produkujících butyrát, které využívají cestu tvorby butyrátu prostřednictvím butyryl-CoA:acetát CoA-transferázy. Některé kmeny *Roseburia* produkují butyrát téměř jako jediný produkt fermentace, především při pH mírně kyselém. Čistá spotřeba acetátu je typicky doprovází tvorbu butyrátu. Jiné kmeny a druhy vytváří při fermentaci kromě butyrátu také mravenčan a laktát (Louis & Flint 2017). V této skupině existuje značná kapacita pro využití polysacharidů včetně škrobu, arabinoxylanu a inulinu, která se mezi kmeny a druhy podstatně liší (Sheridan et al. 2016).

### 3.4.1.3 Tvorba propionátu a butyrátu z proteinů a aminokyselin

Při fermentaci peptidů a aminokyselin (AMK) mohou také vznikat propionát a butyrát, ačkoli se odhaduje, že počet bakterií fermentujících peptidy a AMK je nižší než 1 % lidské mikrobioty (Dai et al. 2011). Zdá se, že peptidy jsou bakteriemi preferované před volnými AMK. V přítomnosti sacharidů a při nízkém pH se snižuje fermentace peptidů a AMK. To vysvětluje zvýšenou fermentaci AMK v distální části tlustého střeva. Při fermentaci AMK nedochází k tvorbě pouze SCFA, ale také ke vzniku potenciálně škodlivých metabolitů, jako jsou fenolové a indolové sloučeniny, aminy nebo amoniak (Louis & Flint 2017).

Propionát je produkován především z aspartátu, alaninu, threoninu a methioninu a hlavní roli v jeho vzniku hrají *Bacteroidetes*. Při produkci butyrátu jsou důležité *Firmicutes*, které využívají především glutamát, lysin, histidin, cystein a serin (Louis & Flint 2017).

Pro degradaci glutamátu existuje několik různých cest. Hlavní cesta je 3-methylasparátová přes pyruvát, kterou využívají například *Clostridium limosum* nebo *Fusobacterium*. Další cestu 4-aminobutyryl-CoA využívají *Firmicutes* včetně *Acidaminococcus fermentans*, *Clostridium sporosphaeroides*, *Clostridium symbiosum*, *Fusobacterium* a *Peptostreptococcus asaccharolyticus*. Některé bakterie patřící do *Acidaminococcaceae* také degradují glutamát cestou 3-methylasparátovou, ale produkují spíše propionát než butyrát z meziprojektu pyruvátu (Louis & Flint 2017).

Zpracovávání glutamátu na 4-aminobutyryl (též  $\gamma$ -aminobutyryl, GABA) se provádí v kyselém prostředí, aby se udržovala homeostáza intracelulárního pH (Feehily & Karatzas 2013). GABA působí také jako neurotransmiter, to znamená, že mnoho mikrobů zapojených do produkce nebo spotřeby GABA může ovlivnit náladu a chování. Cesta pro degradaci GABA je spojena s degradací sukcinátu pomocí sukcinát semialdehydu a 4-hydroxybutyryl-CoA. Tvorba butyrátu ze sukcinátu touto cestou byla prokázána v *Porphyromonas gingivalis* a *Clostridioides difficile* (Yoshida et al. 2016).

#### 3.4.1.4 Analýza krátkých mastných kyselin

Plynová chromatografie se stále jeví jako nejčastěji používaná kvantifikační metoda SCFA. Dalšími užívanými metodami jsou kapalinová chromatografie (LC), vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC), kapilární elektroforéza (CE) a nukleární magnetická rezonance (NMR) (Primec et al. 2017).

Aby se zabránilo znehodnocení odebraného vzorku, tak je nutné ho uchovávat ve vhodných podmínkách. Většinou je to  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , ale je mnoho vědců, kteří úspěšně použili i  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Před analýzou SCFA se musí zvážit dva důležité kroky předúpravy, to je extrakce a derivatizace. Jejich kvantitativní extrakci do hydrofobních organických rozpouštědel ztěžuje fakt, že jsou částečně hydrofilní. Pro zlepšení extrakce se obecně používá okyselení vzorku. Doporučuje se derivatizace na snadno detekovatelné látky, protože SCFA neobsahují chromofory, které by umožňovaly snadnější detekci v UV nebo fluorescenčním spektru. V praktické části byla použita NMR analýza, proto se jí teď budeme věnovat (Primec et al. 2017).

Jednotlivá atomová jádra mají svou magnetickou charakteristiku a jsou schopny absorbovat a emitovat elektromagnetické záření v magnetickém poli. Tím produkují energii, která se objevuje při specifické rezonanční frekvenci. NMR je kvantitativní, objektivní, nedestruktivní a opakovatelná metoda. Je to komplexní a dostatečně citlivá metoda, jejíž detekční limity koncentrace metabolitů dosahují rozmezí  $\mu\text{M}$  a stále klesají. NMR analýza je používána hlavně při současném sledování různých metabolitů v komplexním biologickém materiálu z hlediska chemického složení a koncentrací. NMR nevyžaduje velkou předúpravu vzorků. Takzvané NMR metabolické profilování dává možnost výroby rychlých, stabilních a reprodukovatelných profilů (Primec et al. 2017).

Při NMR analýzách se doporučuje používat deuterovaná rozpouštědla, která korigují intenzitu pole a která zabrání obrovské absorpci rozpouštědla. Ta totiž může zkazit  $^1\text{H}$ -NMR spektrum, což může mít za následek nákladný a časově náročný postup. To může vést k významným ztrátám analytů. Metoda NMR by měla způsobovat pouze drobné změny v materiálu a být tedy nedestruktivní (Primec et al. 2017).

Cai et al. (2017) porovnával metody kvantifikace SCFA pomocí GC – MS a NMR spektroskopii. Hodnotil citlivost, výtěžnost, opakovatelnost a maticový efekt. GC – MS vykázala vynikající citlivost pro měření kyseliny octové a kyseliny máselné. Při NMR analýze se ukázalo, že kvantifikace vzhledem k vnitřnímu standardu, či kvantifikaci s použitím kalibrační křivky přineslo lepší opakovatelnost a minimální efekty matice ve srovnání s metodami GC – MS. Primec et al. (2017) uvádí, že možná příčina nízké citlivosti a rozdílů ve výsledcích může být způsobena různými postupy předúpravy a získávání dat.

Vzorky lidské stolice byly použity na analýzu NMR, která byla využita ke sledování metabolické aktivity člověka, zejména účinku mikrobioty na regulaci metabolismu hostitele. NMR metabolické profilování by mohlo představovat budoucí diagnostickou metodu nemoci (Jacobs et al. 2007).

NMR uspokojuje potřebu jednoduchého postupu předzpracování vzorku, ale náklady na přístrojové vybavení jsou často mimo dosah laboratoří (Primec et al. 2017).

### 3.4.1.5 Princip NMR spektroskopie

NMR patří ke spektroskopickým metodám zakládajících se na magnetických vlastnostech atomových jader. Základem atomového jádra jsou protony, jejichž počet udává protonové číslo, a neutrony, jejichž počet udává nukleonové číslo (spolu s počtem protonů). U většiny atomů prvků dochází k rotaci jejich jádra kolem své vlastní osy, čímž dochází k vzniku slabého magnetického pole, které je schopné vytvářet s vnějším magnetickým polem. Tato jádra mohou vykazovat magnetický moment  $\mu$ , neboť mají takzvaný vnitřní moment hybnost  $p$  (jaderný spin). Magnetický moment  $\mu$  je daný vztahem:

$$\mu = \gamma p$$

kde  $\gamma$  je gyromagnetický poměr. Gyromagnetický poměr je konstanta úměrnosti a díky magnetickým vlastnostem jádra je pro každý určitý izotop charakteristická (Hesse et al. 2008).

V jádře prvku dochází k párování spinů neutronů a protonů, díky tomu rozlišujeme dle protonového a nukleonového čísla tři možnosti hodnot, kterých bude spinové kvantové číslo  $I$  nabývat:

- Nukleonové číslo je liché:  $I = 1/2, 3/2, 5/2...$  (př.  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ )
- Nukleonové číslo je sudé a protonové liché:  $I = 1, 2, 3...$  (př.  $^2\text{H}$ )
- Nukleonové i protonové číslo je sudé:  $I = 0$  (př.  $^{12}\text{C}$ ,  $^{16}\text{O}$ )

Pomocí NMR spektroskopie mohou být měřena pouze jádra s nenulovým spinovým kvantovým číslem  $I$ , protože pouze taková jádra vykazují magnetický moment  $\mu$ . Pro NMR jsou nejvýhodnější jádra s  $I = 1/2$ . Pokud má jádro vyšší spinové kvantové číslo, tak dochází ke komplikacím při měření spekter, neboť má navíc jaderný kvadrupólový moment. Mezi nejdůležitější měřená jádra v organické chemii patří:  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{31}\text{P}$ ,  $^{17}\text{O}$ ,  $^{19}\text{F}$ , a  $^{29}\text{Si}$  (Hesse et al. 2008).

Nejdražší částí NMR spektrometru je supravodivý magnet, který je tvořen solenoidní cívkou ze supravodivé slitiny (Nb–Ti nebo Nb–Sn). Tato cívka je ponořena do kryostatu, ve kterém je kapalným heliem chlazená na teplotu přibližně 4 K (– 270 °C). Aby nedocházelo k vypařování helia, tak je ještě obklopena tekutým dusíkem, jenž má teplotu zhruba 77,4 K (–196, °C). Tekutý dusík funguje také jako tepelný nárazník mezi teplotou v místnosti a heliem. V kryostatu se nachází dvě Dewarovy nádoby, jedna chrání cívku a kapalně helium, druhá je vyplněna kapalným dusíkem. Vakuový obal toto vše chrání (Jacobsen 2007). Je důležité, aby magnetické pole na vzorek působilo stále stejným způsobem, a tedy bylo homogenní. V přístroji je proto umístěna sada různě prostorově orientovaných korekčních cívek, které tuto homogenitu zajišťují (Spyros & Dais 2012).

NMR spektrometr se dále skládá ze sondy, ADC a výkonného počítače. Sonda, do které je umístována květa se vzorkem, střídavě vysílá a přijímá radiofrekvenční signály. Vysílání

těchto signálu je řízeno počítačem, jenž má na starost sílu a dobu vysílání, které musí být rychlé. Slabý signál–FID (free induction decay = volně doznívající indukce) je ihned po pulzu přijat a zesílen sondou. Poté je za pomoci ACD přeměněn na signál digitální, kterým je v podstatě seznam čísel. Následně dojde v počítači k Fourierově transformaci a na obrazovce počítače se zobrazí výsledné spektrum jako závislost intenzity na frekvenci. (Jacobsen, 2007).

### 3.5 Střevní mikrobiota

Mikrobiota střev, dříve nazývaná mikroflóra (avšak i dnes se s tímto pojmem v odborné literatuře setkáme), je tvořena bakteriemi, plísněmi, ale i houbami nebo parazity. V samotné mikrobiotě se nachází mikrobiom, čímž se označuje genetická informace střevní mikrobioty (Drastich, 2018).

Je zřejmé že, bakterie jsou důležitou součástí intenziva (střeva). Bakterie zde hrají nezastupitelnou roli, mimo jiné zastávají nespočet významných metabolických a imunitních funkcí. Podílí se například na udržení epitelální bariéry, stojí za utvářením vrozené slizniční imunity a v neposlední řadě zpracovávají nestravitelné části potravy, z nichž produkují tělu potřebné látky a vitamíny. (Leviton & Hargrove 1952).

Střevní mikrobiota hraje důležitou roli při udržování lidského zdraví. K samotnému formování složení střevního mikrobiomu přispívá genetika, mimo jiné i způsob narození, vzorce složení výživy kojenců, užívání antibiotik, hygienické životní podmínky či dlouhodobé stravovací návyky. Jako jeden z nejdůležitějších faktorů vývoje mikrobiomu se uvádí především strava jedince, a to od kojeneckého věku až po věk seniorský. Mikrobiota střev kojenců je charakterizována vysokou mírou nestability a dosahuje stavu podobného stavu dětí ve věku 2-3 let, a to v souladu se zavedením pestré stravy při přechodu na pevné potraviny. Mezi faktory souvisejících se stravou, které ovlivňují vývoj mikrobiomu střev kojenců, patří například to, zda je dítě kojeno nebo kojeno není. Jakož i to, jak a v jakém věku byla zavedena pevná strava do jídelníčku dítěte. Na rozdíl od střev kojenců je mikrobiom dospělého střeva odolný vůči velkým změnám ve struktuře komunity. Několik studií prokázalo, že změny ve stravě vyvolávají přechodné výkyvy v mikrobiomu dospělých, někdy jsou výkyvy znatelné i za pouhých 24 hodin. Mikrobiální komunita se však rychle vrací do stabilního stavu. Současně znalosti toho, jak dlouhodobé stravovací návyky formují střevní mikrobiomy, jsou omezeny nedostatkem dlouhodobých studií výživy spojených s časovou charakterizací střevní mikrobioty. Prokázáno však bylo, že potraviny obsahující prebiotické oligosacharidové složky, které vyživují prospěšné komenzály ve střevní komunitě, a probiotické doplňky jsou posuzovány v konečném výsledku jako potenciálně zlepšující zdravotní stav jednotlivce (Voreades et al. 2014).

Hmotnost střevní mikrobioty je udávána v rozmezí 1-2 kg (Patterson et al. 2016). Je odhadováno, že v tomto celkovém množství jsou ukryty až desítky bilionů bakterií, které nás svou činností neustále ovlivňují. Plní svou funkci při zpracování přijaté potravy v různé metabolity pomocí jim vlastních enzymů a látek. Na základě provedených výzkumů se předpokládá, že střevní mikrobiota má až 150krát více genů než lidský genom (Jurásková,



2019). To dává dispozici zpracovávat látky nestravitelné pro člověka, jako je například vláknina. Nicméně množství všech buněk v zažívacím traktu se pohybuje v rozmezí  $10^{13}$ - $10^{14}$  (Gill et al. 2006).

Počet bakterií se však v jednotlivých částech trávicího traktu mohou zcela významně lišit. V oblasti od žaludku po lačník je jich, co se do počtu vezme, nejméně, přibližně kolem  $10^2$ . V distální části kyčelníku je počet bakterií vyčíslen mezi  $10^7$ - $10^8$ . Nejvíce bakterií se vyskytuje v tlustém střevě, jejich počet je stanoven na  $10^{11}$ - $10^{12}$  (Patterson et al. 2016). V největším počtu jsou zde zastoupeny kmeny *Bacteroides* a *Firmicutes*. Střevní mikrobiotu lze rozdělit do tří samostatných enterotypů, ve kterém převládá vždy jeden rod bakterií. Na zařazení má však značný vliv strava, kterou člověk požívá. Nutno podotknout, že nebyl poukázán účinek dalších faktorů, jako je pohlaví jedince či jeho věk nebo index tělesné hmotnosti (BMI). V prvním enterotypu převládá rod *Bacteroides*, ve druhém se jedná o rod *Prevotella* a ve třetím se nachází enterotyp rodu *Ruminococcus* (Jurásková 2019).

Součástí trávicího traktu je imunitní systém, jehož úkolem je chránit lidské tělo před patogenními organismy a toxiny, které by mohly narušit střevní integritu nebo homeostázu organismu jako celku. Dalším úkolem imunitního systému je odlišit látky tělu škodlivých od neškodných. Proto k zajištění homeostatické funkce vznikly specializované slizniční lymfatické tkáně (MALT–mucosa associated lymphoid tissue neboli slizniční lymfoidní tkáň) (Tlaskalova-Hogenova et al. 2014).

### 3.5.1 Střevní mikrobiota a její vývoj

K rozvoji střevní mikrobioty dochází od narození, předpokládá se však, že vyvíjející se plod do kontaktu s bakteriemi přichází již v těle matky skrze placentu. Placenta totiž obsahuje jen malé množství bakterií převážně z nepatogenních rodů. Uvést můžeme zástupce druhů *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Tenericutes* aj. Ovšem k samotnému procesu kolonizace střeva dochází až po porodu (Jurásková, 2019).

Skladba mikroorganismů ve střevní mikrobiotě novorozeného jedince je ovlivněna tím, zda přišel na svět přirozenou cestou či císařským řezem (Dominguez-Bello et al. 2010). U jedinců, jenž přišly na svět pomocí císařského řezu, je značná absence *Bifidobacterias*. Oproti tomu u dětí, které přišly na svět přirozenou cestou významně převládají bakterie druhu *Bifidobacterium longum* a *Bifidobacterium catenulatum* (Biasucci et al. 2010).

Rozdíl ve skladbě střevní mikrobioty u dětí, které přišly na svět císařským řezem nebo naopak přirozenou cestou, je způsobem tím, že při porodu (přirozenou cestou) dochází k prvotnímu styku s bakteriemi z vaginálního a análního prostředí matky. Oproti tomu porod císařským řezem má absenci tohoto prvotního kontaktu. Nehledě na samotný proces porodu je dalším důležitým faktorem pro správný vývoj střevní mikrobioty novorozenců kojení. Mateřským mlékem dostává dítě do svého těla potřebné látky, kterými jsou i protilátky typu lysozym a lactoferrin. Kojenci, jenž jsou krmeni umělou výživou, mají ve své mikrobiotě větší počet bakterií druhu *Bacteroides* a *Enterobacteria*. Nicméně mají snížený počet *Bifidobacteria*.

Jako další výhodu mateřského mléka lze uvést, že se podílí na snížení výskytu potravinových alergií. K mírným změnám střevní mikrobioty dochází v době, kdy dítě přechází na pevnou stravu. Následně během dospívání a v dospělosti dochází ke změnám stravovacích návyků, jenž mohou střevní mikrobiotu ovlivnit (Jurásková 2019).

### **3.5.2 Střevní mikrobiota a její ovlivňování**

Střevní mikrobiota bývá ovlivněna zejména stravou a užíváním antibiotik. V případě, že je naše strava jednotvárná, může dojít ke stavu, kdy některé bakterie mají vyšší přísun živin a tím se stávají jejich podmínky pro život ve střevě lepší. K menší rozmanitosti střevní mikrobioty dochází v okamžiku, kdy některé bakterie nedostávají dostatečné množství živin. Právě zmiňovaná léčba antibiotiky má prokazatelně negativní dopad na střevní mikrobiotu, kdy způsobuje změny v jejím složení a snižuje její rozmanitost. Změny tohoto typu mají mimo jiné dopad i na aktivitu bakterií a produkci metabolitů, které mohou následně ovlivňovat metabolické dráhy hostitele. Jedná se například o přeměnu metabolické dráhy sacharidů, mastných kyselin nebo nukleotidů (Jurásková 2019). Užívání antibiotik v době do 3 let věku dítěte, má největší vliv na střevní mikrobiotu. Právě v této době dochází k budování imunitního systému jedince. U novorozenců, kteří užívali antibiotika bylo prokazatelně zjištěno, že vykazovali odlišnosti ve složení střevní mikrobioty, neboť nedocházelo k předpokládané kolonizaci bakteriemi *Bifidobacterium* (Fouhy et al. 2012). A právě nedostatečná rozmanitost střevní mikrobioty má vliv na imunitní systém. V pozdějších letech jedince nastává zvýšení rizika výskytu astmatu (Jurásková 2019).

### **3.5.3 Střevní mikrobiota a její produkty**

Střevní bakterie vytvářejí látky označované jako metabolity, které mají blahodárný vliv na lidské zdraví, neboť jsou některé dokonce nepostradatelným prvkem pro správný růst dětí. Jedná se například o vitamíny, žlučové kyseliny, mastné kyseliny s krátkým řetězcem a cholin (Castanys-Muñoz et al. 2016). Mezi nejvýznamnější metabolity řadíme mastné kyseliny s krátkým řetězcem neboli SCFA (z anglického Short Chain Fatty Acids). Mastné kyseliny s krátkým řetězcem vznikají rozkladem uhlovodíků při kvašení. Mezi tyto uhlovodíky patří nestravitelné sacharidy, jako je například vláknina. Nejdůležitější kyseliny zastoupeny v mastných kyselinách s krátkým řetězcem patří acetát, butyrát a propionát. Největší koncentrace těchto látek byla zaznamenána v tlustém střevě, kde jsou zastoupeny v poměru 57:21:22. Oblasti střeva s nižším pH jsou schopny vytvářet lepší podmínky pro kvašení a tím i vyšší koncentraci mastných kyselin s krátkým řetězcem. Naopak v oblastech s vyšším pH vzniká menší množství metabolitů. Následně se z tlustého střeva tyto metabolity dále dostávají do krevního oběhu, do hepatické, portální a periferní žilní krve, kde se koncentrují v nižším množství (Jurásková 2019).

## 4 Metodika

Tato diplomová práce je založena na experimentu, při kterém se zkoumalo množství vzniklých krátkých mastných kyselin po fermentaci vybraných kmenů hub rodu *Pleurotus* pomocí mikroorganismů obsažených v lidské stolici. Rod *Pleurotus* je znám vysokým obsahem beta–glukanů, které slouží jako prekurzor krátkých mastných kyselin. Vzorky byly odebrány v definovaných časových intervalech a poté analyzovány pomocí NMR (Nuclear magnetic resonance).

### 4.1 Materiál

#### 4.1.1 Chemikálie

Chemikálie potřebné na přípravu média byly: hydrogenuhličitan sodný, hydrogenuhličitan amonný, dihydrogenfosforečnan draselný, heptahydrát síranu hořečnatého, dihydrát hydrogenfosforečnanu sodného, dihydrát chloridu vápenatého, hexahydrát chloridu kobaltnatého, tetrahydrát chloridu manganatého, hexahydrát chloridu železitého, cystein hydrochlorid, 1M hydroxid sodný, nonahydrát sulfidu sodného, 6M kyselina chlorovodíková, trypton a rezaurin. Pro ustanovení anaerobního prostředí byl použit plyn OFN (oxygen free nitrogen). Zakoupeny byly od firmy Merck, Darmstadt, Německo. Také byl použit NMR pufr složený ze 1,5M hydrogenfosforečnanu draselného, 1,5M hydrogenfosforečnanu sodného, 0,2 % azidu sodného a 5 mM kyseliny trimethylsilylpropinové–TSP (pH 7,4).

#### 4.1.2 Vzorky vybraných hlív

Pro pokus bylo vybráno 6 kmenů hlív: *Pleurotus flabellatus*, *Pleurotus pulmonarius*, *Pleurotus ostreatus opuntiae*, *Pleurotus ostreatus ivory*, *Pleurotus ostreatus 5175* a *Pleurotus ostreatus X.*, které byly zakoupeny od výrobců sadby Sylvan a Amycel nebo byly použity vlastní sbírky a sbírky VÚRV Praha Ruzyně. S vybranými kmeny byly založeny 2 výnosové pokusy. Jeden byl uzavřen v roce 2019. Druhý pokus byl ukončen v lednu 2020.

Kultivace proběhla v pokusné pěstírně ČZU FAPPZ na Katedře zahradnictví. K pěstování byly použity tepelně ošetřené slaměné pelety. Kolonizace trvala 21 dnů a fruktifikace při 16 °C trvala 5 týdnů. Teplomilné kmeny při teplotě 16 °C plodily později (po 17 dnech). Plodnice byly poskytnuty Ústavu sacharidů a cereálií VŠCHT a Katedře kvality a bezpečnosti potravin ČZU k příslušným analýzám. Pro analýzu na NMR byly vzorky plodnic lyofilizovány a následně namleté.

#### 4.1.3 Stolice dárců

Jako zdroj střevních bakterií pro experiment byly použity lidské stolice od tří dárců. Vzorky stolice byly odebrány od zdravých dárců s normální BMI, ve věku 25-42 let, kteří neměli

žádné gastrointestinální obtíže ani diagnostikovanou nemoc a nebrali antibiotika po dobu min. 6 měsíců. Dárci před odběrem nemuseli držet žádnou dietu. Důležité bylo, aby stolice byla čerstvá. Pro fermentaci bylo potřeba minimálně 24 g. Studie byla schválena etickou komisí fakultní nemocnice Královské Vinohrady a dárce podepsali informovaný souhlas.

#### 4.1.4 Odběr stolice

Odběr vzorků stolice byl proveden do uzavíratelných plastových nádob s vnitřním plastovým sáčkem. Do nádoby byl ihned po odběru přiložen k čerstvému vzorku stolice anaerobní katalyzátor GENbag anaer (Biomérieux, Lyon, Francie), který v odběrné nádobě utvářel anaerobní atmosféru vhodnou pro střevní bakterie. Vzorky stolice byly zpracovány do 2 hodin od odběru.

## 4.2 Metodika

### 4.2.1 Příprava zásobních roztoků

Na začátku byly připraveny následující zásobní roztoky:

- Uhličitanový pufr – obsahoval 4 g hydrogenuhličitanu amonného, 35 g hydrogenuhličitanu sodného a byl rozpuštěn v 1 litru destilované vody.
- Makromineralový roztok – byl rozpuštěn v 1 litru destilované vody a obsahoval 5,7 g hydrogenfosforečnanu sodného, 6,2 g dihydrogenfosforečnanu draselného a 0,3 g síranu manganatého.
- Mikromineralní roztok – byl získán rozpuštěním 2,5 g dihydrátu chloridu vápenatého, 2,5 g tetrahydrátu chloridu manganatého, 0,25 g hexahydrátu chloridu kobaltnatého a 1,25 g chloridu železitého ve 25 mL destilované vody.
- Sodno-fosfátový pufr – byl připraven smícháním 610 mL 1/15M dihydrátu hydrogenfosforečnanu sodného a 390 mL 1/15M dihydrogenfosforečnanu draselného a vyrovnán na hodnotu pH=7,0.

Poté bylo připraveno 2,5 L fermentační médium. Na 1 litr bylo potřeba 2,25 g tryptonu rozpuštěného ve 450 mL destilované vody, 225 mL uhličitanového pufru, 112,5 µl mikromineralního roztoku, 225 ml makromineralního roztoku a 1125 µl 0,1% resazurinového roztoku.

Dále bylo naváženo 0,8 g lyofilizovaných vzorků hub do 50 mL fermentačních viálek, které byly následně uzavřeny hliníkovými krimpovacími víčky s PTFE/silikonovým septem. Připraveny byly také kontrolní varianty bez stolice nebo plodnice hub. Experiment měl plně faktoriální design, 3 dárce × 6 vzorků hub + 2 blanky (1 bez stolice a 1 bez houby), každá kombinace byla ve 2 opakováních.

#### 4.2.2 Fermentace vzorků

Nejprve byl připraven čerstvý redukční roztok. Obsahoval 625 mg cystein hydrogenuchloridu, 4 mL 1M hydroxidu sodného a 625 mg nonahydrátu sulfidu sodného a byl rozpuštěn ve 100 ml destilované vody.

Fermentační médium uzavřené vatou v erlenmeyerových baňkách bylo sterilováno varem, zhruba 7 minut do růžového zbarvení, a poté zchlazeno na 37 °C za současného přívodu plynného dusíku (OFN). Pomocí 6M HCl bylo vyrovnáno pH na hodnotu 7. Následně bylo pipetou přidáno 43 mL fermentačního média a 2 mL redukčního roztoku do každé krimpovací víálky, které byly poté pročištěny OFN, aby byl odstraněn atmosférický kyslík. Pomocí stomacheru (AES Laboratorie) bylo zhomogenizováno 24 g čerstvé lidské stolice s 75 mL fosfátového pufru. Směs byla poté přefiltrována přes nylonový filtr a 5 mL fekální suspenze bylo přidáno přes septum pomocí injekční stříkačky do fermentačních víálek, které byly následně protřepány.

Ihned byly odebrány vzorky v časovém bodě 0 hodin do zkumavek Eppendorf, vždy 3 opakování po 1000 µl. Fermentační víálky byly umístěny do třepací lázně s teplotou 37°C. Další odběr vzorků byl proveden stejně v časových intervalech 4, 8 a 24 hodin. Do doby měření na NMR spektrometru byly odebrané vzorky ve 1,5 mL zkumavkách Eppendorf zamrazeny na -80 °C, aby byla zastavena fermentace.

#### 4.2.3 NMR analýza

Po rozmražení byly vzorky zhomogenizovány na vortexu a následně zcentrifugovány (Rotanta 460, Hettich, Německo) při teplotě 4 °C po dobu 10 min při 15 000 ot/min. Poté bylo vždy 600 µL supernatantu přeneseno do zkumavky Eppendorf a smícháno s 66 µL NMR pufru. Vzorek byl znovu centrifugován při 4 °C po dobu 5 min při 15 000 ot/min. Do připravených 5 mm NMR květ bylo přeneseno 600 µL výsledného supernatantu. NMR analýza byla provedena na spektrometru Bruker Avance III (Německo) vybaveném 5 mm broadband observation sondou (BBFO) SmartProbe se Z-gradientem (Bruker BioSpin GmbH, Rheinstetten, Německo), pracující při protonové frekvenci 500.23 MHz. Měření byla realizována při teplotě 298 K (25 °C). 1H NMR spektra byla získána a zpracována za stejných podmínek. Pro potlačení signálu vody byla využita pulzní sekvence noesypr1d při 4,704 ppm. Při jednodimezionálním 1H experimentu byly pro každý vzorek použity následující parametry: počet datových bodů 32k při šířce spektra 16 ppm, počet skenů 128, akviziční čas 4 s, relaxační prodleva 1 s, směšovací čas na presaturaci signálu vody 0,1 s. Ladění přístroje, kalibrace 90° pulzu a šimování byly optimalizovány automaticky pomocí standardních automatických rutin (atma, lock, rga, pulsecal a topshim). Analýza jednoho vzorku trvala přibližně 15 minut. Signál volné precese (FID) byl před Fourierovou transformací zpracován zero filling, line broadening 0,3 Hz a exponenciální multiplikací.

#### 4.2.4 Zpracování výsledků

Spektra byla manuálně fázována a referencována na TSP 0.00 ppm v programu Topspin. Alignment a export spekter byl proveden v programu Mestrenova, cílové profilování látek a kvantifikace v programu Chenomx 8.5.

Výsledné obsahy mastných kyselin s krátkým řetězcem ve vzorcích stolice byly statisticky vyhodnoceny v programu Microsoft Excel. Statistická analýza byla provedena v programu SPSS (IBM). K určení rozdílu mezi jednotlivými vzorky byl pro každý čas proveden Studentův t-test (2-výběrový) s Bonferoniho korekcí pro vícenásobné porovnání, výsledky byly považovány za průkazné při  $p < 0.05$ .

## 5 Výsledky

Byly vyhodnocovány obsahy mastných kyselin s krátkým řetězcem ( $\text{mg}\cdot\text{dL}^{-1}$ ) v průběhu času a v závislosti na jednotlivých kmech hub rodu *Pleurotus*.

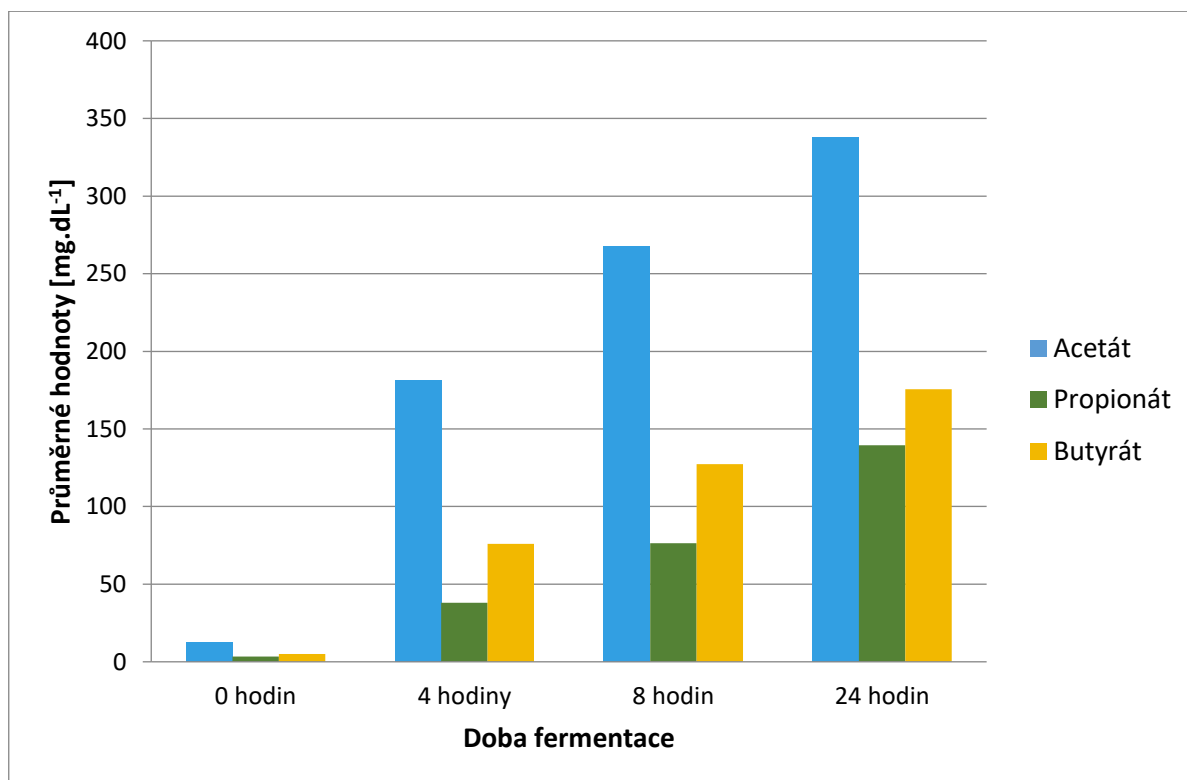
Graf číslo 1 zobrazuje průběh nárůstu průměrného množství mastných kyselin s krátkým řetězcem během 24 hodin při fermentaci hub se stolicí. Hned na začátku fermentace byly odebrány vzorky (0 hodin), které již vykazovaly přítomnost těchto kyselin. Bylo to tím, že lidské tělo nevyužije veškeré kyseliny, které fermentací v tlustém střevě vzniknou a jejich část odchází z těla se stolicí.

V každém časovém intervalu dosahoval acetát výrazně nejvyšších naměřených hodnot. Po prvních 4 hodinách fermentace vykazovaly vzorky nárůst všech kyselin. Acetát dosahoval hodnoty  $181,04 \text{ mg}\cdot\text{dL}^{-1}$ . Nejnižší hodnoty dosáhl propionát s  $38,07 \text{ mg}\cdot\text{dL}^{-1}$ .

V časovém intervalu 8 hodin je viditelné zpomalení nárůstu acetátu a butyrátu. Ovšem propionát dosáhl hodnoty  $76,35 \text{ mg}\cdot\text{dL}^{-1}$ , což je zdvojnásobení hodnoty od měření po 4 hodinách fermentace.

Po 24 hodinách fermentace je zřejmé zpomalení nárůstu u všech kyselin. Na konci fermentace dosáhl acetát zdaleka nejvyšších hodnot. Výsledné hodnoty propionátu a butyrátu se k sobě více přiblížily.

**Graf číslo 1:** Průměrný obsah mastných kyselin s krátkým řetězcem v průběhu času



Výsledky obsahu acetátu pro jednotlivé kmeny hub jsou zobrazeny v následujícím grafu číslo 2. Na začátku fermentace (0 hodin) byly obsahy acetátu vyrovnané, v průměru 12,96 mg.dL<sup>-1</sup>.

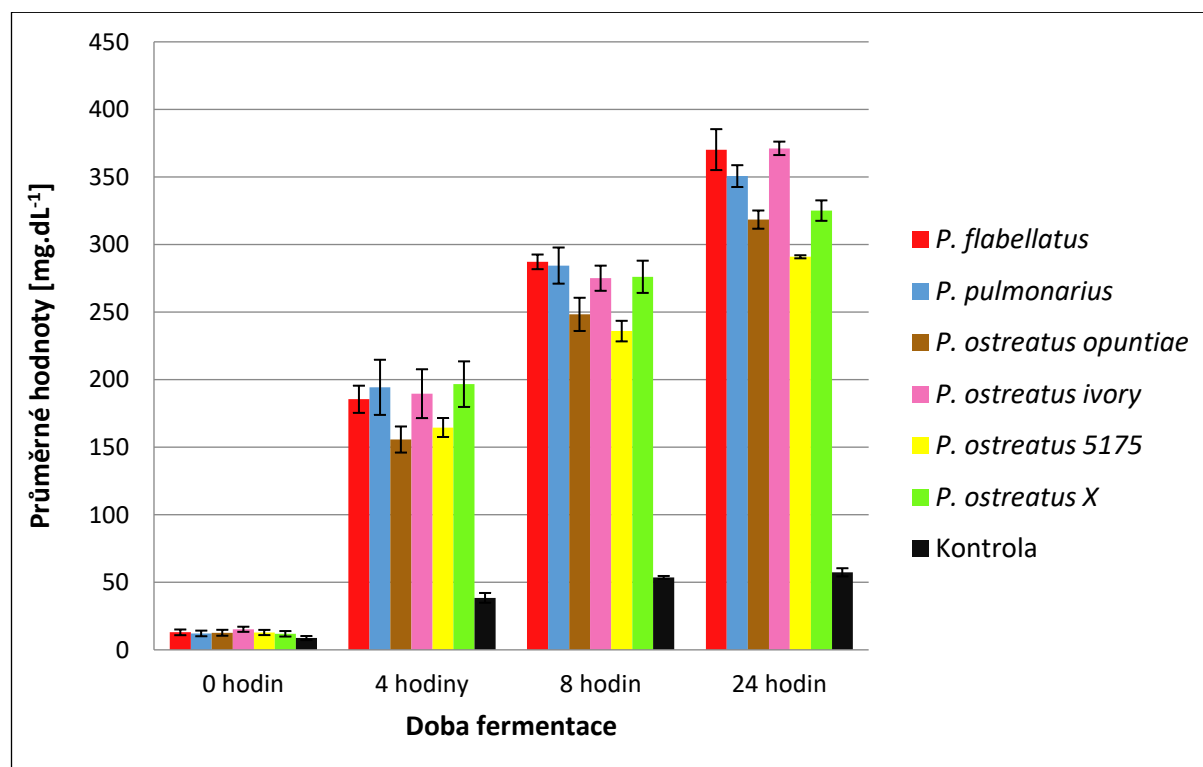
Z grafu je zřejmé, že k největšímu nárůstu obsahu acetátu ve všech vzorcích došlo po prvních 4 hodinách. Obsah acetátu dosahoval podobných hodnot, jen vzorky hub *P. ostreatus opuntiae* a *P. ostreatus 5175* měly obsah nižší.

Vzorky odebrané po 8 hodinách vykazují patrné zpomalení růstu obsahu acetátu u všech vzorků hub. Vzorky *P. ostreatus opuntiae* a *P. ostreatus 5175* stále dosahují nejnižších hodnot.

V poslední fázi fermentace (po 24 hodinách) došlo k výrazným projevům rozdílů jednotlivých vzorků hub. Mimo jiné se také projevilo výrazné zpomalení růstu obsahu acetátu. Na konci fermentace *P. ostreatus 5175* dosahoval nejnižšího obsahu acetátu s hodnotou 290,93 mg.dL<sup>-1</sup>. Naproti tomu *P. flabellatus* a *P. ostreatus ivory* dosahovali hodnot nejvyšších, průměrně 370,24 mg.dL<sup>-1</sup>, což je o 21,42 % více než hodnota nejnižší.

Také kontrolní varianta vykazovala v průběhu času nárůst. Nejvýraznější nárůst byl během prvních 4 hodin, pak se rychlost růstu výrazně snížila. Její obsah acetátu po 24 hodinách činil 57,41 mg.dL<sup>-1</sup>.

**Graf číslo 2:** Obsah acetátu ve vzorcích hub v průběhu času





Na grafu číslo 3 jsou zobrazeny výsledky obsahu propionátu pro jednotlivé druhy hub. Na začátku fermentace (0 hodin) dosahovaly obsahy propionátu vyrovnaných hodnot, v průměru 3,48 mg.dL<sup>-1</sup>.

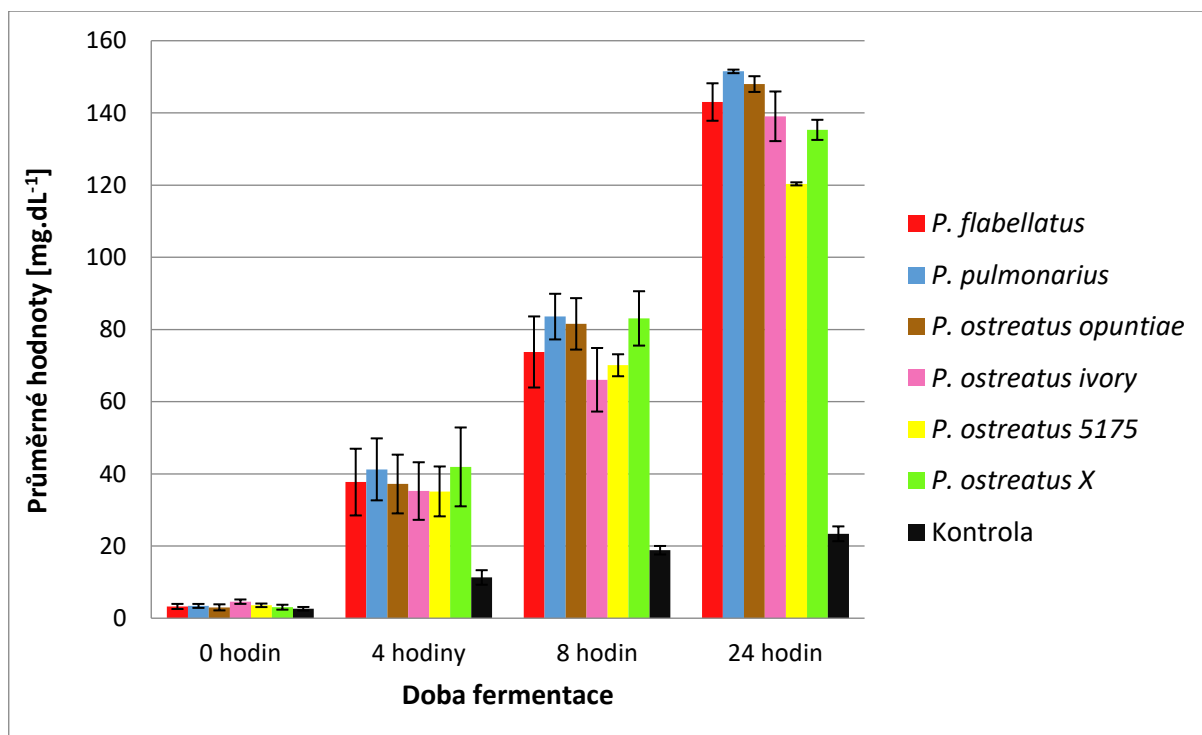
Po prvních 4 hodinách došlo k nárůstu množství propionátu ve vzorcích v průměru na 38,07 mg.dL<sup>-1</sup>. Pouze vzorky *P. pulmonarius* a *P. ostreatus X* s hodnotami 41,24 mg.dL<sup>-1</sup> a 41,92 mg.dL<sup>-1</sup> přesáhly hranici 40 mg.dL<sup>-1</sup>.

V časovém intervalu 8 hodin se zatím neprojevil zpomalení tvorby propionátu, v průměru dosahoval obsah 76,35 mg.dL<sup>-1</sup>. Hranici 80 mg.dL<sup>-1</sup> překonaly vzorky *P. pulmonarius* s hodnotou 83,56 mg.dL<sup>-1</sup>, *P. ostreatus opuntiae* s hodnotou 81,55 mg.dL<sup>-1</sup> a vzorek *P. ostreatus X* s hodnotou 83,06 mg.dL<sup>-1</sup>.

V časovém intervalu 24 hodin byla tvorba propionátu ještě stále intenzivní. Výrazně nejnižších výsledků dosáhl vzorek *P. ostreatus 5175* s obsahem propionátu 120,34 mg.dL<sup>-1</sup>. Hranici 140 mg.dL<sup>-1</sup> nepřekonal vzorek *P. ostreatus X* s obsahem propionátu 135,30 mg.dL<sup>-1</sup> a *P. ostreatus ivory* s obsahem propionátu 139,07 mg.dL<sup>-1</sup>. Druhé a třetí nejvyšší hodnoty dosáhl vzorek *P. ostreatus opuntiae* s hodnotou 147,99 mg.dL<sup>-1</sup> a vzorek *P. flabellatus* s hodnotou 143,02 mg.dL<sup>-1</sup>. *P. pulmonarius* dosáhl nejvyššího obsahu propionátu a to 151,50 mg.dL<sup>-1</sup>, což je o 20,57 % více než vzorek s nejnižším obsahem.

Také kontrolní varianta vykazovala v průběhu času nárůst. Obsah propionátu v kontrolní variantě činil v intervalu 24 hodin 23,39 mg.dL<sup>-1</sup>.

**Graf číslo 3:** Obsah propionátu ve vzorcích hub v průběhu času



Graf číslo 4 zobrazuje obsah butyrátu pro jednotlivé kmeny hub. Na začátku fermentace (0 hodin) byly obsahy butyrátu vyrovnané, v průměru 4,99 mg.dL<sup>-1</sup>.

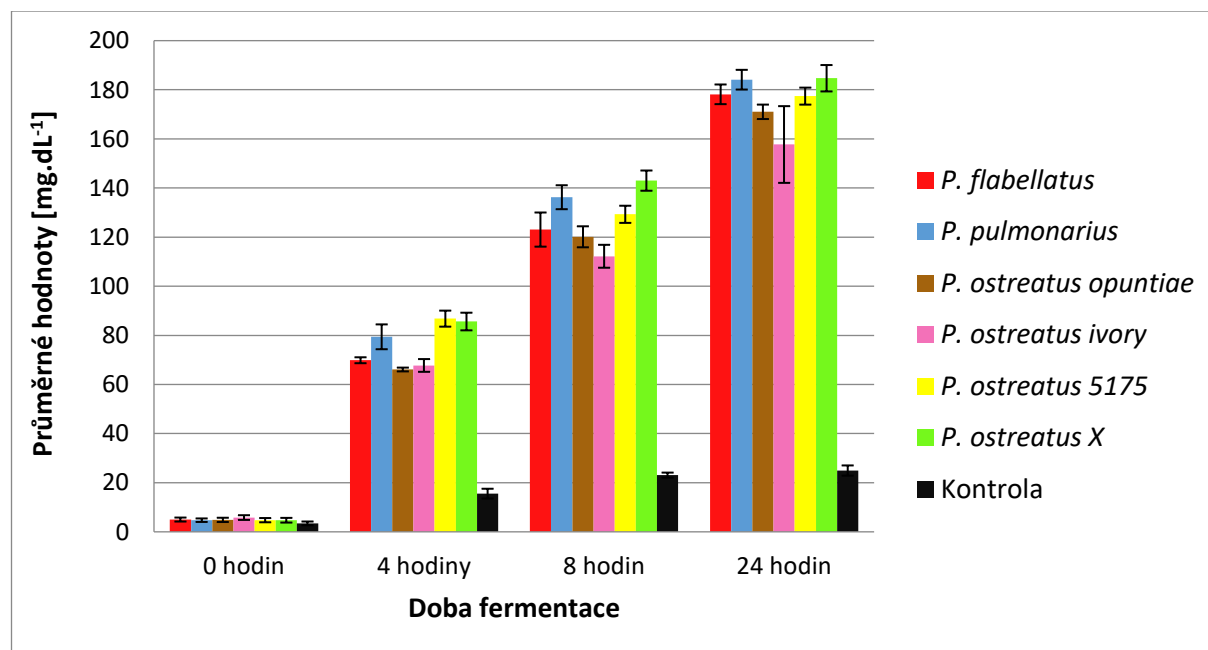
Již po prvních 4 hodinách vykazovaly jednotlivé vzorky hub rozdíly. Vzorky *P. flabellatus*, *P. ostreatus opuntiae* a *P. ostreatus ivory* obsahovaly butyrát v průměru 67,90 mg.dL<sup>-1</sup>. Naproti tomu vzorky *P. ostreatus 5175*, *P. ostreatus X* a *P. pulmonarius* měly obsah butyrátu průměrně 83,95 mg.dL<sup>-1</sup>.

Vzorky odebrané v časovém intervalu 8 hodin vykazovaly rozdíly ještě větší. Vzorek *P. ostreatus ivory* s hodnotou 112,21 mg.dL<sup>-1</sup> měl obsah butyrátu nejnižší. Obsah butyrátu ve vzorcích *P. ostreatus 5175*, *P. flabellatus* a *P. ostreatus opuntiae* dosahoval v průměru 124,17 mg.dL<sup>-1</sup>. *P. ostreatus X* s hodnotou 143,01 mg.dL<sup>-1</sup> a *P. pulmonarius* s hodnotou 136,25 mg.dL<sup>-1</sup> vykazovaly nejvyšší obsahy butyrátu.

V časovém intervalu 24 hodin dosahoval vzorek *P. ostreatus ivory* s hodnotou 157,72 mg.dL<sup>-1</sup> nejnižšího obsahu butyrátu. Vzorky *P. flabellatus*, *P. ostreatus 5175* a *P. ostreatus opuntiae* vykazovaly průměrnou hodnotu 175,53 mg.dL<sup>-1</sup>. Nejvyššího obsahu butyrátu dosáhly vzorky *P. pulmonarius* s hodnotou 184,11 mg.dL<sup>-1</sup> a *P. ostreatus X* s hodnotou 184,71 mg.dL<sup>-1</sup>.

Kontrolní varianta vykazovala v průběhu času také nárůst. Nejvýraznější nárůst byl během prvních 4 hodin, pak se rychlost růstu snížila. Mezi časovým intervalem 8 a 24 hodin byl již nárůstu obsahu velmi nepatrný. Na konci fermentace dosahovala kontrolní varianta obsahu 24,96 mg.dL<sup>-1</sup>.

**Graf číslo 4:** Obsah butyrátu ve vzorcích hub v průběhu času



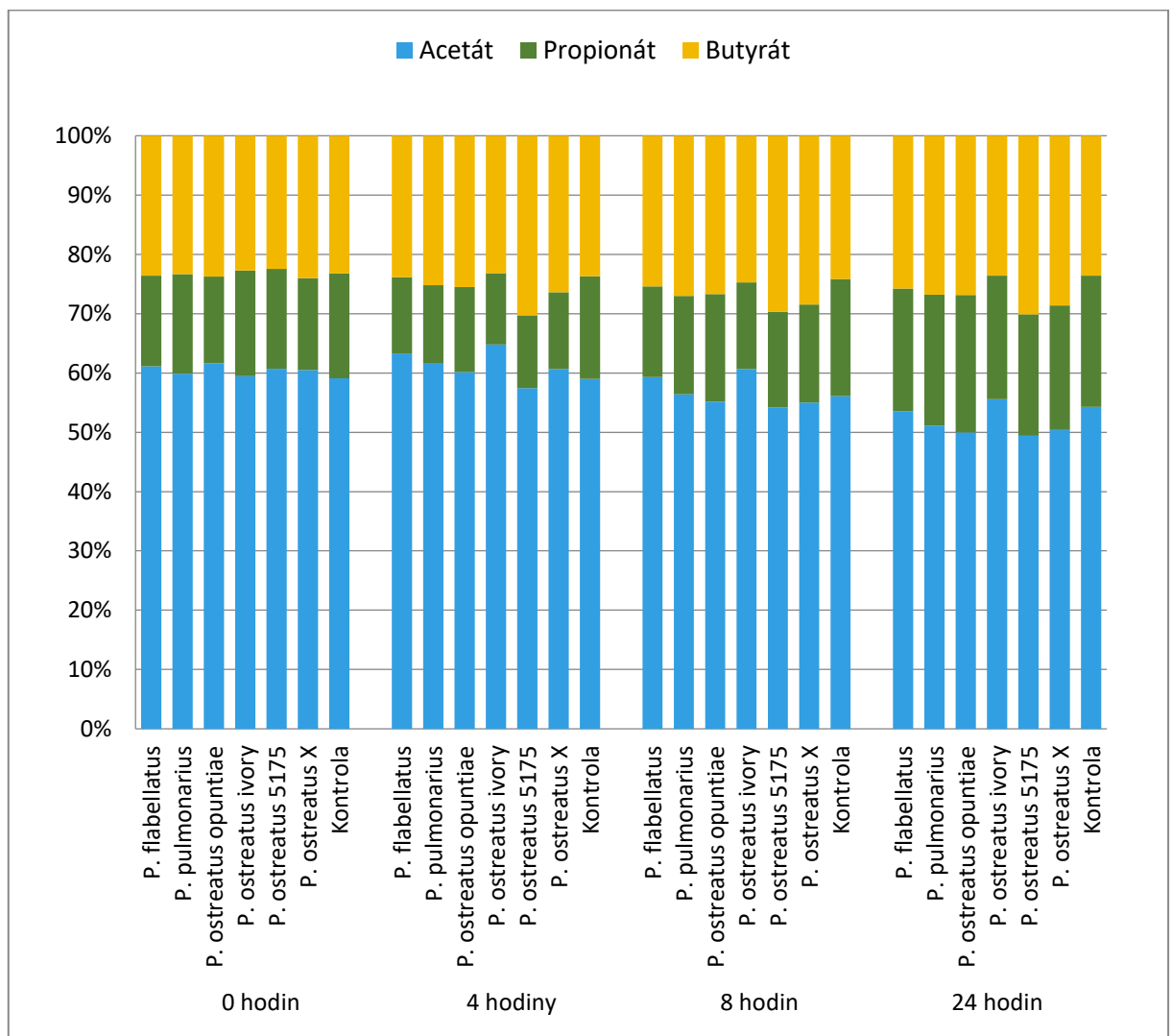
Na grafu číslo 5 jsou zobrazeny procentuální zastoupení mastných kyselin s krátkým řetězcem pro jednotlivé vzorky hub v průběhu času. Na začátku fermentace bylo procentuální zastoupení mastných kyselin s krátkým řetězcem v jednotlivých kmenech hub vyrovnané, průměrně 60,33 % acetátu, 16,37 % propionátu a 23,30 % butyrátu.

Po prvních 4 hodinách došlo u většiny vzorků ke zvýšení procentuálního zastoupení butyrátu na úkor propionátu. Pouze u vzorků *P. flabellatus* a *P. ostreatus ivory* došlo ke zvýšení procentuálního zastoupení acetátu na úkor propionátu.

Všechny vzorky odebrané po 8 hodinách fermentace vykazovaly pokles procentuálního zastoupení acetátu na úkor pro propionátu i acetátu, v průměru dosahoval acetát 56,70 %.

V časovém intervalu 24 hodin se procentuální zastoupení butyrátu ve vzorcích hub téměř nezměnilo, průměrně mělo hodnotu 26,97 %. Došlo však k dalšímu poklesu procentuálního zastoupení acetátu na úkor propionátu. Acetát dosahoval 51,66 % a propionát 21,37 %.

**Graf číslo 5:** Procentuální zastoupení jednotlivých kyselin ve vzorcích hub a v průběhu času



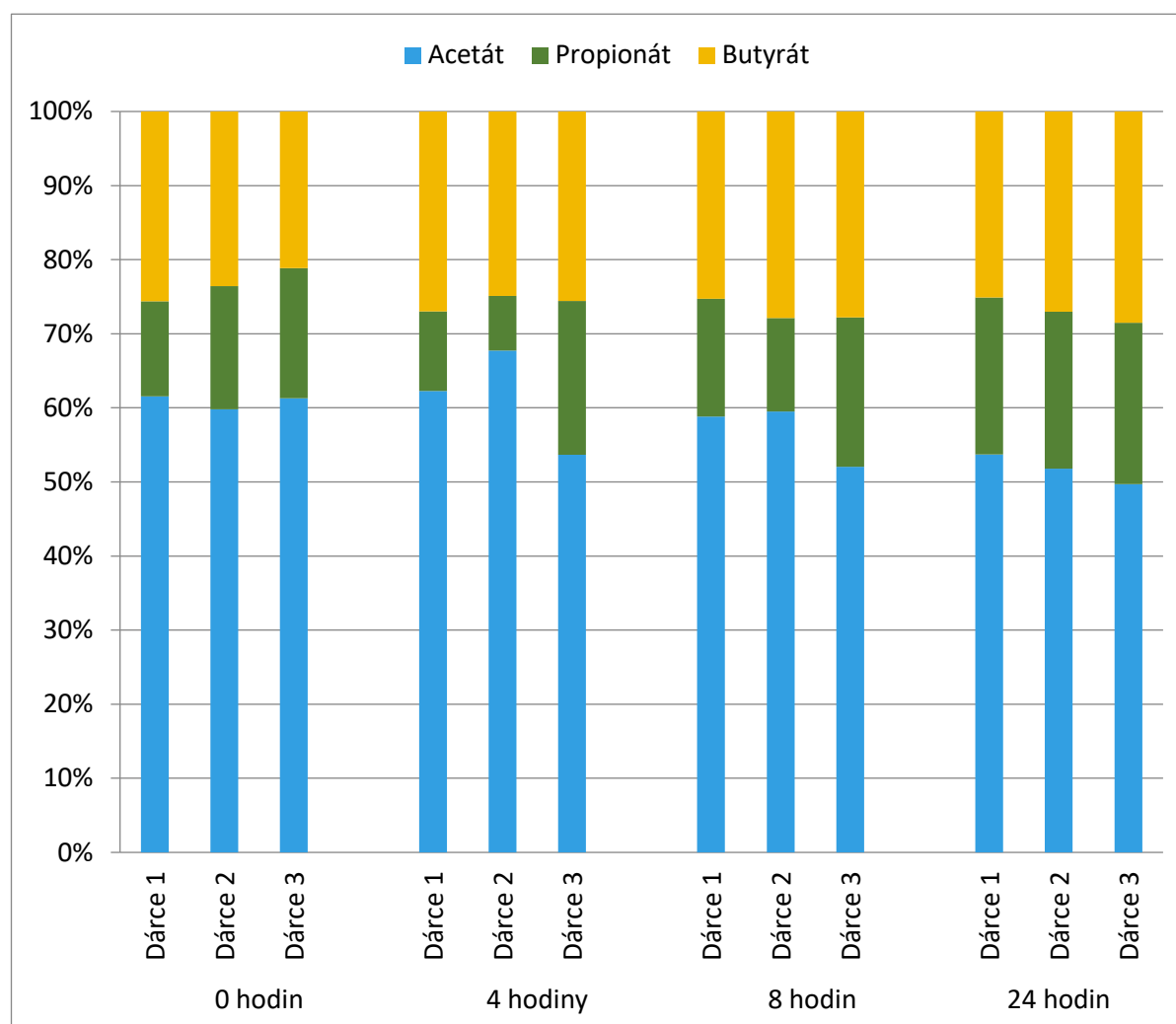
Graf číslo 6 zobrazuje procentuální zastoupení mastných kyselin s krátkým řetězcem pro jednotlivé dárce v průběhu času. Z grafu lze vyčíst značné rozdíly v jednotlivých stolicích. Již na začátku fermentace (0 hodin) je zřejmý rozdíl v procentuálním zastoupení butyrátu a propionátu.

V intervalu 4 hodiny se u Dárce 1 poměr kyselin téměř nezměnil. U Dárce 2 došlo k poklesu procentuálního zastoupení propionátu na úkor acetátu. Naopak Dárce 3 vykazuje pokles procentuálního zastoupení acetátu na úkor propionátu i butyrátu.

Po 8 hodinách fermentace vykazovali Dárce 1 a Dárce 2 zvýšení procentuálního zastoupení propionátu na úkor acetátu. U Dárce 3 došlo k malému nárůstu butyrátu na úkor acetátu.

V časovém intervalu 24 hodin vykazovaly všechny stolice zhruba stejné zastoupení propionátu, průměrně 21,38 %. Lišily se poměry butyrátu a acetátu. Acetát nabýval hodnot 49,70 až 53,72 % a butyrát 25,11 až 28,52 %.

**Graf číslo 6:** Procentuální zastoupení jednotlivých kyselin ve vzorcích jednotlivých stolicích v průběhu času



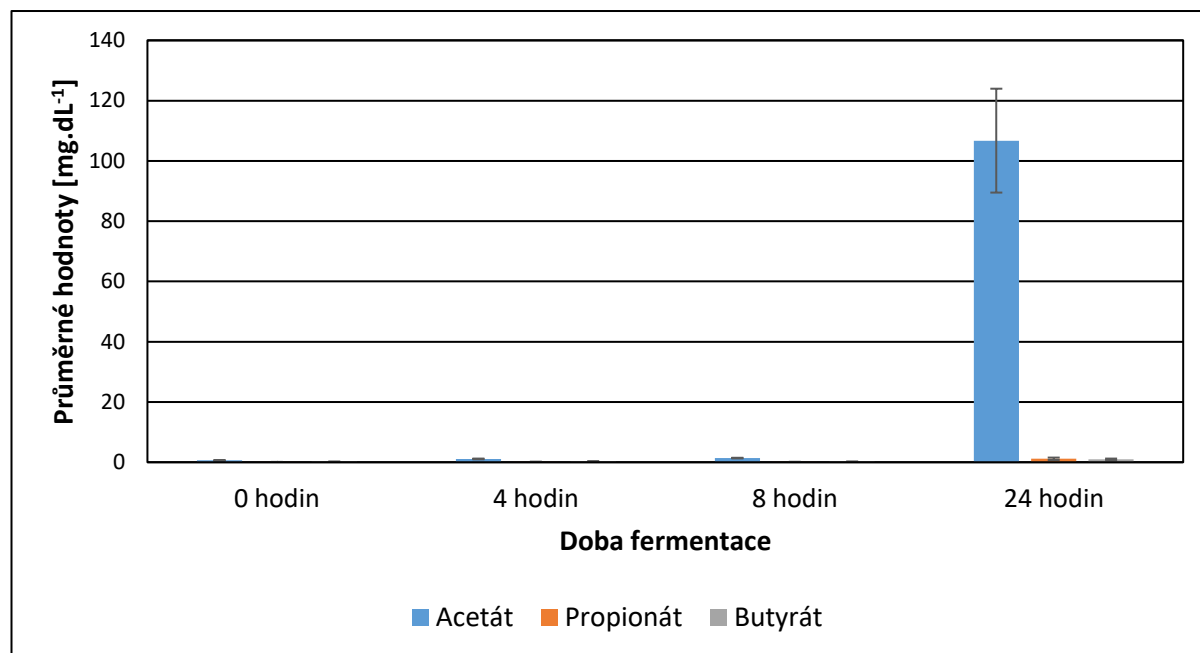
V souhrnné tabulce číslo 3 jsou zobrazeny průměrné hodnoty mastných kyselin s krátkým řetězcem všech měřených kmenů hub. Pro názornější zobrazení dat je vložen graf z těchto hodnot jako příloha číslo 1. Hodnoty ve stejném řádku tabulky, které nesdílejí stejný dolní index, se významně liší při  $p < 0,05$ . Z indexů v tabulce lze tedy vyčíst statisticky významný rozdíl u acetátu ve 24. hodině mezi *Pleurotus flabellatus* a *Pleurotus ostreatus* 5175. Obdobný rozdíl nastal také u *Pleurotus ostreatus* ivory a *Pleurotus ostreatus* 5175. Ve 24. hodině vykazoval statisticky významný rozdíl i propionát. Konkrétně se projevil mezi *Pleurotus pulmonarius* a *Pleurotus ostreatus* 5175.

**Tabulka číslo 3:** Průměrné hodnoty acetátu, propionátu a butyrátu ve vzorcích hub v průběhu času

		<i>Pleurotus flabellatus</i>	<i>Pleurotus pulmonarius</i>	<i>Pleurotus ostreatus opuntiae</i>	<i>Pleurotus ostreatus ivory</i>	<i>Pleurotus ostreatus 5175</i>	<i>Pleurotus ostreatus X</i>
0 hodin	Acetát	13,0 <sub>a</sub>	12,2 <sub>a</sub>	12,6 <sub>a</sub>	15,2 <sub>a</sub>	12,9 <sub>a</sub>	11,9 <sub>a</sub>
	Propionát	3,3 <sub>a</sub>	3,4 <sub>a</sub>	3,0 <sub>a</sub>	4,6 <sub>a</sub>	3,6 <sub>a</sub>	3,0 <sub>a</sub>
	Butyrát	5,0 <sub>a</sub>	4,7 <sub>a</sub>	4,9 <sub>a</sub>	5,8 <sub>a</sub>	4,8 <sub>a</sub>	4,7 <sub>a</sub>
4 hodiny	Acetát	185,5 <sub>a</sub>	194,3 <sub>a</sub>	155,7 <sub>a</sub>	189,6 <sub>a</sub>	164,6 <sub>a</sub>	196,7 <sub>a</sub>
	Propionát	37,7 <sub>a</sub>	41,2 <sub>a</sub>	37,2 <sub>a</sub>	35,2 <sub>a</sub>	35,1 <sub>a</sub>	41,9 <sub>a</sub>
	Butyrát	69,9 <sub>a</sub>	79,4 <sub>a</sub>	66,1 <sub>a</sub>	67,8 <sub>a</sub>	86,8 <sub>a</sub>	85,6 <sub>a</sub>
8 hodin	Acetát	287,2 <sub>a</sub>	284,4 <sub>a</sub>	248,3 <sub>a</sub>	275,1 <sub>a</sub>	235,9 <sub>a</sub>	276,1 <sub>a</sub>
	Propionát	73,8 <sub>a</sub>	83,6 <sub>a</sub>	81,6 <sub>a</sub>	66,1 <sub>a</sub>	70,1 <sub>a</sub>	83,1 <sub>a</sub>
	Butyrát	123,1 <sub>a</sub>	136,2 <sub>a</sub>	120,1 <sub>a</sub>	112,2 <sub>a</sub>	129,3 <sub>a</sub>	143,0 <sub>a</sub>
24 hodin	Acetát	370,2 <sub>a</sub>	350,6 <sub>a, b</sub>	318,4 <sub>a, b</sub>	371,2 <sub>a</sub>	290,9 <sub>b</sub>	325,1 <sub>a, b</sub>
	Propionát	143,0 <sub>a, b</sub>	151,5 <sub>a</sub>	148,0 <sub>a, b</sub>	139,1 <sub>a, b</sub>	120,3 <sub>b</sub>	135,3 <sub>a, b</sub>
	Butyrát	178,2 <sub>a</sub>	184,1 <sub>a</sub>	171,0 <sub>a</sub>	157,7 <sub>a</sub>	177,4 <sub>a</sub>	184,7 <sub>a</sub>

Výsledky kontrolní varianty bez stolice obsahovaly také mastné kyseliny s krátkým řetězcem. Obsah propionátu se pohyboval v rozmezí od 0,029 mg.dL<sup>-1</sup> do 3,363 mg.dL<sup>-1</sup> a butyrátu od 0,079 mg.dL<sup>-1</sup> do 2,168 mg.dL<sup>-1</sup>. Obsah acetátu byl však vyšší. V časových intervalech 0, 4 a 8 hodin dosahoval hodnot od 0,392 mg.dL<sup>-1</sup> do 1,723 mg.dL<sup>-1</sup>, ovšem poté v intervalu 24 hodin došlo k nárůstu v průměru na 106,72 mg.dL<sup>-1</sup>. Tato výrazná změna je zachycena v grafu číslo 7.

**Graf číslo 7:** Průměrný obsah acetátu, propionátu a butyrátu v kontrolní variantě bez stolice v průběhu času



## 6 Diskuze

Dřevokazná houba hlíva ústříčná poskytuje široké spektrum biologicky aktivních látek, které posilují fyziologický stav našeho organismu (Mowsurni & Chowdhury 2010). Waktola a Temesgen (2020) uvádí, že hlíva ústříčná vykazuje antioxidační, protinádorovou, imunomodulační, protizánětlivou, antivirovou a antimikrobiální aktivitu. To potvrzují již mnohé studie, které se tímto tématem zabývaly. Vetvicka et al. (2019) uvádí, že důležitou roli hraje beta-glukan obsažený v hlívě. Ten totiž stimuluje imunitní systém hostitele a vykazuje širokou škálu imunofarmakologických aktivit, které závisí na zdroji, struktuře, stupni větvení i molekulové hmotnosti beta-glukanu.

Některé zdroje uvádí, že je důležité beta-glukan nejprve izolovat, aby mohl v lidském organismu působit naplno. V experimentální části této diplomové práce ovšem byly použity neizolované beta-glukany přítomné v lyofilizovaných vzorcích hub. Siu et al. (2016) uvádí, že pro získání polysacharidů z hub je důležitá extrakce, záleží však na jejím druhu. Vodná alkalická extrakce je účinná pro rozbití buněčné stěny a extrahování polysacharidů z hub.

Tato diplomová práce je zaměřena na zkoumání vzniku mastných kyselin s krátkým řetězcem při fermentaci hub rodu *Pleurotus* pomocí mikroorganismů obsažených v lidské stolici. Různé studie často využívají při analýze mastných kyselin s krátkým řetězcem plynovou chromatografii. V předložené diplomové práci byl využit NMR spektrometr. Je pravděpodobné, že méně časté využívání NMR spektrometru je způsobeno vysokými náklady na přístrojové vybavení. Emwas (2019) uvádí, že dnes jsou LC-MS (kapalinová chromatografie spojená s hmotnostním spektrometrem), GC-MS (plynová chromatografie spojená s hmotnostním spektrometrem) a NMR nejčastěji používané analytické metody. Mezi výhody NMR patří objektivnost, nedestruktivnost, snadná kvantifikovatelnost, mimořádná reprodukovatelnost a vysoká automatizace. NMR je pro detekci cukrů, alkoholů, organických kyselin a dalších vysoce polárních sloučenin více vhodná než LC-MS. NMR má však i nevýhody. Oproti LC-MS a GC-MS je NMR 10 až 100 × méně citlivý.

Experiment, který byl součástí předložené diplomové práce, dokázal, že všechny použité kmeny hub rodu *Pleurotus* vykazují po fermentaci zvýšený obsah mastných kyselin s krátkým řetězcem. Také byla dokázána hypotéza, že rozdílné kmeny hub rodu *Pleurotus* nemají stejný potenciál sloužit jako prekurzor tvorby mastných kyselin s krátkým řetězcem. Z experimentu (2018), který zkoumal šest jedlých hub včetně *Pleurotus ostreatus* a *Pleurotus eryngii*, vyplývá, že se koncentrace mastných kyselin s krátkým řetězcem také významně zvýšila. Současně klesla hodnota pH, čímž se střevní prostředí stalo příznivějším. Při tomto experimentu byla použita také stolice od tří dárců a pro stanovení mastných kyselin s krátkým řetězcem byla použita plynová chromatografie (Zhao et al. 2018).

Z experimentu v této diplomové práci vyplývá, že jednoznačně největšího zastoupení mastných kyselin s krátkým řetězcem dosáhl acetát, který je velmi důležitý pro epitelní buňky tlustého střeva, neboť ho využívají jako zdroj energie. Dále je například nezbytný pro růst

*Faecalibacterium* (Nwoko et al. 2017). Jako nejlepší pro tvorbu acetátu se jeví *Pleurotus flabellatus* a *Pleurotus ostreatus ivory*. Cummings a Macfarlane (1997) ve svém experimentu uvádí acetát také jako nejhojněji zastoupenou kyselinu. Při jejich experimentu byli fermentovány škrob, pektin, otruby a oligofruktóza. *Pleurotus flabellatus mynuk* byl využit v jiném experimentu zkoumajícím vliv extraktu hub na vznik biofilmů. Extrakt tohoto kmene vykazoval antiadhezivní aktivitu proti *Enterococcus faecalis* (Vunduk et al. 2019).

Pro lidské tělo je pravděpodobně nejdůležitější butyrát. Dokáže totiž vyvolat apoptózu buněk rakoviny tlustého střeva, čímž se dá předpokládat jeho protirakovinná aktivita. Wong et al. (2006) uvádí, že hlavním zdrojem energie pro kolonocyty je právě butyrát. Podle našeho experimentu dosahuje nejvyšších hodnot butyrátu *Pleurotus pulmonarius* a *Pleurotus ostreatus X*, přičemž *Pleurotus ostreatus X* vykazoval již po osmi hodinách fermentace nejlepší výsledky. Stojí za povšimnutí, že *Pleurotus ostreatus ivory* vykazoval hodnoty butyrátu nejnižší ze všech vzorků, přičemž hodnoty acetátu měl nejvyšší.

Nejvyšší obsah vzniklého propionátu měl *Pleurotus pulmonarius* s hodnotou 151,5 mg.dL<sup>-1</sup>. Propionát je pro lidské tělo také velice potřebný. Nejenže je, stejně jako acetát a butyrát, zdrojem energie pro epitelové buňky, propionát se podílí také na glukogenezi v játrech. Miyamoto et al. (2018) zkoumal vznik mastných kyselin s krátkým řetězcem u myší po dietě obsahující ječmen. Propionát v tomto experimentu dosahoval hodnoty 7,6 μmol.g<sup>-1</sup>.

Je zajímavé, že bakterie dokážou tvořit buď pouze butyrát nebo pouze propionát. Reichardt et al. (2014) uvádí, že existuje jen malé množství bakterií, které mají genetické předpoklady pro produkci obou kyselin. Nwoko et al. (2017) ovšem uvádí, že některé bakterie jsou schopné v závislosti na substrátu, přejít na tvorbu jiné mastné kyseliny s krátkým řetězcem. Naproti tomu je acetát produkován širším spektrem nesespecifických bakterií.

Na grafu číslo 5 v této diplomové práci je možné si všimnout, že procentuální zastoupení mezi acetátem, propionátem a butyrátem se v průběhu času u jednotlivých vzorků hub mění. V průběhu fermentace došlo k poklesu acetátu zhruba o 10 % na úkor propionátu, jehož procentuální zastoupení vzrostlo zhruba o 5 % a také na úkor butyrátu, jehož procentuální zastoupení vzrostlo zhruba o 3,67 %. Zajímavé je, že kontrolní varianta bez hub, tedy pouze se stolicí, se chovala v průběhu fermentace úplně stejně. Belobrajdic (2015) uvádí, že se při fermentaci ječmene, který obsahuje také beta-glukany, zvýšil poměr butyrátu na úkor acetátu a propionátu.

Graf číslo 6, který zobrazuje procentuální zastoupení jednotlivých kyselin ve vzorcích jednotlivých stolic v průběhu času, stojí také za povšimnutí. Lze z něj vyčíst, že stolice dárce číslo 3 vykazovala již po prvních čtyřech hodinách fermentace takové procentuální zastoupení, kterých dosahovaly ostatní vzorky až na konci fermentace po 24 hodinách. Lze předpokládat, že je to způsobeno stravou nebo střevním mikrobiomem daného dárce. Z výsledků studie (1996), kde byli hodnoceni pouze dva dárce, vyplývá že poměr acetátu, propionátu a butyrátu po fermentaci zelí lidskou stolicí je průměrně 60,5:23,5:16 (Miller & Wolin 1996). V našem experimentu vyšel poměr acetátu, propionátu a butyrátu průměrně na dárce 52:21:27.



Do experimentu byl také zahrnut kontrolní vzorek bez stolice, tedy jen se vzorkem hub. Propionát a acetát dosahoval nízkých hodnot po celou dobu fermentace, došlo k sotva patrnému nárůstu. Ovšem acetát vykazoval nízké hodnoty pouze prvních 8 hodin fermentace. Během dalších 16 hodin došlo k jeho velikému nárůstu. Obsah acetátu stoupl o více než 100 mg.dL<sup>-1</sup>. Lze se domnívat, že došlo k nárůstu mikroorganismů a jejich enzymatické aktivitě přirozeně se vyskytujících na vzorcích použitých hub. Také je možné, že došlo k chemické reakci mezi vzorky hub a chemikáliemi k nim přidaným nebo k hydrolytické aktivitě enzymů, konkrétně beta–glukosidázy. Song et al. (2020) uvádí, že hlíva ústříčná využívá enzymy štěpící polysacharidy při degradaci substrátu, na kterém roste. Tyto enzymy hlívě pomáhají při získávání živin pro podporu růstu mycelia a produkce plodů.

Z experimentu je možné vyvodit, že z použitých vzorků hub je nejlepší houbou pro tvorbu mastných kyselin s krátkým řetězcem *Pleurotus pulmonarius*, jenž dosáhl nejvyšší hodnoty propionátu a butyrátu, přičemž obsah acetátu byl také poměrně vysoký. Ovšem celkový součet vzniklých mastných kyselin s krátkým řetězcem nejvyšší nebyl. Nejvyššího součtu vzniklých mastných kyselin s krátkým řetězcem dosáhl *Pleurotus flabellatus*, který vykazoval nejvyšší obsah acetátu. Avšak *Pleurotus pulmonarius* se od *Pleurotus flabellatus* lišil pouze o 5,2 mg.dL<sup>-1</sup>.

Dle mého názoru se jako nejméně vhodnou houbou jeví *Pleurotus ostreatus* 5175, který měl sice poměrně vysoké hodnoty butyrátu, avšak v obsahu acetátu a propionátu vykazoval jednoznačně nejnižší výsledky. Jeho celkový součet mastných kyselin s krátkým řetězcem dosahoval 588,7 mg.dL<sup>-1</sup>, což je oproti *Pleurotus flabellatus* nižší hodnota o 102,7 mg.dL<sup>-1</sup>.

## 7 Závěr

Z hodnocení výsledků experimentu vyplývá, že všechny kmeny hub vykazovaly po fermentaci nárůst mastných kyselin s krátkým řetězcem. Acetátu vzniklo po 24 hodinách fermentace v průměru 337,8 mg.dL<sup>-1</sup>. *Pleurotus flabellatus* a *Pleurotus ostreatus ivory* dosáhli hodnot nejvyšších, mezi sebou se lišili minimálně a průměrně hodnota činila 370,2 mg.dL<sup>-1</sup>. *Pleurotus ostreatus 5175* dosáhl pouze 290,9 mg.dL<sup>-1</sup>. Statisticky významný rozdíl v obsahu acetátu nastal právě mezi kmeny *Pleurotus flabellatus* a *Pleurotus ostreatus 5175*, a *Pleurotus ostreatus ivory* a *Pleurotus ostreatus 5175*.

*Pleurotus pulmonarius* dosáhl nejvyšší hodnoty v obsahu propionátu. Po 24 hodinách fermentace obsahoval 150,5 mg.dL<sup>-1</sup> propionátu. *Pleurotus ostreatus 5175* dosáhl znovu výrazně nejnižších výsledků s hodnotou 120,3 mg.dL<sup>-1</sup>. Také tyto 2 vzorky hub se statisticky významně lišily.

Nejvyšších hodnot butyrátu dosáhli *Pleurotus pulmonarius* a *Pleurotus ostreatus X*, jejichž hodnoty se lišily o 0,6 mg.dL<sup>-1</sup>, průměrně jejich hodnota činila 184,4 mg.dL<sup>-1</sup>. Nejnižší obsah vykazoval *Pleurotus ostreatus ivory* s hodnotou 157,7 mg.dL<sup>-1</sup>. V obsahu butyrátu ovšem k významné odlišnosti nedošlo.

Z dosažených výsledků vyplývá, že z použitých kmenů hub se jako nejvhodnější pro produkci mastných kyselin s krátkým řetězcem jeví *Pleurotus flabellatus* a *Pleurotus pulmonarius*.

Hypotéza byla potvrzena, jednotlivé kmeny hub rodu *Pleurotus* se mezi sebou významně liší v potenciálu sloužit jako prekurzor tvorby mastných kyselin s krátkým řetězcem.

Tento experiment byl jeden z prvních pokusů porovnávajících jednotlivé kmeny rodu *Pleurotus*, proto by bylo vhodné pokračovat dál například v *in vivo* studiích.

## 8 Literatura

- ARUMUGAM, Manimozhiyan, et al. Erratum: Enterotypes of the human gut microbiome (Nature (2011) 473 (174-180)). *Nature*, 2011, 474.7353.
- AVIN, Farhat A., et al. Genetics and hybrid breeding of *Pleurotus pulmonarius*: heterosis, heritability and combining ability. *Euphytica*, 2016, 209.1: 85-102.
- BARBOSA, Jhonatas Rodrigues, et al. Polysaccharides of mushroom *Pleurotus* spp.: New extraction techniques, biological activities and development of new technologies. *Carbohydrate Polymers*, 2020, 229: 115550.
- BELOBRAJDIC, Damien P., et al. Wholegrain barley  $\beta$ -glucan fermentation does not improve glucose tolerance in rats fed a high-fat diet. *Nutrition Research*, 2015, 35.2: 162-168.
- BIASUCCI, Giacomo, et al. Mode of delivery affects the bacterial community in the newborn gut. *Early human development*, 2010, 86.1: 13-15.
- BRAHE, Lena Kirchner; ASTRUP, Arne; LARSEN, Lesli Hingstrup. Is butyrate the link between diet, intestinal microbiota and obesity-related metabolic diseases?. *Obesity reviews*, 2013, 14.12: 950-959.
- CAI, Jingwei, et al. Orthogonal comparison of GC-MS and <sup>1</sup>H NMR spectroscopy for short chain fatty acid quantitation. *Analytical chemistry*, 2017, 89.15: 7900-7906.
- CASTANYS-MUÑOZ, Esther; MARTIN, Maria J.; VAZQUEZ, Enrique. Building a beneficial microbiome from birth. *Advances in Nutrition*, 2016, 7.2: 323-330.
- CORRÊA, Rúbia Carvalho Gomes, et al. Biotechnological, nutritional and therapeutic uses of *Pleurotus* spp. (Oyster mushroom) related with its chemical composition: A review on the past decade findings. *Trends in Food Science & Technology*, 2016, 50: 103-117.
- CUMMINGS, John H.; MACFARLANE, George T. Role of intestinal bacteria in nutrient metabolism. *Clinical nutrition*, 1997, 16.1: 3-11.
- DAI, Zhao-Lai; WU, Guoyao; ZHU, Wei-Yun. Amino acid metabolism in intestinal bacteria: links between gut ecology and host health. *Front Biosci*, 2011, 16.1: 1768-86.
- DASGUPTA, Adhiraj; SHERPA, Ang Rinzing; ACHARYA, Krishnendu. Phytochemical screening and antioxidant capacity of polyphenolrich fraction of *Pleurotus flabellatus*. *J Chem Pharm Res*, 2014, 6.5: 1059-1065.
- DEN BESTEN, Gijs, et al. The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota, and host energy metabolism. *Journal of lipid research*, 2013, 54.9: 2325-2340.
- DISTRUTTI, Eleonora, et al. Gut microbiota role in irritable bowel syndrome: New therapeutic strategies. *World journal of gastroenterology*, 2016, 22.7: 2219.
- DOMINGUEZ-BELLO, Maria G., et al. Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2010, 107.26: 11971-11975.

- DORÉ, J.; CORTIER, G. The human intestinal microbiota. *Gastroentérologie clinique et biologique*, 2010, 34: S7-S15.
- DUNCAN, Sylvia H., et al. Contribution of acetate to butyrate formation by human faecal bacteria. *British Journal of Nutrition*, 2004, 91.6: 915-923.
- EMWAS, Abdul-Hamid, et al. NMR spectroscopy for metabolomics research. *Metabolites*, 2019, 9.7: 123.
- ENGELS, Christina, et al. The common gut microbe *Eubacterium hallii* also contributes to intestinal propionate formation. *Frontiers in microbiology*, 2016, 7: 713.
- FEEHILY, Conor; KARATZAS, K. A. G. Role of glutamate metabolism in bacterial responses towards acid and other stresses. *Journal of applied microbiology*, 2013, 114.1: 11-24.
- FOREJTOVÁ, Petra. Léčivé účinky glukanů. *Časopis pro zdraví a alternativní léčení, Regena*, 2005, 3: 18-19.
- FOŘT, P. Zdraví a potravní doplňky: encyklopedie potravních doplňků pro racionální výživu a péči o zdraví. 2005.
- FOUHY, Fiona, et al. High-throughput sequencing reveals the incomplete, short-term recovery of infant gut microbiota following parenteral antibiotic treatment with ampicillin and gentamicin. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 2012, 56.11: 5811-5820.
- GILL, Steven R., et al. Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. *science*, 2006, 312.5778: 1355-1359.
- GROFOVÁ, Zuzana. Mastné kyseliny. *Medicína pro praxi*, 2010, 7.10: 388-390.
- HAMER, Henrike M., et al. The role of butyrate on colonic function. *Alimentary pharmacology & therapeutics*, 2008, 27.2: 104-119.
- HESSE, Manfred; MEIER, Herbert; ZEEH, Bernd. *Spectroscopic methods in organic chemistry*. Thieme Medical Pub, 2008.
- HOLUBOVÁ, Jana. 2009. Analýza vybraných látek z houby *Pleurotus ostreatus* chromatografickými metodami [Master's thesis] Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Zlín.
- HOZA, Ignác; KRAMÁŘOVÁ, Daniela. *Potravinářská biochemie I*. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2005.
- ISHIBASHI, Ken-ichi, et al. Relationship between solubility of grifolan, a fungal 1, 3-β-D-glucan, and production of tumor necrosis factor by macrophages in vitro. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 2001, 65.9: 1993-2000.
- JABLONSKÝ, Ivan, Václav ŠAŠEK a Václav ŠAŠEK. *Jedlé a léčivé houby: pěstování a využití*. Praha: Brázda, 2006. ISBN 80-209-0341-0.
- JABLONSKÝ, Ivan; ŠAŠEK, Václav. *Pěstování hub ve velkém i v malém*. Brázda, 1997.
- JACOBSEN, Neil E. *NMR spectroscopy explained: simplified theory, applications and examples for organic chemistry and structural biology*. John Wiley & Sons, 2007.
- JURÁSKOVÁ, Martina. 2019. Střevní mikrobiota a imunitní systém. Masarykova univerzita, Brno.

- KIDD, Parris M. The use of mushroom glucans and proteoglycans in cancer treatment. *Alternative medicine review*, 2000, 5.1: 4-27.
- KEIZER, Gerrit J. *Houby: encyklopedie*. 2. vyd. Čestlice: Rebo, 2005. Encyklopedie. ISBN 80-7234-479-X.
- KLÁN Jaroslav, *Co víme o houbách*. Státní pedagogické nakladatelství Praha, 1989, 311 s., ISBN 80-04-21143-7
- LEPŠOVÁ, Anna. *Houby jako elixír? ivota: hlíva ústříčná (nové poznatky), hou? evnatec jedlý, penízovka sametonohá, kukmák sklepní a další*. Víkend, 2005.
- LEPŠOVÁ, Anna. *Zázračná houba? Hlíva ústříčná*. Vydavatelství Víkend, 2001.
- LEVITON, Abraham; HARGROVE, Robert E. Microbiological synthesis of vitamin B12 by propionic acid bacteria. *Industrial & Engineering Chemistry*, 1952, 44.11: 2651-2655.
- LIU, Hu, et al. Butyrate: a double-edged sword for health?. *Advances in Nutrition*, 2018, 9.1: 21-29.
- LOPEZ-SILES, Mireia, et al. Cultured representatives of two major phylogroups of human colonic Faecalibacterium prausnitzii can utilize pectin, uronic acids, and host-derived substrates for growth. *Applied and environmental microbiology*, 2012, 78.2: 420-428.
- LOUIS, Petra; FLINT, Harry J. Formation of propionate and butyrate by the human colonic microbiota. *Environmental microbiology*, 2017, 19.1: 29-41.
- LOUIS, Petra; FLINT, Harry J. Diversity, metabolism and microbial ecology of butyrate-producing bacteria from the human large intestine. *FEMS microbiology letters*, 2009, 294.1: 1-8.
- LYNCH, Tavis. *Pěstování hub: metody, postupy, zpracování*. Přeložil Anna ŠTORKÁNOVÁ. Praha: Euromedia, 2019. Esence. ISBN 978-80-7549-934-9.
- MAFTOUN, Parisa, et al. The edible mushroom Pleurotus spp.: I. Biodiversity and nutritional values. *International Journal of Biotechnology for Wellness Industries*, 2015, 4.2: 67-83.
- MANOLEA, Gheorghe, et al. The numerical simulation of the culture medium for the Pleurotus genus mushrooms. In: *8 International Conference on Applied and Theoretical Electricity, Annals of the University of Craiova*. 2006. p. 318-325.
- MILLER, Terry L.; WOLIN, Meyer J. Pathways of acetate, propionate, and butyrate formation by the human fecal microbial flora. *Applied and environmental microbiology*, 1996, 62.5: 1589-1592.
- MIYAMOTO, Junki, et al. Barley  $\beta$ -glucan improves metabolic condition via short-chain fatty acids produced by gut microbial fermentation in high fat diet fed mice. *PLoS One*, 2018, 13.4: e0196579.
- MOWSURNI, F. R.; CHOWDHURY, M. B. K. Oyster mushroom: Biochemical and medicinal prospects. *Bangladesh Journal of Medical Biochemistry*, 2010, 3.1: 23-28.
- MURUGESAN, Selvasankar, et al. Gut microbiome production of short-chain fatty acids and obesity in children. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 2018, 37.4: 621-625.

Naše druhé já, náš druhý mozek, říká o střevech gastroenterolog. In: Český rozhlas Plus [online]. 2. května 2018 [cit. 2020-03-04]. Dostupné z: <https://plus.rozhlas.cz/nase-druhe-ja-nas-druhy-mozek-rika-o-streveh-gastroenterolog-7196579>

NOVAK, M.; VETVICKA, V.  $\beta$ -glucans, history, and the present: immunomodulatory aspects and mechanisms of action. *Journal of immunotoxicology*, 2008, 5.1: 47-57.

NWOKO, M. C., et al. Nutritional and Bioactive Compounds: Evaluation of *Pleurotus pulmonarius* (Fries) Quel. *Fruit Bodies Grown on Different Wood Logs in Abia State, Nigeria. J Bioremediat Biodegrad*, 2017, 8.393: 2.

OHNO, Naohito, et al. Resistance of highly branched (1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -d-glucans to formolysis. *Chemical and pharmaceutical bulletin*, 1995, 43.6: 1057-1060.

OPLETAL, Lubomír. Fytoterapeutické aspekty onemocnění oběhového systému, 2. Hlíva ústříčná a možnosti jejího využití. 1993.

PATTERSON, Elaine, et al. Gut microbiota, obesity and diabetes. *Postgraduate Medical Journal*, 2016, 92.1087: 286-300.

PHAN, Hung. 2018. Analýza beta-glukanů ve vybraných druzích hub [Master's thesis] Vysoké učení technické v Brně, Brno.

REICHARDT, Nicole, et al. Phylogenetic distribution of three pathways for propionate production within the human gut microbiota. *The ISME journal*, 2014, 8.6: 1323-1335.

REIS, Filipa S., et al. Chemical composition and nutritional value of the most widely appreciated cultivated mushrooms: an inter-species comparative study. *Food and Chemical Toxicology*, 2012, 50.2: 191-197.

ROWLAND, Ian, et al. Gut microbiota functions: metabolism of nutrients and other food components. *European journal of nutrition*, 2018, 57.1: 1-24.

SALMINEN, S., et al. Functional food science and gastrointestinal physiology and function. *British journal of nutrition*, 1998, 80.S1: S147-S171.

SIU, Ka-Chai, et al. Molecular properties and antioxidant activities of polysaccharides isolated from alkaline extract of wild *Armillaria ostoyae* mushrooms. *Carbohydrate polymers*, 2016, 137: 739-746.

SHERIDAN, Paul O., et al. Polysaccharide utilization loci and nutritional specialization in a dominant group of butyrate-producing human colonic Firmicutes. *Microbial Genomics*, 2016, 2.2.

SMIDERLE, F. R., et al. Exopolysaccharides, proteins and lipids in *Pleurotus pulmonarius* submerged culture using different carbon sources. *Carbohydrate Polymers*, 2012, 87.1: 368-376.

SOCHA, Radomír; JEGOROV, Alexandr. *Encyklopedie léčivých hub*. Academia, 2014.

SONG, Ha-Yeon, et al. The PoV mycovirus affects extracellular enzyme expression and fruiting body yield in the oyster mushroom, *Pleurotus ostreatus*. *Scientific reports*, 2020, 10.

- SPYROS, Apostolos; DAIS, Photis. *NMR spectroscopy in food analysis*. Royal Society of Chemistry, 2012.
- SRIVASTAVA, H. C.; BANO, Zakia. Nutrition requirements of *Pleurotus flabellatus*. *Applied microbiology*, 1970, 19.1: 166-169.
- STAMETS, Paul. *Growing gourmet and medicinal mushrooms*. Ten speed press, 2011.
- SVRČEK, M. *Houby*. Nakladatelství Aventinum, Praha 1996, s. 279, ISBN 80-7151-202-8
- TLASKALOVA-HOGENOVA, Helena, et al. Microbiome and colorectal carcinoma: insights from germ-free and conventional animal models. *The Cancer Journal*, 2014, 20.3: 217-224.
- VALÍČEK, Pavel. *Houby a jejich léčivé účinky*. Start, 2011.
- VELÍŠEK, Jan. *Chemie potravin*. Tábor: OSSIS, 1999. ISBN 80-902391-3-7.
- VĚTVÍČKA, V. Beta Glucan: tajemství přírody. Brno: Gynpharma, 2011, 126 s. ISBN 978-80-254-9143-0
- VETVICKA, Vaclav, et al. Immune-modulating activities of glucans extracted from *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus eryngii*. *Journal of Functional Foods*, 2019, 54: 81-91.
- VOLK R. a VOLK F, *Houby v přírodě a na talíři*, Euromedia Group, k.s., Praha 2004, ISBN 80-242-1136-X, s 191
- VOREADES, Noah; KOZIL, Anne; WEIR, Tiffany L. Diet and the development of the human intestinal microbiome. *Frontiers in microbiology*, 2014, 5: 494.
- VUNDUK, Jovana, et al. Polysaccharides of *Pleurotus flabellatus* strain Mynuk produced by submerged fermentation as a promising novel tool against adhesion and biofilm formation of foodborne pathogens. *LWT*, 2019, 112: 108221.
- WAKTOLA, Girma; TEMESGEN, Tasisa. Pharmacological activities of Oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*). *Novel Research in Microbiology Journal*, 2020, 4.2: 688-695.
- WASKITO, A. F. Formula Optimization of Meat Analog Derived from *Pleurotus Flabellatus* Mycelium by Response Surface Methodology. Department of Food Science and Technology. Faculty of Agricultural Engineering and Technology Bagor Agricultural University, Indonesia, 2016 [cit. 2020-03-11]. Dostupné z: <https://repository.ipb.ac.id/handle/123456789/86732>
- WONG, Julia MW, et al. Colonic health: fermentation and short chain fatty acids. *Journal of clinical gastroenterology*, 2006, 40.3: 235-243.
- WU, Nan, et al. Optimization of agro-residues as substrates for *Pleurotus pulmonarius* production. *AMB Express*, 2019, 9.1: 184.
- YADOMAE, Toshiro. Structure and biological activities of fungal beta-1, 3-glucans. *Yakugaku zasshi: Journal of the Pharmaceutical Society of Japan*, 2000, 120.5: 413.
- YOSHIDA, Yasuo, et al. Acyl-CoA reductase PGN\_0723 utilizes succinyl-CoA to generate succinate semialdehyde in a butyrate-producing pathway of *Porphyromonas gingivalis*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2016, 596: 138-148.
- ZEKOVIĆ, Djordje B., et al. Natural and modified (1→3)-β-D-glucans in health promotion and disease alleviation. *Critical reviews in biotechnology*, 2005, 25.4: 205-230.

ZERVAKIS, Georgios I., et al. Pleurotus opuntiae revisited—An insight to the phylogeny of dimitic Pleurotus species with emphasis on the P. ádjamor complex. *Fungal biology*, 2019, 123.3: 188-199.

ZHAO, Ruiqiu, et al. In vitro fermentation of six kinds of edible mushrooms and its effects on fecal microbiota composition. *Lwt*, 2018, 96: 627-635.

ZHUANG, Xiaojun, et al. Alterations of gut microbiota in patients with irritable bowel syndrome: A systematic review and meta-analysis. *Journal of gastroenterology and hepatology*, 2017, 32.1: 28-38.



## 9 Samostatné přílohy

**Příloha číslo 1:** Obsah acetátu, propionátu a butyrátu ve vzorcích hub v průběhu času

