



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV CHEMIE FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUT OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

**ANALÝZA A CHARAKTERIZACE BETA-GLUKANŮ
Z VYBRANÝCH PŘÍRODNÍCH ZDROJŮ**

ANALYSIS AND CHARACTERIZATION OF BETA-GLUCANS FROM SOME NATURAL
SOURCES

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Radek Vít

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc

BRNO 2018

Abstrakt

Cílem bakalářské práce je otestovat a charakterizovat komerčně dostupné produkty s deklarovaným obsahem β -glukanů.

V teoretické části jsou popsány β -glukany, jejich možné zdroje, vlastnosti a využití. Dále se v teoretické části nachází část zaměřená na stanovení obsahu β -glukanů. Jako zdroje β -glukanů jsou v teoretické části dále popsány kvasinka *Saccharomyces cerevisiae* a houba hlíva ústříčná. Popsány jsou také jednotlivé stanovované skupiny aktivních látek a principy metod použitých pro jejich charakterizaci.

V experimentální části této práce byly charakterizovány extrakty z pěti komerčně dostupných zdrojů β -glukanů. Stanovena byla antioxidační aktivita, celkové polyfenoly, proteiny a sacharidy, u vybraných produktů též obsah vitamínu C za využití HPLC a dále obsah lipidů za využití GC-FID. Ke stanovení obsahu β -glukanů byla využita enzymatická metoda.

U dvou vzorků s nejvyšší antioxidační aktivitou byly poté provedeny antimikrobiální a MTT testy.

Abstract

The aim of the bachelor thesis is to test and characterize commercially available products with declared β -glucans content.

The theoretical part describes β -glucans, their possible sources, properties and utilization. Further, the theoretical part is focused on methods for determination of β -glucan content. *Saccharomyces cerevisiae* yeast and oyster mushroom fungus are available as commercial sources of β -glucans. Next individual groups of the active substances and principles of the methods used for their characterization are described too.

In experimental part of this work the extracts from five commercially available sources of β -glucans were prepared and characterized. Antioxidant activity, total polyphenols, proteins and carbohydrates were determined. For selected products, the content of vitamin C using HPLC and the lipid content using GC-FID were determine as well. An enzymatic method was used to determine the β -glucan content.

Two samples of the highest antioxidant activity were then subjected to antimicrobial and MTT tests.

Klíčová slova

Beta-glukany, *Saccharomyces cerevisiae*, Hlíva ústříčná, MTT test, Antimikrobiální aktivita

Keywords

Beta-glucan, *Saccharomyces cerevisiae*, Oyster mushroom, MTT tests, Antimicrobial activity

VÍT, R. *Analýza a charakterizace beta-glukanů z vybraných přírodních zdrojů*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2018. 56 s. Vedoucí bakalářské práce prof. RNDr. Ivana Márová, CSc..

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracoval samostatně a všechny použité literární zdroje jsem odcitoval správně a úplně.

.....

podpis studenta

Poděkování

Rád bych poděkoval prof. RNDr. Ivaně Márové, CSc. a Ing. Marii Vysoké a Ing. Daně Byrtusové za ochotu, trpělivost, odborné a cenné rady, jež mi usnadnily vypracování bakalářské práce. Za trpělivost a zázemí bych také rád poděkoval své rodině.

OBSAH

1	Úvod.....	7
2	Teoretická část	8
2.1	Beta-glukany.....	8
2.1.1	Chemické vlastnosti	8
2.1.2	Přírodní zdroje beta-glukanů.....	9
2.1.3	Využití.....	10
2.2	Zdroje β -glukanu ve studovaných přípravcích	10
2.2.1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	10
2.2.2	Hlíva ústříčná	11
2.3	Principy použitých přístrojů a metod.....	12
2.3.1	Antioxidační aktivita.....	12
2.3.2	Spektrofotometrie.....	12
2.3.3	Enzymatic Yeast β -Glucan Assay Kit – Stanovení β -Glukanů.....	12
2.3.4	Plynová chromatografie s plamenově ionizačním detektorem – GC – FID .	13
2.3.5	Kapalinová chromatografie – HPLC s UV-VIS detekcí	14
2.4	Kultivace mikroorganismů	15
2.4.1	Použité mikroorganismy	16
2.4.2	Antibakteriální stanovení – Agarová difúzní metoda	17
2.5	Testování cytotoxicity in vitro.....	17
2.5.1	Toxicita.....	18
2.5.2	MTT test cytotoxicity.....	18
3	Cíl práce	18
4	Experimentální část.....	19
4.1	Laboratorní vybavení.....	19
4.1.1	Přístroje	19
4.1.2	Chemikálie	19
4.1.3	Plyny.....	20
4.1.4	Standardní chemikálie	20
4.2	Vybrané produkty	21
4.2.1	Superionherbs Betaglukan MaxCell.....	21
4.2.2	APOTEX Betaglukan IMU 200 mg.....	21
4.2.3	APOTEX Betaglukan FORTE 250 mg	21

4.2.4	Finclub fin Glukimcaps	22
4.2.5	Imunoglukan P4H 250 ml	22
4.3	Extrakce	22
4.4	Charakterizace extraktů	23
4.4.1	Stanovení neutrálních sacharidů metodou dle Duboise	23
4.4.2	Stanovení celkových polyfenolů	23
4.4.3	Stanovení redukujících sacharidů metodou dle Somogyi-Nelsona	24
4.4.4	Stanovení proteinů metodou dle Hartree-Lowryho	24
4.4.5	Stanovení kyseliny askorbové – HPLC/UV-VIS	24
4.4.6	Stanovení antioxidační aktivity – ABTS	24
4.5	Stanovení celkového obsahu β -glukanů	25
4.5.1	Obsah balení kitu pro stanovení β -glukanů	25
4.5.2	Příprava reakčních roztoků z jednotlivých částí kitu	26
4.5.3	Pomocné roztoky	26
4.5.4	Stanovení celkových glukanů	27
4.5.5	Stanovení α -glukanů	27
4.6	Stanovení lipidů – plynová chromatografie	28
4.6.1	Transesterifikace	28
4.7	Antibakteriální a antimikrobiální testy	28
4.7.1	Agarová difúzní metoda	28
4.8	Cytotoxicita a genotoxicita	29
4.8.1	Počítání buněk	29
4.8.2	MTT test	30
5	Výsledky a diskuze	31
5.1	Stanovení neutrálních sacharidů metodou dle Duboise	31
5.2	Stanovení celkových polyfenolů	31
5.3	Stanovení redukujících sacharidů metodou dle Somogyi-Nelsona	32
5.4	Stanovení proteinů metodou dle Hartree-Lowryho	33
5.5	Stanovení vitamínu C	34
5.6	Stanovení antioxidační aktivity	34
5.7	Stanovení obsahu α -glukanů, β -glukanů a celkových glukanů	35
5.8	Stanovení mastných kyselin	37
5.9	Antimikrobiální testy	42

5.10	MTT testy	43
5.10.1	Testy viability pro buňky HaCaT	43
5.10.2	Testy viability pro buněčnou linií B16F1	45
6	Závěr	48
7	Zdroje	50
8	Seznam zkratk	53
9	Přílohy	54
9.1	Příloha 1: Kalibrační křivky	54
9.2	Příloha 2: Chromtogram HPLC stanovení vitamínu C	56

1 ÚVOD

Beta-glukan je unikátní přírodní komplexní polysacharid, schopný podporovat obranné reakce organismu. Biologické účinky glukanu jsou známy již delší dobu, vědci se na něj soustředí už od poloviny minulého století. V současné době je beta glukan považován za účinný doplněk stravy, který zlepšuje stav imunitního systému. Beta glukan je také velmi silným antioxidantem.

Beta glukan je polysacharidová molekula extrahovaná z buněčné stěny rostlin, hub a kvasinek. Při místním i celkovém podání je zcela netoxický a bezpečný. Americká organizace pro kontrolu léčiv a potravinových doplňků FDA ho klasifikuje jako GRAS (obecně považován za bezpečný) potravinový doplněk. Není známa jakákoliv toxicita nebo negativní reakce po požití beta glukanu nebo kombinace beta glukanu s jinou látkou. V současnosti neexistují studie prokazující jakýkoliv negativní efekt u autoimunitních reakcí. Široké spektrum antiinfekční aktivity beta glukanu je možno vysvětlit tím, že aktivace imunitního systému je nespecifická.

Imunologická odpověď zesílená beta glukanem jde napříč říší rostlin a živočichů, tj. lze ji nalézt u všech druhů zvířat – včetně savců a člověka – a ryb. Současné poznatky ukazují, že přírodní beta glukan nejvíce působí na evolučně nejstarší buňky imunitní kaskády organismu – makrofágy. Po vstupu beta glukanu do makrofágu dochází k jeho aktivaci, která spočívá v zahájení morfologických změn a k produkci různých druhů tzv. cytokininů (informačních proteinů imunitního systému) a ty fungují jako vnitřní regulátory imunitního systému. Aktivovaný makrofág rozpoznává a zabíjí nádorové buňky stejným způsobem jako když odklízí cizorodý materiál z těla.

Zdroje beta glukanu jsou hlavně houby, kvasinky a ječmen, oves. Beta glukan získaný z obilí nebo jiného zrna (vazba 1,4) se ukazuje jako neúčinný při aktivaci makrofágů, ale může pomoci snižovat cholesterol. Pouze glukany odvozené hlavně z hub nebo z kvasnic mají stimulační účinek na imunitní systém. Z několika typů beta glukanu je beta 1,3 D glukan z hub jedním z nejsilnějších modulátorů imunity. Působí také proti stárnutí, stresu, podporuje hojení ran, preventivně působí proti rozvoji rakoviny, HIV a proti negativním účinkům volných radikálů.

V této práci budou charakterizovány produkty s obsahem beta-glukanů a také bude testována jejich antimikrobiální aktivita, včetně testů vůči keratinocytům a melanomovým buňkám.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Beta-glukany

Beta-glukany jsou široce zastoupeny v přírodě, obzvláště v řasách, houbách a kvasinkách, ale také ve vyšších rostlinách. Zajišťují různorodé biologické funkce. Jsou hlavní složkou buněčných stěn, slouží jako zdroj energie a někdy také plní ochrannou funkci [1].

Beta-glukany jsou bezpečný a velmi účinný doplněk stravy, který zlepšuje stav imunitního systému, obnovuje obranný systém těla a tím umožňuje lepší prevenci před onemocněním, rychlejší rekonvalescenci a rehabilitaci, poskytuje ochranu proti záření různého původu (RTG vyšetření, ozařování, radiační smog [2].

Beta-glukan je také velmi silným antioxidantem s vysokou vychytávací aktivitou volných radikálů, díky níž bojuje proti jejich nežádoucím účinkům na náš organismus [3].

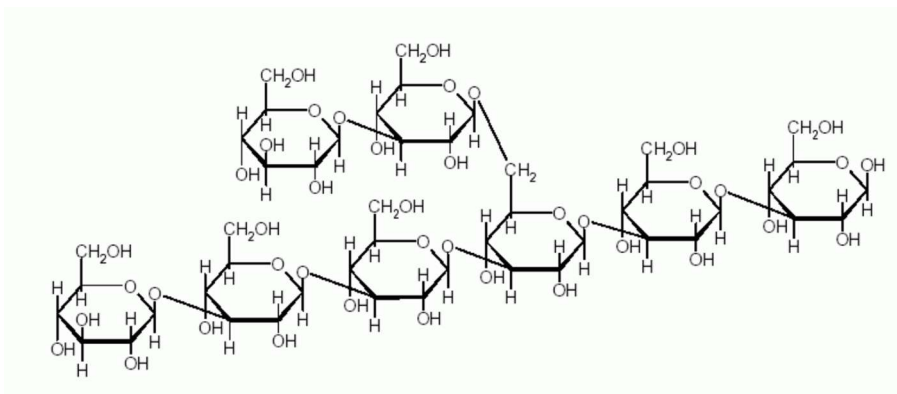
Počet molekulárních variant beta-glukanů je téměř tak velký jako počet zdrojů, z nichž jsou izolovány. Beta-glukany jsou strukturální komponenty buněčných stěn bakterií, sinic, řas, kvasinek a hub, dokonce se v hojné míře nacházejí také v zrnech obilovin. Primární zdroje beta-glukanů pro imunomodulační studie i pro léčebné aplikace jsou víceméně tradiční, jen částečně dané jejich větší dostupností. V Evropě a USA jde o zymozan z kvasnic využívaných v pekařství a pivovarnictví, ve Francii glukany z mořských řas, v Kanadě a Brazílii glukany z obilovin, v Japonsku, Číně a Rusku jsou to nejrozumnější druhy hub (šitake, maitake, reiši) [4].

2.1.1 Chemické vlastnosti

Beta-glukany jsou polysacharidy s dlouhým řetězcem, jejichž jedinou strukturální jednotkou je glukosa. Glukosa je v řetězci vázaná vazbami v pozicích 1,3 a 1,6. V pozicích 1,6 a 1,4 i 1,3 se z hlavního řetězce rozvětvují menší postranní řetězce. Tato struktura je dále stabilizována pomocí vodíkových vazeb. Neaktivnější formou β -1,3-D-glukanů jsou ty, které obsahují postranní řetězce v pozicích 1,6 a rozvětvují se z delšího β -1,3-glukanového hlavního řetězce. [5]

Makromolekulární struktura glukanů závisí na zdroji a metodě izolace. Přírodní β -1,3-D-glukany jsou charakterizovány primární strukturou, rozpustností, stupněm větvení, molekulární hmotností, nábojem polymeru, konformací v roztoku (trojitá šroubovice, jednoduchá šroubovice, náhodná smyčková konformace). Tyto vlastnosti hrají významnou roli v biologické aktivitě beta-glukanů.

Aktivita beta-glukanů se odvíjí podle jejich stupně větvení. Nejvyšší biologickou aktivitu mají glukany se stupněm větvení v intervalu 0,20 až 0,33. Aktivitu beta-glukanů ovlivňuje taky velikost glukanu z hlediska molekulové hmotnosti. Různé studie se zabývaly popisem vztahu biologické aktivity a molekulové hmotnosti glukanů. Nejvyšší aktivitu vykazovaly vzorky s molekulovou hmotností v rozmezí 100-200 kDa, vysokou molekulovou hmotností, existující ve formě trojitě nebo jednoduše šroubovici. Naopak vzorky ze stejného zdroje o nižší molekulové hmotnosti, 5-10 kDa, měly nulovou aktivitu, popř. velmi omezenou. [6]



Obrázek 1: Struktura beta-glukanu [7]

2.1.2 Přírodní zdroje beta-glukanů

Beta-glukany jsou významnou součástí vlákniny cereálií, kterou tvoří nerozvětvené polysacharidy složené z β -D-glukopyranózových jednotek vázaných (1,4) a (1,3) glykosidovými vazbami. Ze všech obilných zrn, ječmen a oves obsahují nejvyšší množství beta-glukanů, které tvoří 3-11% (ječmen) a 3-7% (oves) sušiny. Beta-glukany jsou obvykle koncentrovány ve vnitřních buněčných stěnách a endospermu ječmene, ovsu a pšenice [8].

Dalším zdrojem beta-D-glukanů jsou kvasinky, v nichž se nachází také v buněčných stěnách spolu s mannany a chitinem. β -D-glukan z kvasinek se skládá z primárního řetězce a rozvětvených polymerů. Strukturu primárního řetězce tvoří glukózové polymery vázané (1,3) a (1,6) glykosidovými vazbami. Rozvětvené polymery se skládají z hlavního řetězce s (1,3) glykosidovými vazbami, který obsahuje v různé míře (1,6) - β -větvení. PGG-glukan nebo poly- (1,6) - β -D-glukopyranosyl- (1,3) - β -D-glukopyranosy je geneticky modifikovaný β -glukan ze *Saccharomyces cerevisiae*. Zymozan je název preparátu získaného ze *Saccharomyces cerevisiae* (pekařské droždí), který obsahuje β -(1,3)-glukan, β -(1,6)-glukan a jiné složky buněčné stěny jako chitin a mannoproteiny [9].

β -(1,3) a β -(1,6)-glukany jsou důležitou povrchovou složkou hub. Mezi nejstudovanější β -glukany z hub patří lentinan z *Lentinus edodes*, grifolan (také nazývaný GRN a grifolan LE) z *Grifola frondosa*, schizophyllan (také nazývaný SPG, sonifilan, sizofiran a sizofilan) ze *Schizophyllum commune*, SSG ze *Sclerotinia sclerotiorum*, PSK (krestin) z *Coriolus versicolor* a PSP (polysacharidový peptid) také z *Coriolus versicolor* a pleuran z *Pleurotus ostreatus* [10].

Molekulární vzorec lentinanu je $(C_6H_{10}O_5)_n$. Skládá se z β -(1,3)-D-glukanové kostry s β -(1,6)-glukanovými bočními řetězci. Molekulová hmotnost lentinanu je přibližně 500 kDa, stupeň větvení je 2/5 a terciární struktura lentinanu je pravotočivý trojnásobný helix. Grifolan se také skládá z β -(1,3)-D-glukanové kostry s β -(1,6)-glukanovými bočními řetězci. Molekulová hmotnost grifolanu je přibližně 500 kDa, stupeň větvení je 1/3 a jeho terciární struktura je trojnásobný helix. Schizophyllan i SSG obsahují β -(1,3)-D-glukanovou kostru a β -(1,6)-glukanové boční řetězce, mají terciární strukturu trojnásobného helixu. Stupeň větvení schizophyllanu i SSG je 1/3. β -glukan izolovaný z *Pleurotus ostreatus*, nazývaný pleuran, má rozvětvenou strukturu složenou z hlavního řetězce tvořeného β -D-glukopyranózovými zbytky vázanými (1,3) glykosidovými vazbami, každý čtvrtý je substituovaný na O-6 jednou D-glukopyranózovou skupinou. Tento v zásadách nerozpustný polysacharid obsahuje malé množství (7%) zbytků vázaných (1,6) a (1,4) glykosidovými vazbami [11].

Glukany hub a kvasinek mají shodné struktury. Primární řetězec je tvořen (1,3) spojenými β -D-glukopyranosylovými jednotkami, podél nichž se rozvětvují vedlejší řetězce z β -D-glukopyranosylových jednotek napojených vazbou (1,6) [6].

2.1.3 Využití

Výsledky mnoha studií ukázaly, že účinky beta-glukanů jsou velmi prospěšné pro člověka a zvířata. Např. beta-glukany obsažené v ovesných produktech mohou představovat důležitý prvek při napomáhání dietních terapií. Dále napomáhají u řady nemocí, jako jsou hypertenze, hypercholesterolemie, gastritida, zánět žaludeční sliznice nebo diabetes [11].

Beta-glukany mají schopnost vychytávat volné radikály a tím zmírnit zánětlivé stavy a představují tak významnou ochranu proti peroxidaci lipidů v krvi nebo plazmě. Beta-glukany ze zrn nejsou jednotnou frakcí, mnohé formy těchto látek lze nalézt s různou molekulovou hmotností a různými chemickými a fyzickými vlastnostmi (např. viskozita). Různé vlastnosti beta-glukanů mohou rozhodovat o vlivu na organismy, tj. o antidiabetickém, protizánětlivém a antioxidačním účinku (tyto účinky korelují s molekulovou hmotností, viskozitou, složením a chemickou strukturou) [11].

V poslední době se beta-glukany stále více využívají v kosmetickém průmyslu. Lokálně aplikovaný beta-glukan aktivuje epidermální makrofágy (Langerhansovy buňky) a tím zabraňuje průniku mikrobů přes poranění. Dále urychluje zotavení poškozené tkáně.

Kvůli nerozpustné povaze beta-glukanů (dispergovaných částic 1-3 μm), je velmi obtížné podávat je nitrožilní cestou. Intravenózní infuze nerozpustného glukanu z buněk kvasinek podávaná krysám, měla za následek rychlý rozvoj plicního granulomu, složeného téměř jen z monocytů a makrofágů. Několik systémových nemocí je charakterizováno přítomností granulomu z monocytů, které se podobají těm nalezeným v organismech potkanů. Jsou to sarkoidóza, berylióza, talkóza, Wegenerova granulomatóza [4].

2.2 Zdroje β -glukanu ve studovaných přípravcích

2.2.1 *Saccharomyces cerevisiae*

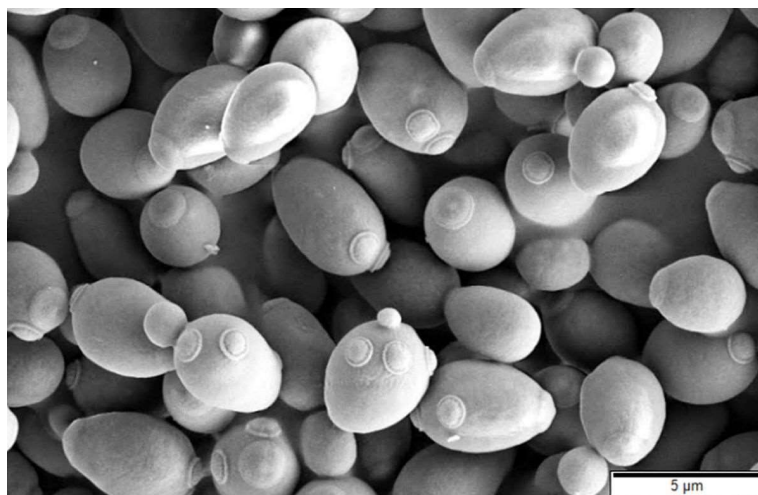
Jednobuněčný eukaryotní druh kvasinky z oddělení vřeckovýtrusných hub (Ascomycota), také označována jako pивní či pekařská kvasinka. Tvar buněk *Saccharomyces cerevisiae* je kulatý až oválný o velikosti 5-10 μm . Člověkem je využívána v kvasných procesech již od neolitu [12].

U kvasinek je možné pohlavní i nepohlavní rozmnožování. Nepohlavní rozmnožování probíhá pučením, pohlavní rozmnožování probíhá konjugací dvou haploidních buněk. Jde o fakultativně anaerobní a mezofilní mikroorganismus [16].

Buněčná stěna kvasinky je robustní, poskytující fyzickou ochranu a osmotickou podporu. Mechanická pevnost stěny je dána především vnitřní vrstvou, jenž obsahuje β -1,3-glukan a chitin a představuje asi 50-60 % hmotnosti suché hmoty stěny. Vnější vrstva je tvořena ze silně glykosylovaných mannoproteinů vystupujících z buněčného povrchu. Vnější stěna proteinů odpovídá přibližně jedné třetině suché hmotnosti stěny. Proteiny buněčné stěny jsou kovalentně vázány na síť β -1,3-glukan-chitinu buď nepřímo přes β -1,6-glukanovou část, nebo přímo. Kromě toho jsou některé proteiny disulfidově vázány na jiné proteiny buněčných stěn.

Mechanická pevnost buněčné stěny je hlavně způsobena β -1,3-glukanem. Řetězce β -1,3-glukanu patří do tzv. duté helixové rodiny, tj. může existovat v různých stavech prodloužení. Tato vlastnost vysvětluje elasticitu buněčné stěny.

Kvasinka *Saccharomyces cerevisiae* patří mezi jedny z nejprozkoumanějších kvasinek a nachází široké využití v biotechnologiích [15].



Obrázek 2: *Saccharomyce cerevisiae* [18]

2.2.2 Hlíva ústříčná

Houba známá v Japonsku pod názvem hiratake, lat. *Pleurotus ostreatus*, jež se vyskytuje téměř ve všech vegetačních pásmech a je také průmyslově pěstována v České republice. Obsahuje beta-glukan pleuran, jenž působí aktivačně na imunitní systém [14].

Hlíva ústříčná je dřevokazná lupenitá houba, která má široký vějířkovitý klobouk v rozmezí 5-35 cm, jehož okraj se stává ostrým. Zbarvení je závislé na podmínkách růstu, vzdušné vlhkosti apod. Klobouky rostou podobně jako u ostatních hlív nad sebou v trsech, řadách nebo vrstvách. Trsy plodnic mohou dosahovat hmotnosti i několika kilogramů.

Roste od konce léta až do zimy, při mírné zimě často i na jaře, na živých nebo odumřelých kmenech listnatých stromů, zejména na bucích, vrbách, ořešácích, břízách, topolech nebo jeřabinách.

Konzumace hlívy díky obsahu polysacharidického β -1,3/1-6-D-glukanu příznivě ovlivňuje hladinu cholesterolu v krvi, zvyšuje odolnost proti infekcím, zvyšuje také tvorbu červených krvinek mimo kostní dřeň. Působí protizánětlivě proti virovým, bakteriálním a plísňovým chorobám.

Hlíva dále obsahuj krom beta-glukanů, také terpeny, zejména pleurotin, jenž je antibiotickou a antitrombotickou látkou [17].



Obrázek 3: Hlíva ústříčná [18]

2.3 Principy použitých přístrojů a metod

2.3.1 Antioxidační aktivita

Organismy je třeba chránit před působením exogenních a endogenních volných radikálů. Takové ochrany lze docílit působením antioxidantů, které snižují pravděpodobnost vzniku radikálů, popř. snižují jejich reaktivitu nebo je úplně utlumí, čímž je omezen proces oxidace v organismu nebo ve směsích, kde se vyskytují. Setkat se s nimi můžeme v potravinách, např. zabraňují žluknutí rostlinných tuků, ale také v organismech ve formě enzymů. V potravě jsou však přítomnost antioxidantů nepodstatná, protože rychle zanikají a nepřežívají trávicí proces [20].

Antioxidační aktivita je stanovena pomocí metody TEAC, která využívá principu zhášení radikálového kationtu $ABTS^{+}$, jenž vzniká oxidací 2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonátu). Tmavě zelený roztok vykazuje vysokou absorpenci v oblasti viditelného světla (600–750 nm), díky čemuž je využíváno spektrofotometrického stanovení. Naměřená hodnota odpovídá počtu inaktivovaných radikálových kationtů $ABTS^{+}$ jednou molekulou antioxidantu. Stanovení je závislé na čase inkubace, množství vzorku a koncentraci $ABTS^{+}$ [21].

2.3.2 Spektrofotometrie

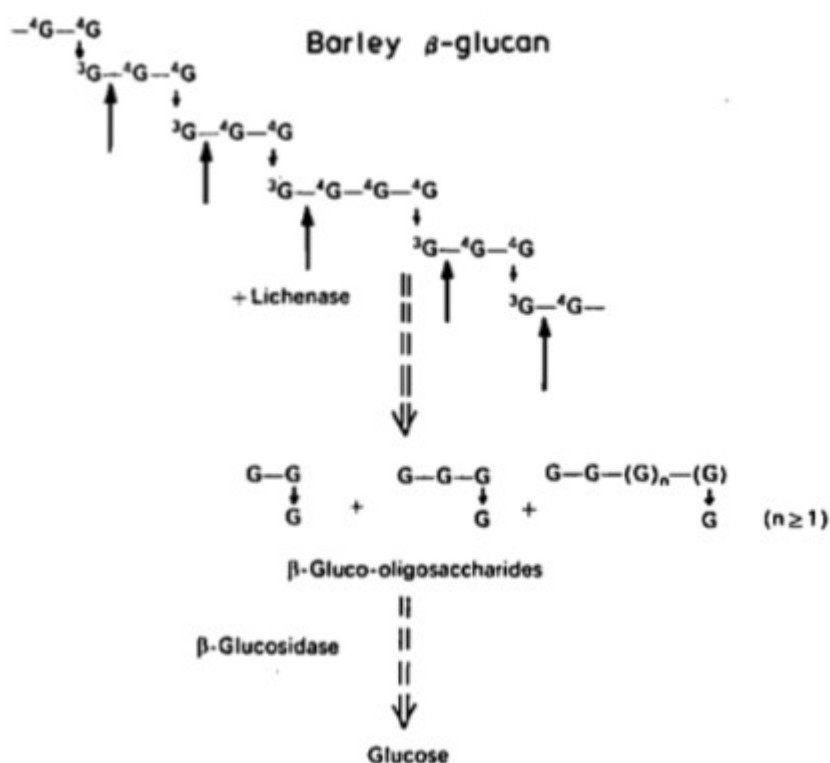
Fyzikálně-chemická disciplína, jejímž základem je Lambert-Beerův zákon, zabývající se vznikem a vlastnostmi všech druhů spekter, interakcí mezi hmotou a elektromagnetickým zářením. Zkoumá závislost absorpce, emise a rozptylu elektromagnetického záření jako funkce vlnové délky nebo frekvence.

Spektrofotometrie je založena na interakci elektromagnetického záření s analytem. Analyt část záření absorbuje, čímž dojde ke změně energie molekuly a vzniku excitovaného atomu. Záření, které roztokem projde je následně detekováno přístrojem. Množství světla, které vzorkem prošlo, odrazilo se nebo bylo pohlceno jistou látkou, je závislé na koncentraci látky a na vlnové délce světla.

Spektrofotometrická stanovení byla provedena na přístroji od firmy Helios. V některých případech bylo třeba vzorky naředit tak, aby absorbance nepřesáhla hodnotu 1,0 [22].

2.3.3 Enzymatic Yeast β -Glucan Assay Kit – Stanovení β -Glukanů

Jednoduchá kvantitativní metoda pro určování (1 $\rightarrow$ 3)(1 $\rightarrow$ 4)- β -glukanů v ječmenné mouce a sladu. Poprvé byla popsána již v roce 1985 Barrym V. McClearem a Malcolmem Glennie-Holmsem [23]. Metoda umožňuje přímou analýzu β -glukanů. Jejich postup je celosvětově využívanou metodou stanovení β -glukanů v ječmenu, sladu a vyšších houbách. Dlouhé řetězce β -glukanů jsou specificky depolymerizovány pomocí čisté (1 $\rightarrow$ 3)(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-glukanázy (lichenasy) na oligosacharidy. Tyto oligosacharidy jsou poté specificky a kvantitativně hydrolyzovány na glukózu pomocí čisté β -D-glukosidasy. Glukóza je poté stanovena pomocí reagentu GOPOD (glukosaoxidázy a peroxidasy) [23].



Obrázek 4: Enzymatické štěpení β -glukanů [23]

2.3.4 Plynová chromatografie s plamenově ionizačním detektorem – GC – FID

Principem této metody je rovnovážná distribuce složek mezi dvě fáze: plynou (mobilní) a kapalnou nebo tuhou (stacionární). K separaci složek dochází vždy v plynné fázi, proto je třeba, aby všechny složky vzorku mohly být vypařeny definovaným způsobem. Z tohoto důvodu je GC vhodná spíše pro organické látky, které mají teplotu varu do 400 °C [24] [25][26].

Hlavní části plynové chromatografie jsou nosný plyn, čistící a regulační zařízení, dávkovací zařízení, kolona, termostat, detektor a vyhodnocovací zařízení. Mezi nejdůležitější části přístroje se řadí kolona, na které dochází k separaci. Složky stanovovaného vzorku jsou transportovány kolonou pomocí nosného plynu (mobilní fáze), jenž by měl inertní vůči vzorku. Nejčastěji používané nosné plyny jsou vodík, dusík, helium a argon, které jsou uchovávány v tlakových lahvích. Na základě rozdílných interakcí stanovované látky ke stacionární fázi dochází k separaci a pomocí nosného plynu poté k eluci vzorku, který je poté detekován.

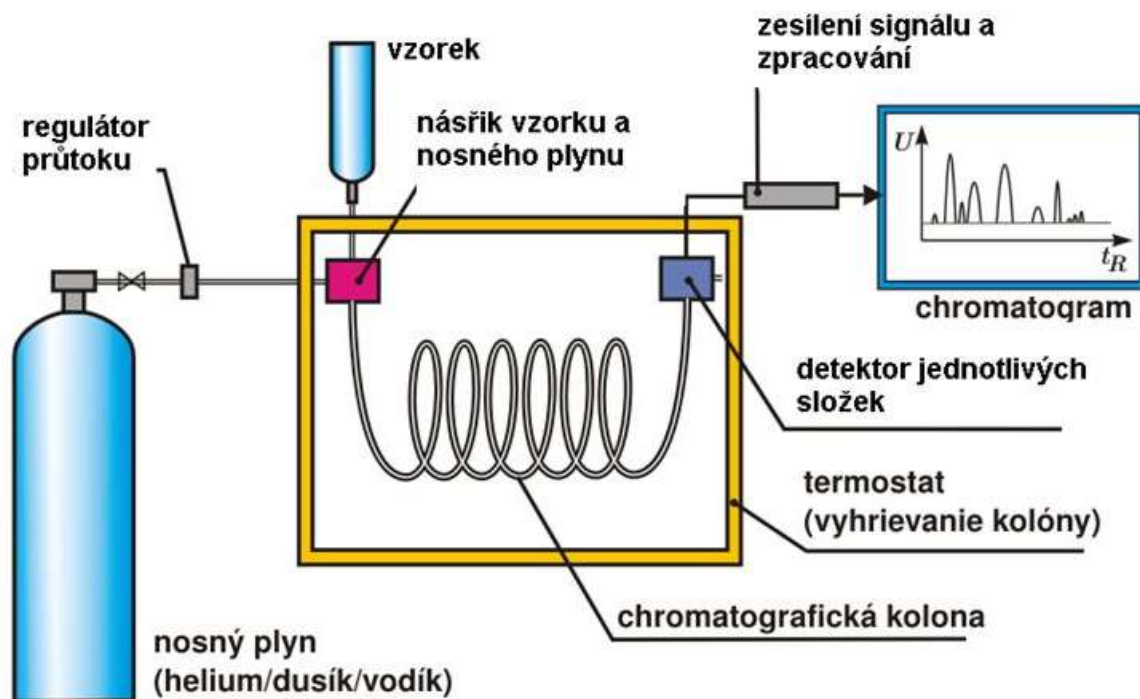
Do přístroje je vzorek vpraven pomocí injektoru. Nejčastěji se používá zavedení pomocí mikrostříkačky přes septum, popř. přes dávkovací ventil (autosampler) [27][28].

Kolony dělíme na náplňové a kapilární. Náplňové kolony jsou trubice naplněné absorbentem, např. silikagelem nebo aluminou, a jejich délka bývá od jednoho po tři metry, průměr od dvou do tří milimetrů. Kapilární kolony jsou vyrobeny z taveného křemene pokrytého polyimidovou vrstvou [24].

Stálou teplotu v přístroji zajišťuje termostat, který udržuje teplotu takovou, aby vzorek zůstal po dobu analýzy neustále v plynném stavu [27][28].

Detektor poskytuje rozdílné signály při průchodu samotného nosného plynu a při průchodu směsi nosného plynu s eluovaným vzorkem. Detektor volíme tak, aby měl dobrou stabilitu signálu, velkou citlivost a dostatečně rychlou reakci na změnu složení. Plamenově ionizační detektor se řadí mezi jeden z nejrozšířenějších (FID detektor, „Flame Ionization Detector“). Jeho principem je ionizace molekul plynu v kyslíkovodíkovém plameni hořícím

mezi dvěma elektrodami. Je-li přítomen vzorek, dojde ke zvýšení ionizace a detektorem bude probíhat proud úměrný koncentraci sloučeniny v nosném plynu. Detekční limity tohoto detektoru se pohybují v pikogramech analytu. Nejčastěji se FID využívá pro stanovení organických látek [27][28].



Obrázek 5: Plynová chromatografie *Chyba! Nenalezen zdroj odkazů.*

2.3.5 Kapalinová chromatografie – HPLC s UV-VIS detekcí

U kapalinové chromatografie je jako mobilní fáze použita kapalina. O separaci složek vzorku poté rozhoduje interakce se stacionární fází, ale i použitá mobilní fáze. Během separace dochází k dělení analytu mezi mobilní a stacionární fází, kde čas, který vzorek stráví ve stacionární, či mobilní fází, záleží na afinitě analytu ke každé z fází [28].

Pro zvýšení účinnosti kapalinové chromatografie se využívá dostatečně malých zrníček sorbentu, jež kladou prostupující kapalině dostatečný odpor. Proto je využíváno vysokých tlaků [30].

Stacionární fáze se nachází v kolonách a má rozhodující vliv na separaci při použití náplňových kolon. Čím menší částice sorbentu v koloně, tím je separace účinnější.

Mobilní fáze v kapalinové chromatografii není inertní, ale výrazně se podílí na separačním procesu. Složení mobilní fáze lze prakticky neomezeně měnit a je prakticky jednodušší měnit složení mobilní fáze než měnit stacionární fází. Složení mobilní fáze se mění pomocí změny složení rozpouštědel, pH, iontové síly, či iontově párovými činidly. Mobilní fázi charakterizují polarita a selektivita [28][30].

Přístroje pro kapalinovou chromatografii se skládají ze zásobníku mobilní fáze, čerpadla, vstřikovacího ventilu, separační kolony a detektoru [28].

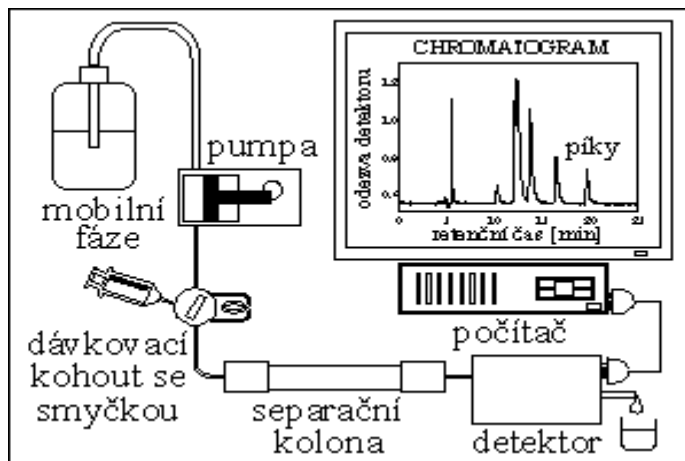
Do kolony se kapalina dostává pomocí čerpadel. Používají se čerpadla pístová nebo membránová, která musí být vysokotlaká. Ideální je, když čerpadlo dosahuje průtoku v rozsahu od mikrolitrů do desítek mililitrů za minutu s méně než 1% kolísáním průtoku při tlaku až 35 MPa. Čerpadlo musí být z takového materiálu, aby při průchodu mobilní fází nebylo narušeno, a nesmí se z něj uvolňovat žádné látky. Průtok musí být bezpulsní,

nekolísavý a reprodukovatelný. Pro menší průtoky se využívá pístových čerpadel, která jsou bezpulsní [28].

Dávkování injekční stříkačkou způsobuje problémy s těsností, udržením tlaku a zejména se zavedením stop materiálu injekční stříkačky. Materiál stříkačky by měl být z inertních materiálů, jako jsou nerezová ocel, titan, či některé polymery. Existují manuální, ale také automatická injekční zařízení, v dnešní době bývají nahrazeny dávkovacími ventily se smyčkou. Objem smyčky se pohybuje od desítek nanolitů až po mililitry, výhodou je reprodukovatelné a snadno automatizované dávkování [28].

Kolony jsou obvykle vyrobeny z nerezové oceli, skla nebo plastu. Vnitřní průměr kolon se pohybuje řádově od desítek mikrometrů do 1 centimetru. Délka kolon je většinou 10, 15, 25 centimetrů a běžný průtok eluentu je 1–2 ml za minutu. Kolony se chrání před nečistotami a nerozpustnými materiály pomocí předkolon, které jsou umístěny mezi čerpadlo a dávkovací smyčku, popř. ochranné kolony umístěné mezi dávkovací zařízení a analytickou kolonu. Pro zlepšení separace se může kolona zahřívat pomocí termostatu [28].

Detektory pro kapalinovou chromatografii by měly být selektivní pro analyt a málo citlivé na mobilní fázi. Průtočná cela, stejně jako čerpadlo, musí být vyrobena z materiálu odolného vůči mobilní fázi a udržet těsnost. Nejčastěji se u kapalinové chromatografie setkáváme s fotometrickými, refraktometrickými a fluorescenčními detektory. Objem detektoru by měl být natolik malý, aby nedocházelo k rozmývání elučních křivek. Signál detektoru by měl být stabilní a reprodukovatelný, lineárně závislý na koncentraci v co nejširším rozsahu, citlivost by měla být co největší, mez detekce co nejnižší, s co nejmenším šumem. Jedním z nejpoužívanějších detektorů je spektrofotometrický. Je poměrně jednoduchý, spolehlivý, s širokým rozsahem látek, které pomocí něho lze detekovat a je také kompatibilní s gradientovou elucí. Důležité je, aby mobilní fáze neměla vysokou absorpční při použité vlnové délce. Nejčastěji se využívá dvoupráskových spektrofotometrů s průtokovou detekční celou [28].



Obrázek 6: Kapalinová chromatografie [31]

2.4 Kultivace mikroorganismů

Kultivace se využívá, pokud chceme namnožit kultury bakterií a provádí se na nebuněčných živných půdách. Pro to, aby byla kultivace úspěšná, je třeba správně zvolit živné médium. Nároky mikroorganismů na živná média jsou velice rozdílné. Organismy můžeme dělit podle požadavků na kyslík na aerobní a anaerobní a také podle nároků na živiny. Nejčastěji používaným rozpouštědlem je voda [34].

Podle původu dělíme živná média na přírodní (ovoce, mléko), syntetická (přesně definované chemické složení) a umělá (připravená, ale o neznámém chemickém složení). Dále média můžeme dělit podle konzistence na pevná, polotuhá a tekutá. Podle obsahu živin,

na základní a obohacené, a také podle účelu použití (selektivní, universální, diagnostické a výběrové-diagnostické [32].

2.4.1 Použité mikroorganismy

Pro stanovení antimikrobiální aktivity byla vybrána kvasinka z kmene *Candida glabrata*, gramnegativní bakterie *Serratia marcescens* a grampozitivní bakterie *Micrococcus luteus*.

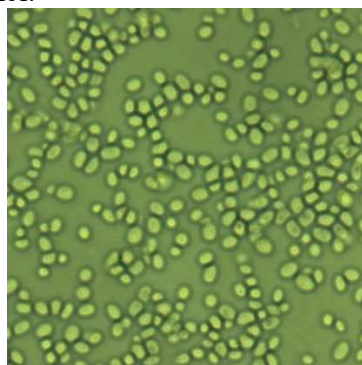
Kvasinky jsou eukaryotní mikroorganismy. Často se využívají v potravinářství a biotechnologiích. Mají vejcovitý tvar a rozmnožují se buď vegetativně či pohlavně. Buňky kvasinek jsou tvořeny buněčnou stěnou, cytoplazmatickou membránou s cytoplazmou a další buněčné struktury [32].

Bakterie jsou jednobuněčné, prokaryotické mikroorganismy, které mají velice specifický metabolismu, díky kterému mají rychlý růst a rozmnožování. Jejich velikost je udávána v mikrometrech. Velký význam u bakteriální buňky má buněčná stěna. Ta tvoří ochranný obal před mechanickým a chemickým poškozením, vysycháním, udržuje stálý osmotický tlak a udržuje tvar buňky. Hlavní složkou buněčné stěny je peptidoglykan [35].

Podle struktury buněčné stěny dělíme bakterie podle Gramma na grampozitivní (G+) a gramnegativní (G-). U grampozitivních je buněčná stěna tvořena silnou vrstvou peptidoglykanu, jež je prostoupena kyselinou teichoovou. Buněčná stěna gramnegativních bakterií je složitější, stěna je tenčí, ale nad peptidoglykanem se nachází ještě dvojvrstva fosfolipidů a bílkovin. Vrstvy jsou vzájemně propojeny lipoproteiny a na horní straně membrány se nachází lipopolysacharidy [35].

2.4.1.1 *Candida glabrata*

Kvasinka patří do rodu *Candida*. Do nedávna byla považována za nepatogenní. Představuje druhý nejčastější patogen v krevním oběhu v Severní Americe. Její vysoký výskyt je způsobem používání širokospektrálních antibiotik. Často se nachází v močových cestách nebo u povrchových infekcí.



Obrázek 7: *Candida glabrata* [39]

2.4.1.2 *Serratia marcescens*

Gramnegativní bakterie z čeledi *Enterobacteriaceae*. Má tvar velmi krátkých tyčinek o průměru 1 μm . Tvoří krátké řetízky, anebo se vyskytuje jednotlivě. Jedná se fakultativně aerobní bakterie a jejich charakteristickým znakem je tvorba červeně zbarvených kolonií. *Serratia marcescens* je hlavní původcem červených skvrn na potravinách s obsahem škrobu [36].



Obrázek 8: *Serratia marcescens* [40]

2.4.1.3 *Micrococcus luteus*

Grammpozitivní bakterie z čeledi *Micrococcaceae*. Má kulovitý tvar o průměru 0,5 – 3,5 μm . Jedná se o aerobní bakterii vyskytující se ve shlučích, či párech. K charakteristickým znakům *Micrococcus luteus* je produkce barviva *lutein*, jenž patří mezi karotenoidní barviva, barva je žlutá. Bakterie je velmi rozšířená, nachází se např. na kůži či v ústní dutině a považuje se za neškodnou bakterii pro zdraví člověka [37].



Obrázek 9: *Micrococcus luteus* [41]

2.4.2 Antibakteriální stanovení – Agarová difúzní metoda

Kvalitativní metoda pro stanovení bakteriálního kmene k antibiotiku. Pracuje se s pevným kultivačním médiem. Rezistentnost či citlivost kmene vůči antibiotiku poznáme podle změření inhibičních zón kolem „jamky“ obsahující přesný objem extraktu vzorku. Touto metodou stanovujeme minimální účinnou koncentraci MIC, která zastavuje růst kmene. Metoda slouží většinou jako srovnávací metoda pro nové antimikrobiální látky [42].

2.5 Testování cytotoxicity in vitro

Pojem *in vitro* v překladu do češtiny v překladu znamená mimo lidské tělo, ve skle. Testy jsou prováděny ve zkumavkách, na sklíčku nebo na Petriho misce. K testům používáme tkáňové kultury nebo buněčné linie. Pomocí testů jsme schopni stanovit účinky chemických a toxických látek na buňkách. Cytotoxicita je schopnost buněk nebo chemických látek ničit jiné buňky [43].

2.5.1 Toxicita

Toxicitou je myšlena míra vlivu, jakým působí jedovaté látky na živý organismus. V současné době jsou veškeré látky či materiály, které se zavádí do lidského organismu, testovány na toxicitu pro buňky a tkáně. Toxicitou se zabývá vědní obor toxikologie [44].

2.5.2 MTT test cytotoxicity

Cytotoxicita extraktů byla stanovena pomocí MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyltetrazolium bromid) testu. Jedná se o metodu založenou na redukci žlutého MTT, pomocí mitochondriálních enzymů dýchacího řetězce buněk, na fialový formazanový derivát, který zůstává uvnitř buněk ve formě nerozpustných granulí. Přidáním SDS detergentu dojde k uvolnění a rozpuštění barviva z buněk, tím získáváme čirý fialový roztok, který měříme spektrofotometricky při 540 nm [44].

3 CÍL PRÁCE

Cílem bakalářské práce je stanovení obsahu aktivních látek a množství β -glukanů ve vybraných produktech obsahujících *Saccharomyces cerevisiae* a hlívu ústříčnou.

Práce byla řešena v následujících krocích:

- Stručná rešerše zaměřená na β -glukany a jejich studie
- Příprava extraktů
- Charakterizace aktivních a obsahových látek
- Stanovení množství obsahu β -glukanů v komerčních vzorcích
- Testování extraktů vzorků na antimikrobiální aktivitu
- Testování účinnosti extraktů vzorků na nádorové buňky

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Laboratorní vybavení

4.1.1 Přístroje

Analytické váhy Boeco (SRN)

Centrifuga Sigma Laborzentrifugen (SRN)

ELISA reader BioTek Elx808, BioTek (Německo)

Inverzní biologický mikroskop, Laboserv (ČR)

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

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

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

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

Spektrofotometr VIS, Helios δ , Unicam (GB)

Třepačka IKA Yelow Line (SRN)

Vodní lázeň EL-20, Merci a.s. (ČR)

Vortex, TK35, Kartell spa (USA)

HPLC-ULTIMATE 3000, DAD detektor

4.1.2 Chemikálie

Acetonitril, p.a., LachNer (ČR)

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

Agar Powder, Himedia (India)

Albumin 98% – Sigma-Aldrich s.r.o.

Diethylether, p.a., LachNer (ČR)

Dodecylsírán sodný Serva (DEU)

Dusitan sodný, p.a., Lachema (ČR)

Etanol pro UV-VIS, Lachema (ČR)

Fenol, p.a., LachNer (ČR)

Folin-Ciocalteu činidlo, Serva (SRN)

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

Hexakynoželesnatan draselný, Penta (ČR)

Heptahydrát hydrogen arsenitu sodného - Lachema

Hydroxid draselný, p.a., LachNer (ČR)

Hydroxid sodný, p.a., LachNer (ČR)

Chlorid hlinitý, p.a., LachNer (ČR)

Chlorid sodný, p.a., Lachema (ČR)

Chloroform, VWR Chemicals BDH PROLABO (USA)

Kyselina chlorovodíková (35%), LachNer (ČR)

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

Kyselina sírová (96%), LachNer

Metanol, p.a., Lachema (ČR)

Molybdenan amonný - LachNer

Nutrient Broth (NB), Himedia (India)

Octan sodný, p.a., Lachner (ČR)

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

Peroxid vodíku 30 %, p.a Lachner (ČR)

Prvkové standardy 1g/L, Analytika (ČR)
Síran zinečnatý heptahydrát, p.a., LachNer (ČR)
Síran měďnatý pentahydrát – Lach-Ner s.r.o.
Síran sodný - – Lach-Ner s.r.o.
Standardy jednotlivých prvků G/l Analytika (ČR)
Uhličitan sodný, p.a., LachNer (ČR)
Uhličitan vápenatý, p.a., LachNer (ČR)
Ultradeionizovaná voda Pure Lab Water
Vinan sodno-draslený tetrahydrát p. a. – PENTA s.r.o.
Yeast extract - LachNer

4.1.3 Plyny

Dusík 5.0 SIAD v tlakové bombě s redukčním ventilem;
Vodík 5.5 SIAD v tlakové bombě s redukčním ventilem;
Vzduch 5.0 SIAD v tlakové bombě s redukčním ventilem

4.1.4 Standardní chemikálie

Enzymatic Yeast β -Glucan Assay Kit - Megazyme (Ireland)
Glukosa monohydrát, p.a., LachNer (ČR)
Katechin- Sigma-Aldrich (SRN)
Kyselina gallová, Sigma Aldrich (SRN)
Trolox, Sigma Aldrich (SRN)
DME/High Glucose (USA)

4.2 Vybrané produkty

4.2.1 Superionherbs Betaglukan MaxCell

Produkt obsahující beta-glukan kvasničného původu získaný z kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* doplněný o výtěžek z aceroly a resveratrolu. Výrobce udává čistotu β -1,3/1,6 D-glukanu je 80 %, aceroly 25% a resveratrolu 50% (zdrojem resveratrolu je křídlatka japonská). Produkt je ve formě prášku v rostlinné tobolce. Balení obsahuje 90 kapslí, složení jedné kapsle je 420 mg β -1,3/1,6 D-glukanu, 50 mg aceroly a 15 mg resveratrolu.



Obrázek 10: Superionherbs Betaglukan MaxCell

4.2.2 APOTEX Betaglukan IMU 200 mg

Produkt obsahující beta-glukan kvasničného původu získaný z kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* a s obsahem vlákniny inulín. Výrobce udává čistota je minimálně 70 %. Produkt je ve formě prášku v rostlinné tobolce. Balení obsahuje 60 tobolek, složení jedné tobolky je 286 mg β -1,3/1,6 D-glukanu a 124 mg Inulínu.



Obrázek 11: APOTEX Betaglukan IMU 200 mg

4.2.3 APOTEX Betaglukan FORTE 250 mg

Přípravek obsahující přírodní beta-glukany a vitamín C. Přípravek obsahuje kvasničný beta-glukan (*Saccharomyces cerevisiae*) s přidavkem vitamínu C. Výrobce udává čistota beta-glukanu je 70 %. Balení obsahuje 30 tobolek, složení jedné tobolky je 356 mg β -1,3/1,6 D-glukanu a 80 mg vitamínu C.



Obrázek 12: APOTEX Betaglukan FORTE 250 mg

4.2.4 Finclub fin Glukimcaps

Přípravek obsahující patentovanou složku WGP® beta-glukan získaný z potravinářských kvasnic (*Saccharomyces cerevisiae*). Složení jedné kapsle je 335 mg WGP® beta-glukanu, což je zdrojem 250 mg β -1,3/1,6 D-glukanu. Obsah balení je 10 kapslí.



Obrázek 13: Finclub fin glukimcaps

4.2.5 Imunoglukan P4H 250 ml

Přípravek obsahující beta-glukan z hlívy ústříčné (*Pleurotus ostreatus*) s obsahem vitamínu C. Produkt je ve formě sirupu, 1 ml sirupu obsahuje 10 mg Imunoglukan® a 10 mg vitamínu C. Obsah balení je 250 ml.



Obrázek 14: Imunoglukan P4H 250 ml

4.3 Extrakce

Navážka obsahu tablety byla extrahována v destilované vodě a poté třepána na třepačce po dobu 20 minut, následně byly vzorky přeneseny do centrifugačních zkumavek a centrifugovány při 5000 ot./min po dobu tří minut.

Takto připravené extrakty byly využity pro všechna stanovení, s výjimkou lipidů.

Tabulka 1: Navážky a objemy vody pro extrakce

Metoda	m [g]	V [ml]
Celkové sacharidy	0,09	50
Redukující sacharidy		
ABTS	0,10	50
Proteiny		
Vitamín C	0,40	10
Vitamín C pro Immunoglukan	1,03	10

4.4 Charakterizace extraktů

4.4.1 Stanovení neutrálních sacharidů metodou dle Duboise

Obsah neutrálních sacharidů byl stanoven metodou dle Duboise. Tato metoda je založena na dehydrataci sacharidů pomocí koncentrované kyseliny sírové za vzniku furalu (u pentos) nebo 5-hydroxy-methylfuralu (u hexos). Vzniklý fural poté kondenzuje s fenolem za vzniku červeného zabarvení. Absorbance je měřena při 490 nm.

Kalibrační řada byla sestavena ze standardu glukosy o koncentraci 1 mg ml⁻¹, v rozsahu koncentrací 0 – 100 µg.ml⁻¹. Do zkumavek bylo napipetováno 1 ml vzorku, 1 ml 5% roztoku fenolu a 5 ml koncentrované kyseliny sírové (přidávání fenolu a kyseliny sírové se provádí v digestoři). Směs byla inkubována po dobu 30 min při laboratorní teplotě. Poté byla změřena absorbance při 490 nm proti blanku. Blank obsahoval namísto 1 ml vzorku 1 ml destilované vody.

Vodné extrakty vzorku, o neznámé koncentraci, obsahující navážku 0,1 g byly ve zkumavkách smíchány s reakční směsí podle postupu pro sestavení kalibrace. Každý vzorek byl analyzován třikrát, vypočítána průměrná hodnota a směrodatná odchylka.

4.4.2 Stanovení celkových polyfenolů

Stanovení celkového obsahu polyfenolů bylo provedeno standartní fotometrickou metodou s Folin-Ciocalteuovým činidlem. Jako standart byl použit 6 mol.l⁻¹ roztok kyseliny gallové v destilované vodě. Folin-Ciocalteuovo činidlo bylo zředěno vodou v poměru 1:9. Dále byl použit roztok uhličitanu sodného o koncentraci 22 g na 100 ml destilované vody.

Kalibrační řada roztoků kyseliny gallové o koncentraci 0,1-0,5 mg.ml⁻¹ byla změřena spektrofotometricky pomocí UV/VIS spektrofotometru Helios. Do zkumavek bylo přidáno 1 ml Folin-Ciocalteuova činidla, 1 ml destilované vody a 50 µl vzorku. Směs byla promíchána a ponechána 5 minut stát. Poté byl do zkumavky přidán 1 ml nasyceného roztoku uhličitanu sodného. Po 15 minutách stání byla změřena absorbance při 750 nm proti slepému vzorku. U slepého vzorku bylo nahrazeno 50 µl vzorku 50 µl destilované vody. Každý vzorek byl analyzován třikrát a ze získaných hodnot byl vypočítán průměr a směrodatná odchylka (SD) pomocí software Microsoft Office Excel.

Při analýze vzorků bylo na místo 50 µl roztoku kyseliny gallové pipetováno 50 µl extraktu vzorků. Extrakty byly připraveny navážením konkrétního podílu vzorku, který byl poté extrahován v destilované vodě po dobu 30 minut. Následně byly extrakty centrifugovány 5 minut při 5000 ot/min. Následně bylo odpipetováno požadované množství extraktu. Vzorky přípravků s obsahem beta-glukanů byly opět třikrát analyzovány stejným způsobem.

4.4.3 Stanovení redukujících sacharidů metodou dle Somogyi-Nelsona

Metoda je založena na redukci měďnaté soli a následovném vzniku modrozeleného komplexu. Koncentrace redukujících sacharidů je poté vypočtena pomocí kalibrační rovnice za změření absorbance.

Pro sestrojení kalibrační křivky byl připraven zásobní roztok glukosy o koncentraci 50 µg/ml. Poté byla sestrojena kalibrační řada v rozmezí od 5 do 50 µg/ml.

K 1 ml vodného extraktu vzorku bylo přidáno 0,5 ml roztoku Somogyi-Nelson I a 0,5 ml roztoku Somogyi-Nelson II. Zkumavky byly promíchány a po dobu 10 minut vařeny při teplotě 100 °C. Po ochlazení na laboratorní teplotu bylo přidáno 0,5 ml roztoku Somogyi-Nelson III. Obsah zkumavek byl vortexován, po rozpuštění sraženiny byly zkumavky doplněny na objem 10 ml destilovanou vodou. Zkumavky byly znovu vortexovány a poté byla měřena absorbance při 720 nm proti slepému vzorku. Slepý vzorek byl připraven nahrazením 1 ml vodného extraktu destilovanou vodou.

Každý vzorek byl proměřen třikrát a byla vypočítána průměrná hodnota a SD. Koncentrace sacharidů byla vypočtena dosazením do kalibrační křivky.

4.4.4 Stanovení proteinů metodou dle Hartree-Lowryho

K 1 ml extraktu vzorku (0,1 g v 50 ml destilované vody) bylo přidáno 0,9 ml Hartree-Lowryho činidla A (1 g tetrahydrogenvinanu draselno sodného, 50 g uhličitanu sodného, 50 ml 1 M roztoku hydroxidu sodného a doplněno na 100 ml). Následně byl roztok inkubován ve vodní lázni při 50°C po dobu 10 minut. Následně byl roztok ochlazen na laboratorní teplotu a bylo přidáno 0,1 ml činidla B (2 g tetrahydrát vinanu draselno-sodného, 1 g pentahydrát síranu měďnatého, 90 ml destilované vody a 10 ml 1 M hydroxidu sodného). Roztok byl promíchán a inkubován po dobu 10 minut. Poté byly přidány 3 ml roztoku Folin-Ciocalteuova činidla zředěného v poměru 1:15, promícháno a poté 10 minut inkubováno ve vodní lázni při 50°C. Roztok byl ochlazen na laboratorní teplotu a promíchán. Změřili jsme absorbanci vzorku při 650 nm.

Kalibrační řada byla sestavena za použití stejného postupu s použitím standartního roztoku albuminu o koncentraci 0,05 – 0,25 mg/ml.

4.4.5 Stanovení kyseliny askorbové – HPLC/UV-VIS

Vzorky s obsahem kyseliny askorbové byly analyzovány na koloně Supercosil (25 cm x 4,6 mm) naplněné reversní fází NH₂ (5 µm) při 30 °C. Mobilní fází byl roztok 0,05 M octanu sodného a acetonitrilu v poměru 95:5. Průtok mobilní fáze byl nastaven na 0,6 ml/min. Vzorek byl nastříknut na kolonu pomocí mikroinjekce přes septum. Detekce byla měřena při 268 nm a z výsledných ploch píků byla sestavena externí kalibrační křivka pro kvantitativné stanovení koncentrace kyseliny askorbové.

4.4.6 Stanovení antioxidační aktivity – ABTS

Stanovení antioxidační aktivity bylo provedeno metodou TEAC, jenž hodnotí schopnost vzorku zhaset ABTS^{•+}. Zhášení je měřeno spektrofotometricky při vlnové délce 734 nm. Pozorujeme úbytek absorbance v čase. Výsledek se poté udává v ekvivalentech syntetického derivátu Troloxu.

Vzorky pro měření antioxidační aktivity byly extrahovány pomocí destilované vody (0,1 g vzorku v 50 ml destilované vody). ABTS byl rozpuštěn v destilované vodě na koncentraci 7 mM. Radikálový kationt z ABTS se získal reakcí s 2,45 mM peroxodisíranem draselným. Roztok se ponechal stát ve tmě při pokojové teplotě nejméně 12 hodin. Před měřením byl roztok ABTS^{•+} zředěn etanolem pro UV-VIS na absorbanci 0,700 (±0,02) při vlnové délce 734 nm (proti etanolu pro UV/VIS).

Do kyvety bylo napipetováno 1 ml zředěného ABTS⁺⁺ a 10 µl destilované vody, poté byla ihned změřena absorbance v čase 0 ($A_t = 0$). Do další kyvety byl pipetován 1 ml ABTS⁺⁺ a k němu poté bylo přidáno 10 µl extraktu vzorku, vzorek byl promíchán a změřen po 10 minutách ($A_t = 10$), kyveta je po dobu čekání uchovávána ve tmě. Pro výpočet: $A = A_0 - A_{10}$.

Pro výpočet celkové antioxidační aktivity byla využita kalibrační křivka Troloxu (6-hydroxy-2,5,7,8- tetramethylchroman-2-carboxylic acid) o koncentraci $c=400$ µg/ml, navážka 40 mg byla rozpuštěna v odměrné baňce o objemu 100 ml pomocí 60% roztoku etanolu pro UV-VIS ve vodě, v rozmezí koncentrací Troloxu 0 – 400 µg/ml. Měření kalibrační křivky probíhalo stejným způsobem jako měření vzorků, kde místo vzorku bylo použito standartu Trolox, místo destilované vody 60% etanol pro UV-VIS.

4.5 Stanovení celkového obsahu β -glukanů

Jedná se o metodu využívající enzymatického rozkladu polysacharidů na jednotlivé D-glukózy. 1,3 a 1,6- β -glukany, 1,3- β -glukany a α -glukany jsou rozpuštěny v ledové 12M kyselině sírové a poté hydrolyzovány pomocí 2M kyseliny sírové.

Zbývající nehydrolyzované části glukanů jsou kvantitativně hydrolyzovány na glukózu pomocí velmi čistých enzymů: exo-1,3- β -glukanázy a β -glukosidázy. Tímto způsobem se získá množství všech obsažených glukanů ve vzorku.

α -glukany jsou specificky hydrolyzovány pomocí amyloglukosidázy a α -amylázy a následně jsou stanoveny za použití reakční směsi GOPOD.

Celkový obsah β -Glukanů je poté stanoven výpočtem z rozdílu celkového množství glukanů a množství α -glukanů.



Obrázek 15: Obsah balení kitu pro stanovení β -glukanů

4.5.1 Obsah balení kitu pro stanovení β -glukanů

Láhev 1: 2 ml suspenze síranu amonného ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) obsahující

- exo-1,3- β -glukanázu (100U/ml)
- β -glukosidázu (20U/ml)
- Láhev je třeba uchovávat při 4 °C

Láhev 2: 20 ml roztoku 50 % glycerolu obsahující

- Amyloglukosidázu (1,63U/ml)
- Invertázu (500U/ml)
- Láhev je třeba uchovávat při 4 °C (popř. – 20 °C)

Láhev 3: 50 ml reakčního pufru GOPOD o pH = 7,4 obsahující

- p-hydroxybenzoovou kyselinu
- Azid sodný
- Láhev je třeba uchovávat při 4 °C

Láhev 4: Reakční směs GOPOD obsahující

- Glukózaoxidázu (GOD)
- Peroxidázu (POD)
- 4-aminoantipyrin
- Láhev je třeba uchovávat při -20 °C

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

- D-glukózu (1,00g/ml)
- Láhev je třeba uchovávat při pokojové teplotě

Láhev 6: Kontrolní vzorek β -glukanu (cca. 2 g)

- Láhev je třeba uchovávat při pokojové teplotě
-

4.5.2 Příprava reakčních roztoků z jednotlivých částí kitu

Část 1: K obsahu láhve 1 bylo přidáno 9 ml pomocného roztoku č. 1 a roztok byl poté rozdělen na vhodné alikvoty.

Část 2: Obsah láhve 2 není třeba upravovat

Část 3: Obsah láhve 3 je naředěna na objem 1 litr pomocí destilované vody (Je třeba dbát na to, aby se nevytvořily krystalky pufru, pokud se vytvoří, je třeba je rozpustit).

Část 4: Obsah láhve 4 se rozpustí v cca 20 ml pomocného roztoku č. 1 a poté je kvantitativně převeden do zbývajících množství pomocného roztoku č. 1, získáme tak GOPOD reagent, který je potřeba chránit proti světlu (alobalem). Takto připravený roztok je třeba uchovávat při 2-5 °C, po dobu maximálně 3 měsíců, nebo při -20 °C po dobu 12 měsíců.

Část 5: Obsah láhve 5 není třeba upravovat

Část 6: Obsah láhve 6 není třeba upravovat

4.5.3 Pomocné roztoky

Pomocný roztok č. 1: Acetátový pufr, 200 mM, pH = 5,0

- Bylo odměřeno 11,6 ml ledové kyseliny sírové a 900 ml destilované vody. Pomocí 4 M roztoku hydroxidu sodného bylo upraveno pH na 5,0. Roztok byl následně doplněn na objem 1 litr. Uchováván byl při 4 °C.

Pomocný roztok č. 2: Acetátový pufr, 1,2 M, pH = 3,8

- Bylo odměřeno 69,6 ml ledové kyseliny a 800 ml destilované vody. Pomocí 4 M roztoku hydroxidu sodného bylo upraveno pH na 3,8. Roztok byl následně doplněn na objem 1 litr. Uchováván byl při pokojové teplotě.

Pomocný roztok č. 3: 10 M hydroxid draselný

- Bylo naváženo 561 g hydroxidu draselného a odměřeno 700 ml destilované vody (prováděno v digestoři, potřeba míchat). Po zchladnutí na

pokojevou teplotu byl roztok doplněn na objem 1 litr. Uchováván byl při pokojové teplotě.

Pomocný roztok č. 4: 2 M hydroxid draselný

- Bylo naváženo 112 g hydroxidu draselného a odměřeno 800 ml destilované vody (prováděno v digestoři, potřeba míchat). Po zchlazení na pokojovou teplotu byl roztok doplněn na objem 1 litr. Uchováván byl při pokojové teplotě.

Pomocný roztok č. 5: 12 M kyselina sírová (72%)

- Bylo odměřeno 640 ml 98 % kyseliny sírové a 300 ml destilované vody (prováděno v digestoři, potřeba míchat). Po zchlazení na pokojovou teplotu byl roztok doplněn na objem 1 litr. Uchováván byl při pokojové teplotě.

4.5.4 Stanovení celkových glukanů

Bylo naváženo 50 mg vzorku do kultivačních zkumavek s uzávěrem a poté byl přidán 1 ml 12 M H_2SO_4 . Vzorek byl promíchán a uložen do ledové lázně po dobu 2 hodin, zkumavky byly uzavřeny uzávěrem. Během lázně byly zkumavky několikrát vortexovány. Po 2 hodinách byly přidány 2 ml destilované vody, obsah zkumavek byl vortexován 10 sekund a následně se přidaly další 3 ml destilované vody. Zkumavky byly vloženy do vroucí lázně na 2 hodiny. Po 5 minutách byly zkumavky zazátkovány. Po ochlazení vzorku na laboratorní teplotu a uvolnění uzávěru, byly napipetovány 3 ml hydrolyzátu a 1,5 ml 10 M KOH do 50 ml centrifugační zkumavky. Vzorek byl doplněn na výsledný objem pomocí acetátového pufru o $\text{pH} = 5$. Vzorek byl následně centrifugován 10 minut na $\text{rpm} = 1\,500$ otáček. Hydrolyzáty byly připraveny k okamžitému měření.

Bylo napipetováno 50 μl hydrolyzátu (viz. 4.5.4) a 50 μl části 1. Roztok byl promíchán na vortexu a následně inkubován po dobu 1 hodiny ve vodní lázni při teplotě 40 °C. Poté bylo napipetováno 1,5 ml roztoku GOPOD (část 4) a vzorek byl opět ponechán ve vodní lázni, 40 °C, po dobu 20 minut. Absorbance byla měřena při 510 nm. Měření se provádělo ve dvou stanoveních proti slepému vzorku. Slepý vzorek (blank) byl připraven 0,1 ml acetátového pufru $\text{pH} = 5$ a 1,5 ml roztoku část 4. Jako standart sloužil roztok D-glukózy, který byl připraven napipetováním 0,1 ml složky 5 a 0,1 ml acetátového pufru $\text{pH} = 5$.

4.5.5 Stanovení α -glukanů

Bylo naváženo 50 mg vzorku do kultivačních zkumavek s uzávěrem a poté byl přidán 1 ml 2 M KOH. Obsah zkumavky byl promíchán a ponechán po dobu 20 minut v ledové lázni. Následně byly přidány 4 ml acetátového pufru o $\text{pH} = 3,8$ a ihned 0,1 ml části 2. Vzorek byl promíchán na vortexu a ponechán 30 minut ve vodní lázni nastavené na teplotu 40 °C, vzorek byl několikrát promíchán. Po 30 minutách byl vzorek kvantitativně převeden do centrifugačních zkumavek a vzorky byly zcentrifugovány při $\text{rpm} = 1\,500$ otáček po dobu 10 minut.

Bylo pipetováno 50 μl hydrolyzátu (viz. 4.5.5) a 50 μl části 1. Následně bylo přidáno 1,5 ml roztoku GOPOD (část 4) a vzorek byl ponechán ve vodní lázni po dobu 20 minut při teplotě 40 °C. Absorbance byla měřena při 510 nm proti slepému vzorku. Měření probíhalo ve dvou stanoveních. Slepý vzorek a standart byly totožné jako v předešlé části (viz. 4.5.4.1).

4.6 Stanovení lipidů – plynová chromatografie

4.6.1 Transesterifikace

Na analytických vahách bylo do skleněných vialek naváženo 10 mg vzorku. Poté byl do vialek přidán 1 ml chloroformu a 0,8 ml transesterifikační směsi (15 % H_2SO_4 v MeOH (p.a.), 0,5 mg/ml inertního standartu (C17 kyselina heptadekanová)). Vialky byly zazátkovány víčkem a poté ponechány v termobloku při 90 °C po dobu 3 hodin. Po 3 hodinách byly vialky z termobloku vyjmuty a ponechány stát, aby vychladly na laboratorní teplotu. Poté se obsah vialek kvantitativně převedl do větších vialek (5 ml) a bylo přidáno 0,5 ml 0,05M NaOH. Vialky byly následně znovu uzavřeny. Po oddělení fází bylo do nových vialek odpipetováno 0,5 ml dolní, chloroformové fáze. Vialky byly uschovány do mrazáku a připraveny na proměření pomocí metody GC. Před měřením bylo ke vzorku přidáno 0,5 ml chloroformu.

4.7 Antibakteriální a antimikrobiální testy

Ke kultivaci byl použit bakteriální kmen *Micrococcus luteus*, z grampozitivních bakterií, *Serratia marcescens*, z gramnegativních bakterií, a kvasinka *Candida glabrata*. Kultivace byly prováděny ve sterilním boxu a očkování probíhalo na tekutém a tuhém médiu. Média byla před každou kultivací sterilizována v tlakovém hrnci s otevřeným ventilem. Sterilizace probíhala 60 minut. Do 100 ml Erlenmayerovy baňky bylo použito 30 ml příslušného média pro kultivaci mikroorganismů. Následně probíhala inkubace při 37 °C.

Na přípravu tekutého média pro bakteriální kmeny bylo použito:

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

Na přípravu tuhého média byl přidán agar o koncentraci 20 g/l. Tuhé médium se po sterilizaci, ještě za horka, rozlilo do Petriho misek a nechalo se zatuhnout.

Na přípravu YPD média pro *Candida glabrata* bylo použito:

- 20 g/l glukosy
- 10 g/l peptonu
- 10 g/l kvasničného extraktu

Na přípravu tuhého média byl přidán agar o koncentraci 20 g/l. Tuhé médium se po sterilizaci, ještě za horka, rozlilo do Petriho misek a nechalo se zatuhnout.

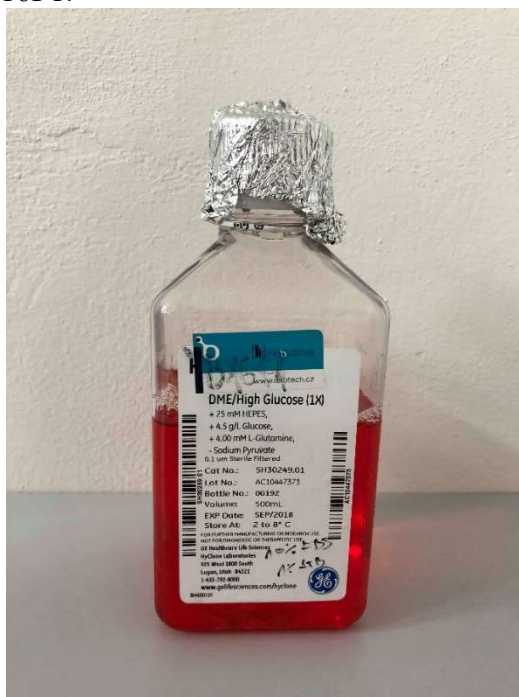
Podle antioxidační aktivity byly vybrány dva vzorky s nejvyšší antioxidační aktivitou, ze kterých se vytvořila koncentrační řada. Jejich navážky byly 0,01; 0,02; 0,04 a 0,05 g na 10 ml vzorku.

4.7.1 Agarová difúzní metoda

Nejprve byly zaočkovány vybrané kultury MO do tekutých médií na dobu 24 hodin, tak aby došlo k nárůstu MO. Poté bylo pipetováno 100 μl na agarovou misku, kde byly rozetřeny hokejkou (sterilní), necháme 20 minut stát. Po 20 minutách bylo na miskách vytvořeno 5 jamek, do kterých jsme pipetovali 80 μl vzorku, do jedné jamky byl pipetován blank (destilovaná voda). Po 24 hodinách byl odečten průměr inhibičních zón okolo jamek. Inhibiční zóny byly zaznamenány a změřeny. Měření probíhalo ve dvou stanoveních pro každý vzorek.

4.8 Cytotoxicita a genotoxicita

Pro MTT testy byly vybrány jednak kožní buňky – keratinocyty z linie HaCat – jedná se o normální buňky s aktivním metabolismem AA, které jsou citlivé k působení cytokinů, a dále myší melanomové buňky B16F1.



Obrázek 16: Kultivační médium pro buňky

4.8.1 Počítání buněk

Po nárůstu buněk na dostatečné množství byly použity pro testování cytotoxicity použitím MTT testu. Po centrifugaci a slití supernatantu byly přidány 3-4 ml média, v němž byly buňky rozsuspendovány. Do mikrobiální destičky (jiné, než pro testy) se napipetuje 10 μ l suspenzovaných buněk a 10 μ l tropanové modři. Směs se rozsuspenduje v jamce pomocí pipety a poté nastříkne pod krycí sklíčko na Bürkerově komůrce. Spočítá se počet buněk v jednotlivých čtvercích, počítají se i buňky dotýkající se levé a dolní strany, kdežto pravé a horní ne, dále se také nepočítají buňky ležící na dělicí čáře čtverců. Tímto způsobem byl získán počet buněk v 1 ml.

Pro zaplnění 60 jamek v mikrotitrační destičce bylo pro test potřeba $1,3 \cdot 10^6$ buněk celkem. Následně se vypočítalo, zda výsledné množství buněk bude stačit na provedení testu, pokud počet nevychází, proces opakujeme s novou lahví buněk.



Obrázek 17: Bürkerova komůrka pro počítání buněk

4.8.2 MTT test

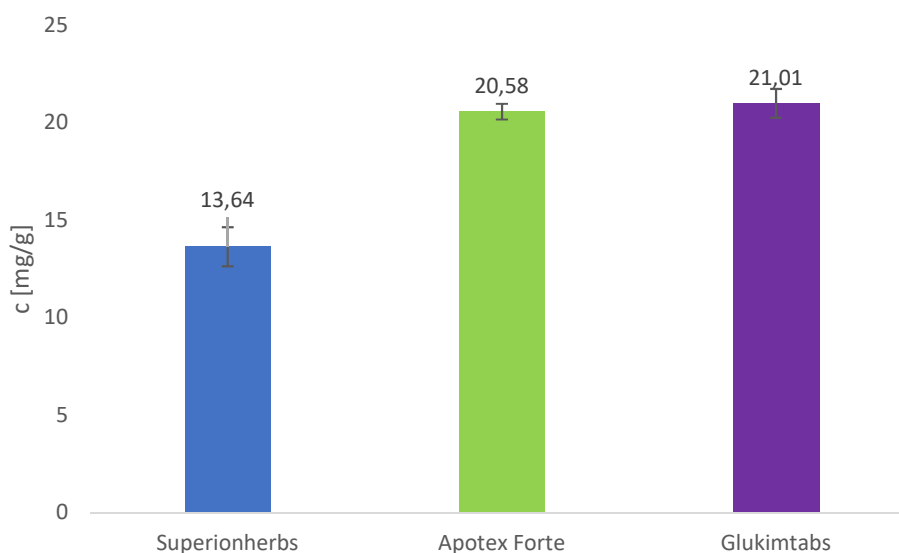
Na MTT test je potřeba 96 jamková destička, která je tvořena osmi řadami od A po H a dvanácti sloupci. Destičku jsme si rozvrhli tak, aby došlo k otestování všech vzorků. Okrajová místa destičky byla vyplněna PBS (100 μ l), aby destička nevyschla. Do zbylých jamek bylo pipetováno 100 μ l suspenze buněk a na 24 hodin byla destička dána do inkubátoru. Poté bylo z jamek odpipetováno médium a přidáno 100 μ l vzorku do každé jamky v různých koncentracích. Poté byla destička opět na 24 hodin inkubována. Po 24 hodinách byl odpipetován vzorek a do každé jamky jsme napipetovali 20 μ l MTT o koncentraci 2,5 mg/ml v PBS. Buňky byly po dobu 3 hodin ponechány ke kultivaci v inkubátoru. Na závěr bylo přidáno 100 μ l 10 % SDS v PBS. Destička se ponechala ve tmě při laboratorní teplotě na dalších 24 hodin. Poté byla změřena absorbance při vlnové délce 540 nm.

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

Tato práce byla zaměřena na studium vybraných komerčně dostupných produktů, kde byla provedena celková charakterizace obsahových látek, především beta-glukanů. Vybrané vzorky jsou uvedeny v experimentální části (viz. kap. 4.2). V experimentální části byly použity vodné extrakty ve všech stanoveních. Extrakty byly připraveny dle Tabulka 1, v kapitole 4.3. Měřeny ve vzorcích byly aktivní látky (polyfenoly), antioxidační aktivita, množství sacharidů, proteinů, vitamínu C a lipidů. Na závěr byly prováděny testy na antimikrobiální aktivitu a testy na cytotoxicitu u extraktů s největší antioxidační aktivitou.

5.1 Stanovení neutrálních sacharidů metodou dle Duboise

Bylo stanoveno množství neutrálních sacharidů ve vzorcích (viz. kap. 4.4.1). Použity byly vodné extrakty o koncentraci 0,09 g na 50 ml destilované vody. Vzorek byl proměřen třikrát a z průměru absorbancí s použitím kalibrační křivky (Příloha 9.1) byla vypočtena koncentrace neutrálních sacharidů v jednotlivých extraktech. Výsledná koncentrace je uvedena v mg/g vzorku.



Graf 1: Obsah neutrálních sacharidů ve vzorcích

Z grafu Graf 1 je patrné, že z vybraných tří vzorků má největší obsah neutrálních sacharidů přípravek Glukimtabs od firmy Finclub. Nejnižší obsah sacharidů obsahuje přípravek Superionherbs. Výrobce uvádí u přípravku Superionherbs obsah β -1,3/1,6 D-glukanu 420 mg (o čistotě minimálně 70 %) na jednu tabletu (485 mg), přepočtením na 1 g, by měl vzorek obsahovat minimálně 605 mg glukanů. U přípravku Apotex Forte výrobce uvádí množství glukanu v tabletě 356 mg (čistota 70 %), tj. 423 mg glukanů v 1 g. U přípravku Glukimtabs je výrobcem uveden obsah glukanů jako 250 mg v 335 mg kapsli, tj. 746 mg glukanů na 1 g.

Obsahy neutrálních sacharidů mohou být v pokusu menší z důvodu nedostatečné extrakce sacharidů do vodného prostředí (β -glukany jsou ve vodě nerozpustné), hydrolýzy a dehydratace a byla proto naměřena pouze část sacharidů ve vzorku. Dále může být výsledek ovlivněn i přítomností redukujících sacharidů.

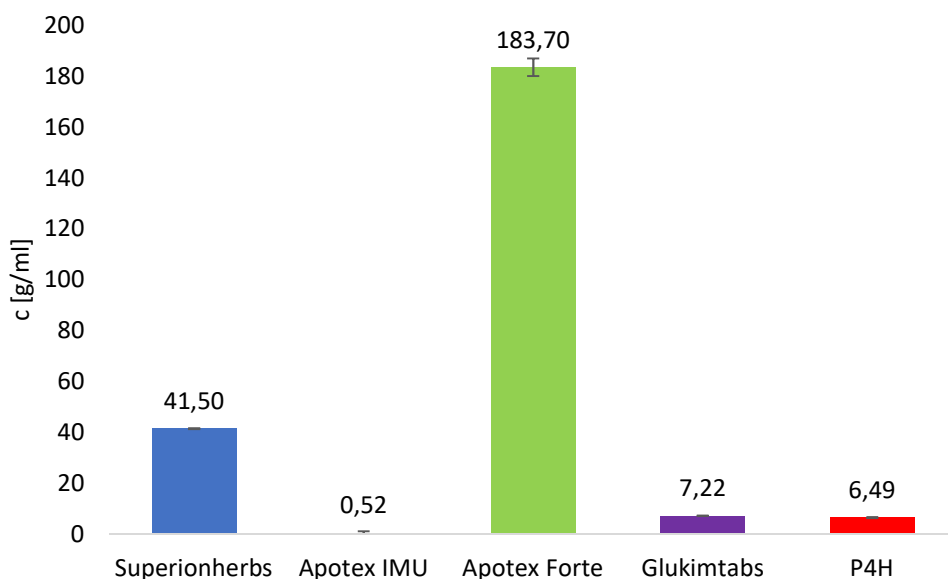
5.2 Stanovení celkových polyfenolů

Bylo stanoveno množství celkových polyfenolů ve vzorcích (viz. kap. 4.4.2). Použity byly vodné extrakty (viz. tabulka 2). Vzorek byl proměřen třikrát a z průměru absorbancí

s využitím kalibrační křivky (Příloha 9.1) byla vypočtena koncentrace polyfenolů v jednotlivých extraktech. Výsledná koncentrace je uvedena v mg/g vzorku.

Tabulka 2: Extrakce jednotlivých vzorků

Vzorky	Navážka [g]	Objem [ml]
Superionherbs	0,10	10
Apotex IMU	0,70	5
Apotex FORTE	0,08	10
Glukimtabs	0,50	5
P4H	0,50	5

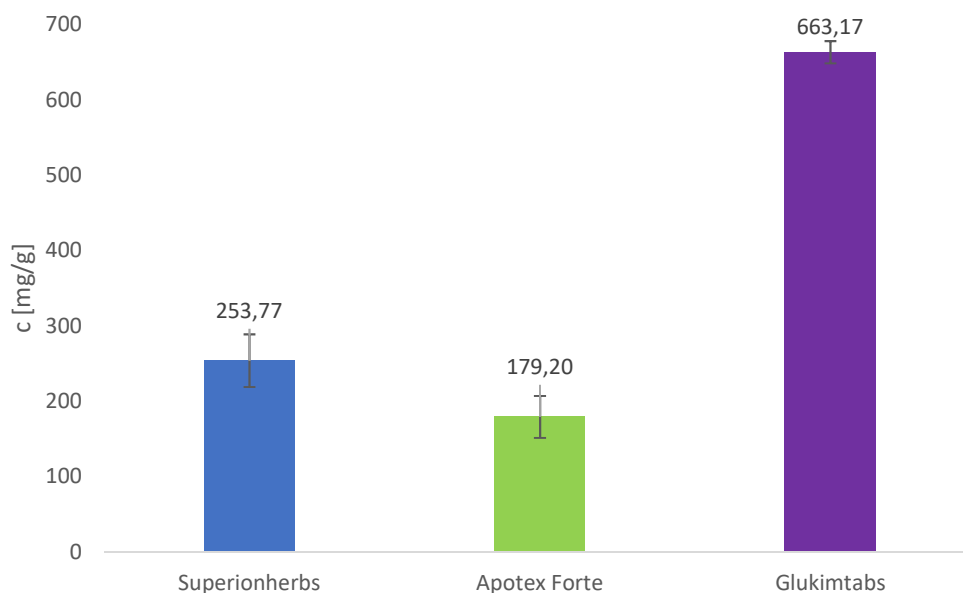


Graf 2: Obsah polyfenolů v extraktech

Z Graf 2 je patrné, že nejvíce polyfenolů obsahuje přípravek Forte od firmy Apotex. Naopak přípravek od stejné firmy, Apotex IMU, obsahuje nejmenší podíl polyfenolů. Vyšší koncentrace u přípravků Superionherbs a Apotex Forte jsou způsobeny přítomností přídatných látek, které obsahují polyfenolické látky. U produktu Superionherbs se jedná především o resveratrol (benzen-1,3-diol). U přípravku Apotex Forte je vysoká koncentrace polyfenolů způsobena vyšším přidavkem vitamínu C. Immunoglukan P4H má také přidáný vitamín C, jenže protože se jedná o sirup, tak došlo k přílišnému naředění vzorku, a proto je koncentrace polyfenolů nižší.

5.3 Stanovení redukujících sacharidů metodou dle Somogyi-Nelsona

Bylo stanoveno množství redukujících sacharidů ve vzorcích (viz. kap. 4.4.3). Použity byly vodné extrakty o koncentraci 0,09 g na 50 ml destilované vody. Vzorek byl proměřen třikrát a z průměru absorbancí s využitím kalibrační křivky (Příloha 9.1) byla vypočtena koncentrace redukujících sacharidů v jednotlivých extraktech. Výsledná koncentrace je uvedena v mg/g vzorku.

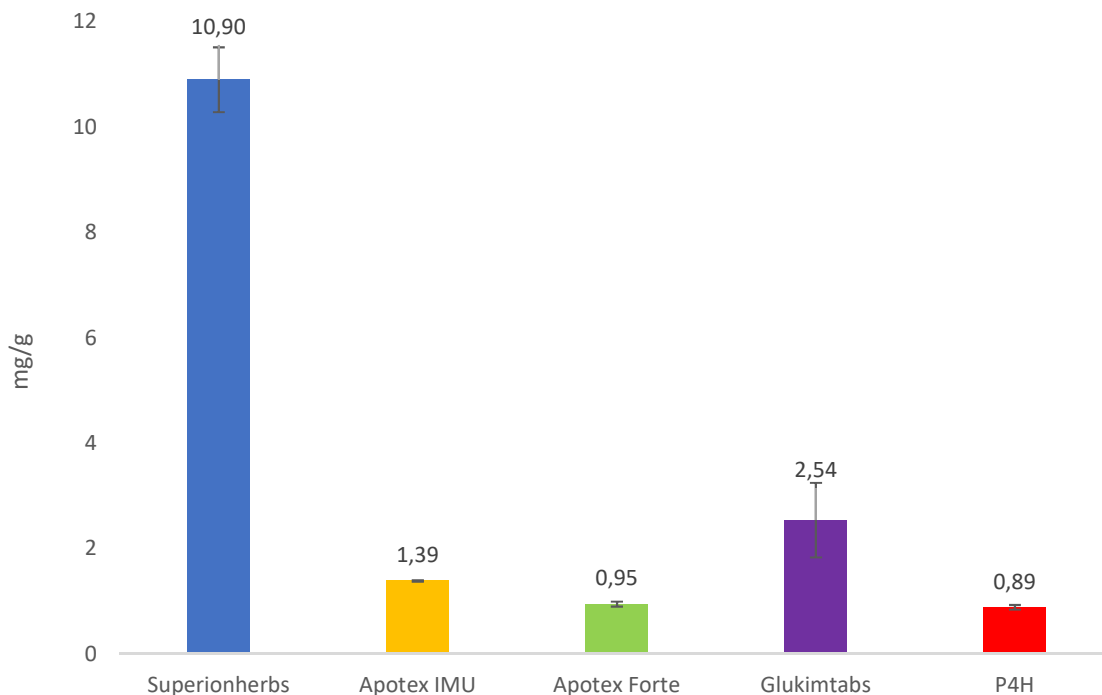


Graf 3: Obsah redukujících sacharidů v extraktech

Z Graf 3 vidíme, že z vybraných tří vzorků má největší obsah redukujících sacharidů přípravek Glukimtabs od firmy Fin. Nejnižší obsah redukujících sacharidů obsahuje přípravek Forte od firmy Apotex.

5.4 Stanovení proteinů metodou dle Hartree-Lowryho

Bylo stanoveno množství proteinů ve vzorcích (viz. kap. 4.4.4). Použity byly vodné extrakty o koncentraci 0,1 g na 50 ml destilované vody. Vzorek byl proměřen třikrát a z průměru absorbancí s využitím kalibrační křivky (Příloha 9.1) byla vypočtena koncentrace proteinů v jednotlivých extraktech. Výsledná koncentrace je uvedena v mg/g vzorku.

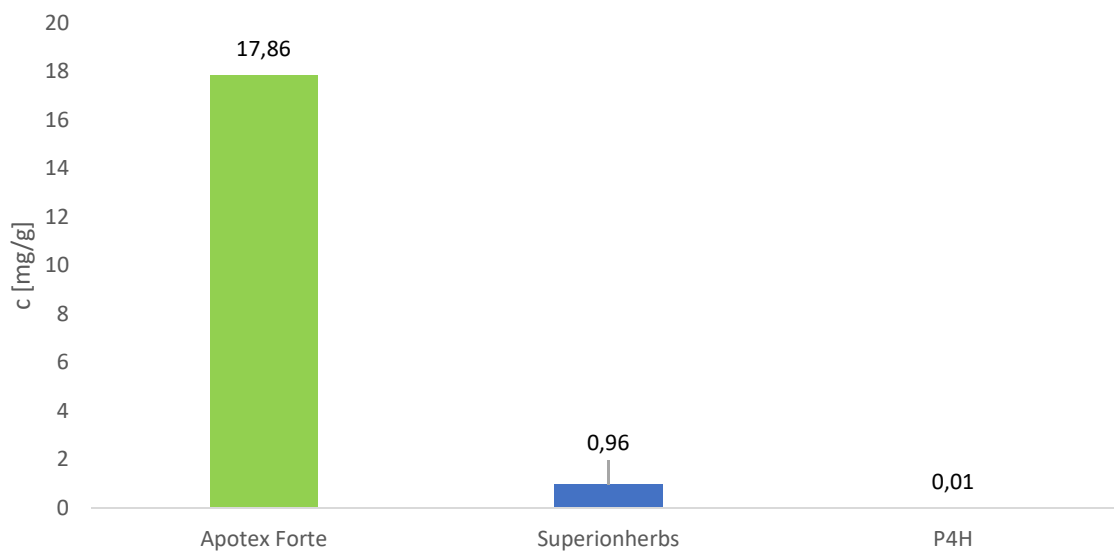


Graf 4: Obsah proteinů v extraktech

Z Graf 4 vidíme, že ze vzorků má největší obsah proteinů přípravek od firmy Superionherbs. Nejnižší obsah sacharidů obsahuje přípravek Forte od firmy Apotex. To znamená, že přípravek Superionherbs obsahuje největší pozůstatek reziduální biomasy.

5.5 Stanovení vitamínu C

Byl stanoven obsah vitamínu C ve vzorcích (viz. kap. 4.4.5). Použity byly vodné extrakty. Vzorek byl proměřen po dobu 15 min na kapalinovém chromatografu a z ploch píků byl s využitím kalibrační křivky (Příloha 9.2) vypočten obsah vitamínu C v jednotlivých extraktech. Výsledná koncentrace vitamínu C je uvedena v mg/g.

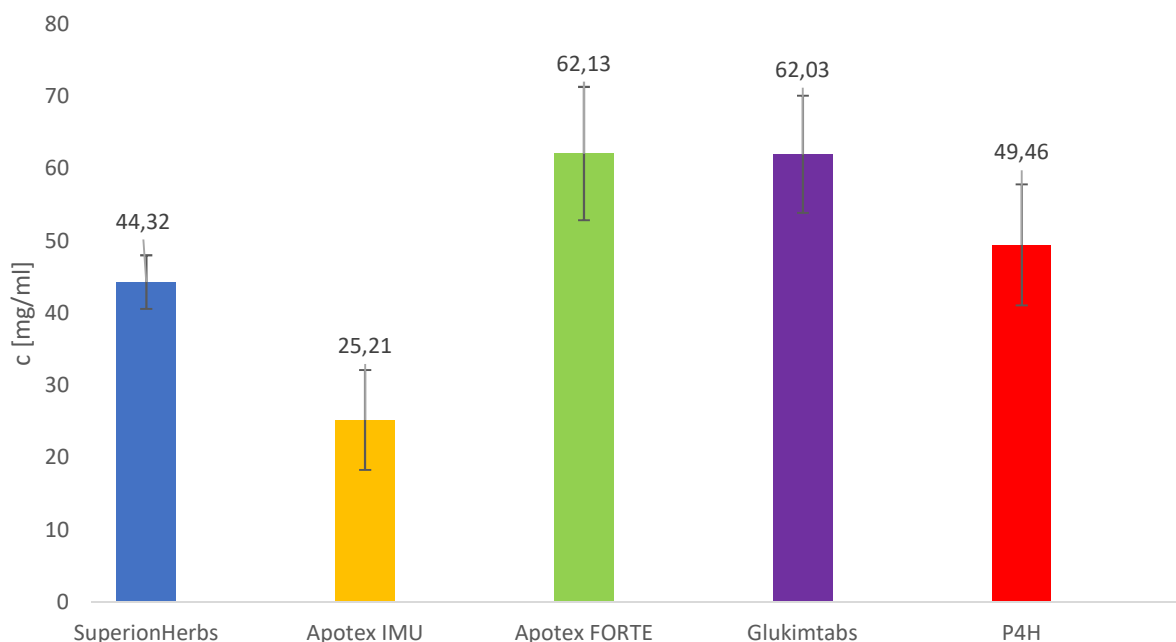


Graf 5: Obsah vitamínu C v extraktech

Největší koncentraci vitamínu C obsahuje přípravek Apotex Forte, naopak nejméně vitamínu C obsahoval přípravek Imunoglukan P4H. Studovány byly pouze výrobky, u kterých výrobce deklaroval přítomnost vitamínu C. U přípravku Apotex Forte výrobce uvádí přítomnost 80 mg vitamínu C v jedné tabletě, tj. 242 mg vitamínu C na 1 g obsahu tablety, u produktu Superionherbs poté 50 mg aceroly (zdroj vitamínu C, 25 %), tj. přibližně 26 mg vitamínu C na 1 g obsahu tablety.

5.6 Stanovení antioxidační aktivity

Byla stanovena antioxidační aktivita vzorků (viz. kap. 4.4.6). Použity byly vodné extrakty o koncentraci 0,1 g na 50 ml destilované vody. Vzorek byl proměřen třikrát a z průměru absorbancí s využitím kalibrační křivky (Příloha 9.1) byla vypočtena antioxidační aktivita v jednotlivých extraktech. Výsledná antioxidační aktivita je uvedena v mg/ml vzorku.



Graf 6: Antioxidační aktivita extraktů

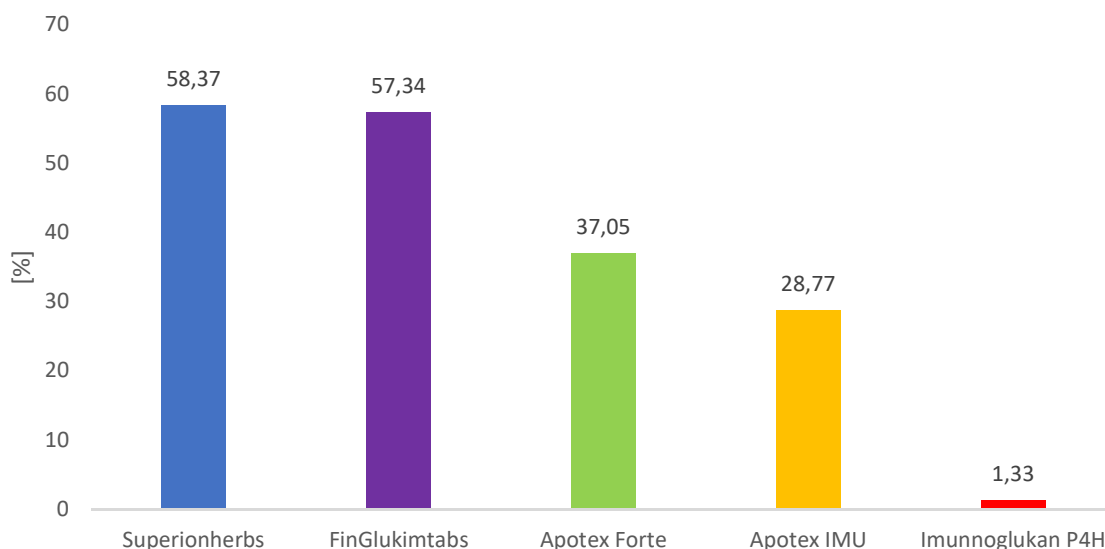
Z Graf 6 vidíme, že ze vzorků má největší antioxidační aktivitu přípravek od firmy Apotex Forte. Nejnižší antioxidační aktivitu naopak přípravek IMU od firmy Apotex. To je způsobeno přidavkem vitamínu C v přípravku FORTE, kdežto u přípravku IMU antioxidační aktivitu vykazují pouze glukany.

5.7 Stanovení obsahu α -glukanů, β -glukanů a celkových glukanů

Z rozdílů naměřených absorbancí pro α -glukany a celkové glukany bylo stanoveno množství β -glukanů pomocí certifikované metody od společnosti Megazyme. Vzorky byly nejprve hydrolyzovány a následně enzymaticky rozloženy. Hydrolýza a stanovení bylo provedeno podle postupu uvedeného u soupravy. Přiložen byl také způsob výpočtu množství α -glukanů, celkových glukanů a množství β -glukanů.

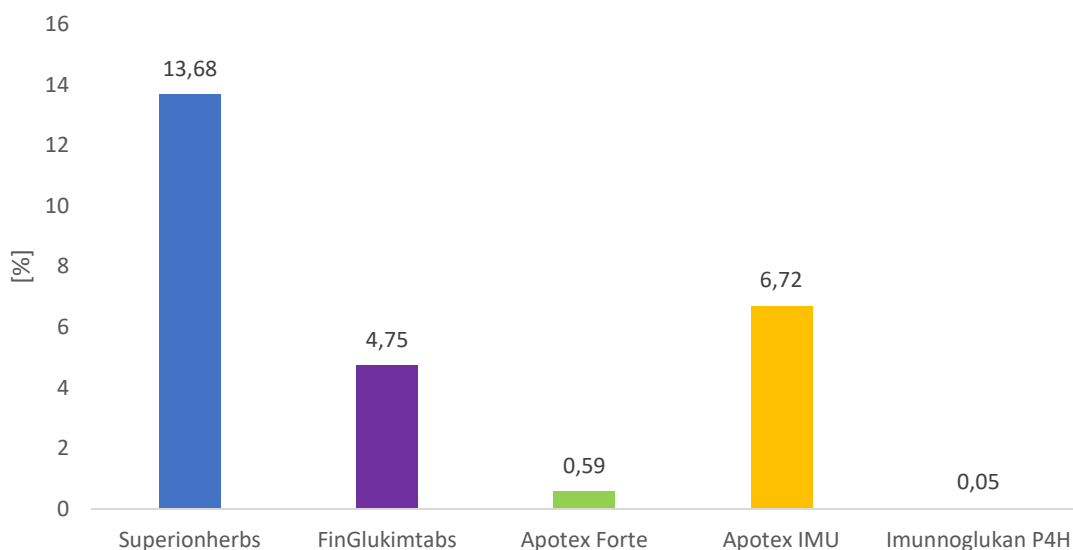
Tabulka 3: Vypočítané složení vzorků

Vzorky	Celkové glukany	α -glukany	β -glukany
	[%w/w]		
Superionherbs	58,37	13,68	44,70
FinGlukimtabs	57,34	4,75	52,59
Apotex Forte	37,05	0,59	36,46
Apotex IMU	28,77	6,72	22,05
Imunoglukan P4H	1,33	0,06	0,79



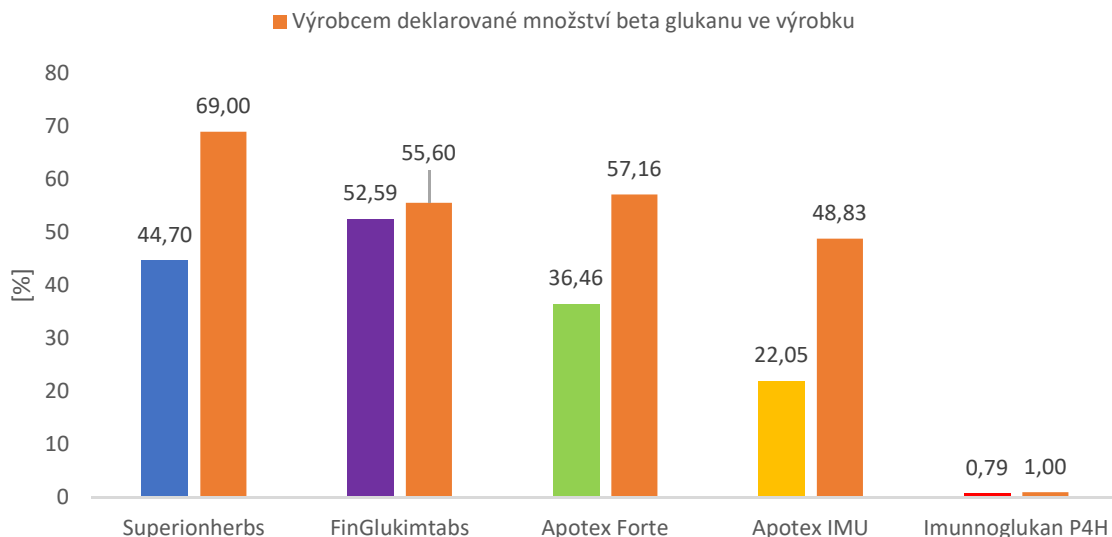
Graf 7: Celkový obsah glukanu

Graf 7 nám potvrzuje přítomnost glukanu ve všech stanovovaných vzorcích. Největší obsah, 58,37 % glukanu se nachází v produktu od firmy Superionherbs. Obsah glukanu je vyšší u produktů s obsahem *Saccharomyces cerevisiae*, kdežto u produktu Imunnoglukan P4H, který obsahuje glukany z hlívy ústříčné je obsah glukanu nejnižší.



Graf 8: Obsah α -glukanu ve vzorcích

Podle Graf 8 vidíme, že největší obsah α -glukanu se nachází v produktu od firmy Superionherbs, nejmenší obsah α -glukanu je naopak v přípravku Imunnoglukan P4H.



Graf 9: Obsah β-glukanů ve vzorcích

Podle Graf 9 vidíme, že největší obsah β -glukanů se nachází v produktu od firmy Apotex, konkrétně produktu Forte, nejmenší obsah α-glukanů je naopak v přípravku Imunoglukan P4H.

U přípravku Imunoglukan P4H může být důvodem nižších obsahů stanovovaných částí fakt, že se jedná o sirup, kde obsah stanovovaných látek v navažovaném množství byl nižší.

V Graf 9 je dále znázorněno deklarované množství β -glukanů ve výrobcích. Nejlépe z tohoto porovnání vychází výrobek Imunoglukan P4H a Finclub Glukimtabs. Naopak přípravky od firmy Apotex mají výrazně nižší procento β –glukanů, než výrobce uvádí.

5.8 Stanovení mastných kyselin

Mastné kyseliny byly stanoveny po převedení na methylestery podle postupu dle kapitoly 4.6.

Identifikace methyesterů byla provedena na základě porovnání s retenčními časy standardů. Data byla zpracována pomocí programu MS Excel.

Zastoupení jednotlivých mastných kyselin bylo vyjádřeno v mg/g vzorku, koncentrace jednotlivých mastných kyselin stanovujeme vztaženy na skutečnou navážku a objem. Výsledky jsou zpracovány v následujících tabulkách a grafech.

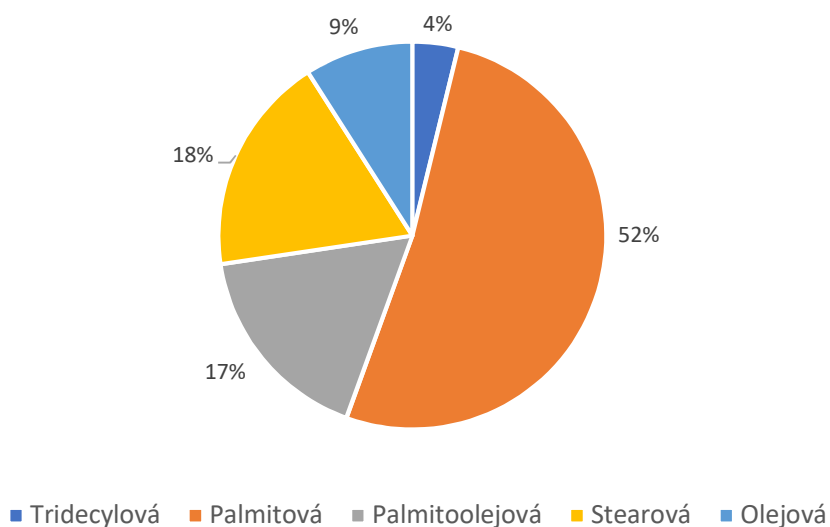
Tabulka 4: Obsah mastných kyselin v přípravku Superionherbs

Mátná kyselina	Vzorec	c [mg/g]
Tridecylová	C13:0	0,009
Palmitová	C16:0	0,124
Palmitoolejová	C16:1	0,041
Stearová	C18:0	0,044
Olejová	C18:1	0,022
Celkový obsah	-	0,240

V Tabulka 4 jsou uvedeny koncentrace mastných kyselin v extraktu přípravku Superionherbs. Celkově bylo identifikováno 5 mastných kyselin. Největší koncentraci měla

kyselina palmitová, která tvoří téměř polovinu všech mastných kyselin ve vzorku. Kyselina palmitová může sloužit kvasince jako zdroj energie.

Celková koncentrace mastných kyselin ve vzorku je 0,240 mg/g.



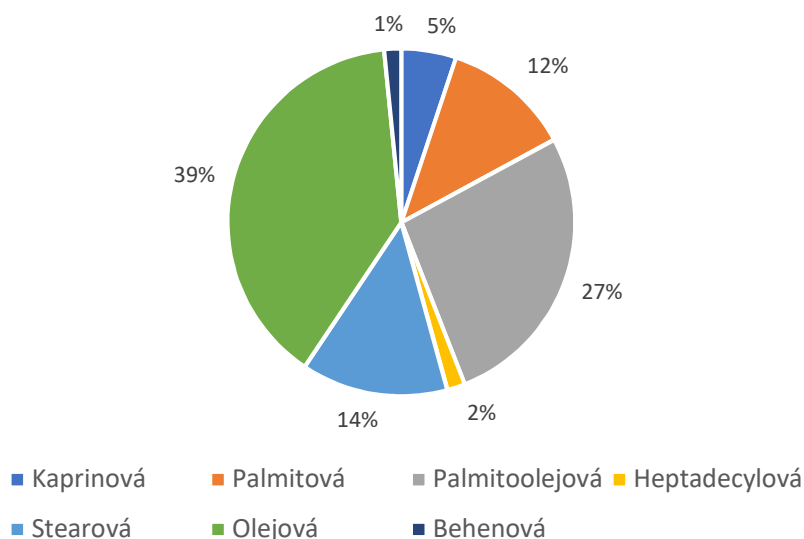
Graf 10: Zastoupení mastných kyselin v přípravku Superionherbs

Tabulka 5: Obsah mastných kyselin v přípravku Glukimtabs

Mastná kyselina	Vzorec	c [mg/g]
Kaprinová	C10:0	0,254
Palmitová	C16:0	0,595
Palmitoolejová	C16:1	1,337
Heptadecyllová	C17:1	0,084
Stearová	C18:0	0,678
Olejová	C18:1	1,936
Behenová	C22:0	0,079
Celkový obsah	-	4,963

V Tabulka 5 jsou uvedené mastné kyseliny obsažené ve vzorku Glukimtabs včetně jejich koncentrací. Identifikováno bylo celkem 7 mastných kyselin, kde nejvyšší koncentraci vykazují mastné kyseliny palmitoolejová a olejová.

Celkový obsah mastných kyselin ve vzorku je 4,963 mg/g.



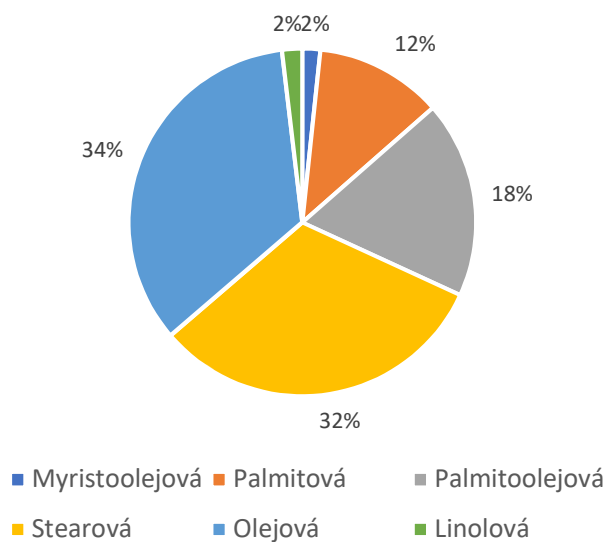
Graf 11: Zastoupení mastných kyselin v přípravku Glukimtabs

Tabulka 6: Obsah mastných kyselin v přípravku Apotex Forte

Mastná kyselina	Vzorec	c [mg/g]
Myristoolejová	C14:1	0,011
Palmitová	C16:0	0,080
Palmitoolejová	C16:1	0,123
Stearová	C18:0	0,215
Olejová	C18:1	0,233
Linolová	C18:2	0,013
Celkový obsah	-	0,676

V Tabulka 6 jsou uvedené mastné kyseliny obsažené ve vodném extraktu přípravku Apotex Forte, včetně jejich koncentrací. Ve vzorku se vyskytuje 6 různých mastných kyselin. Nejvyšší koncentraci mají mastné kyseliny stearová a olejová.

Celkový obsah mastných kyselin je 0,676 mg/g.

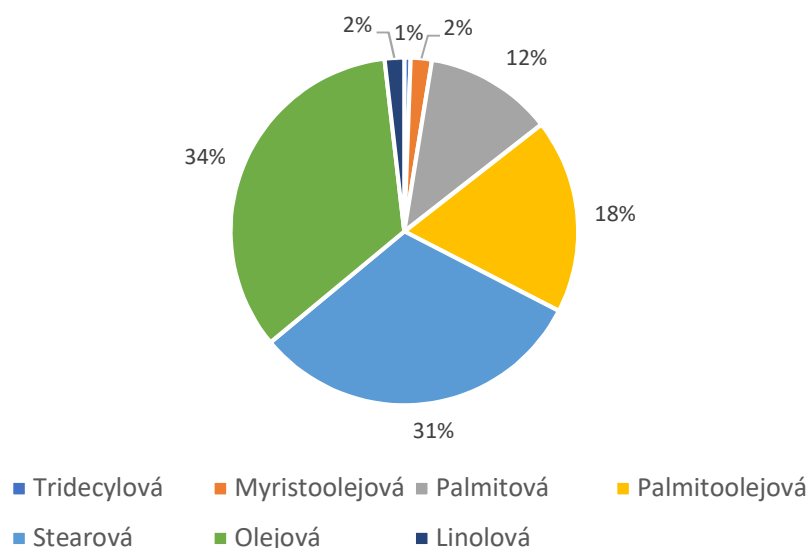


Graf 12: Zastoupení mastných kyselin v přípravku Apotex Forte

Tabulka 7: Obsah mastných kyselin v přípravku Apotex IMU

Mastná kyselina	Vzorec	c [mg/g]
Tridecyllová	C13:0	0,017
Myristoolejová	C14:1	0,055
Palmitová	C16:0	0,336
Palmitoolejová	C16:1	0,510
Stearová	C18:0	0,886
Olejová	C18:1	0,964
Linolová	C18:2	0,052
Celkový obsah	-	2,820

V Tabulka 7 jsou uvedené mastné kyseliny obsažené ve vodném extraktu přípravku Apotex IMU, včetně jejich koncentrací. Ve vzorku se vyskytuje celkem 7 druhů mastných kyselin. Nejvyšší koncentraci mají mastné kyseliny stearová (31 %) a olejová (34 %), Celkový obsah mastných kyselin ve vzorku je 2,820 mg/g.



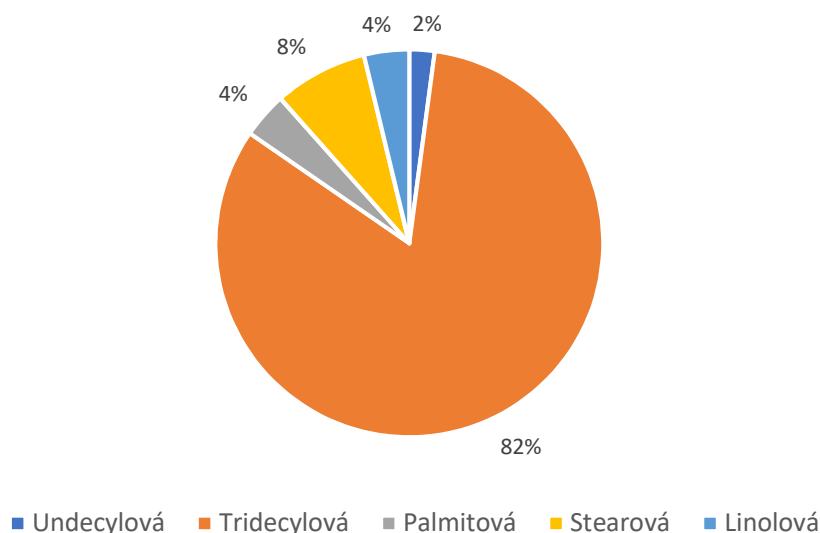
Graf 13: Zastoupení mastných kyselin v přípravku Apotex IMU

Tabulka 8: Obsah mastných kyselin v přípravku Immunoglukan P4H

Mastná kyselina	Vzorec	c [mg/g]
Undecylová	C11:0	0,001
Tridecylová	C13:0	0,020
Palmitová	C16:0	0,001
Stearová	C18:0	0,002
Linolová	C18:2	0,001
Celkový obsah	-	0,025

V Tabulka 8 jsou uvedené mastné kyseliny obsažené ve vodném extraktu přípravku Immunoglukan P4H, včetně jejich koncentrací. Ve vzorku se vyskytuje celkem 5 druhů mastných kyselin. Nejvyšší koncentraci má kyselina tridecylová (0,020 mg/g). Dále se zde nachází také kyselina linolová, která patří mezi esenciální mastné kyseliny zvané omega 6 mastné kyseliny.

Celkový obsah mastných kyselin ve vzorku je 0,025 mg/g.



Graf 14: Zastoupení mastných kyselin v přípravku Immunoglukan P4H

Největší zastoupení mastných kyselin má přípravek Glukimtabs, od firmy Fin a to 4,963 mg/g vzorku, což může být způsobeno větší přítomností reziduální kvasinkové biomasy, která ve své buňce obsahuje lipidy.

Vyjmá vzorku Immunoglukan P4H si byly jednotlivé vzorky složením mastných kyselin podobné. To je způsobeno tím, že mimo P4H všechny zbylé vzorky obsahují *Saccharomyces cerevisiae*, kdežto Immunoglukan P4H obsahuje jako zdroj mastných kyselin hlívu ústřičnou.

5.9 Antimikrobiální testy

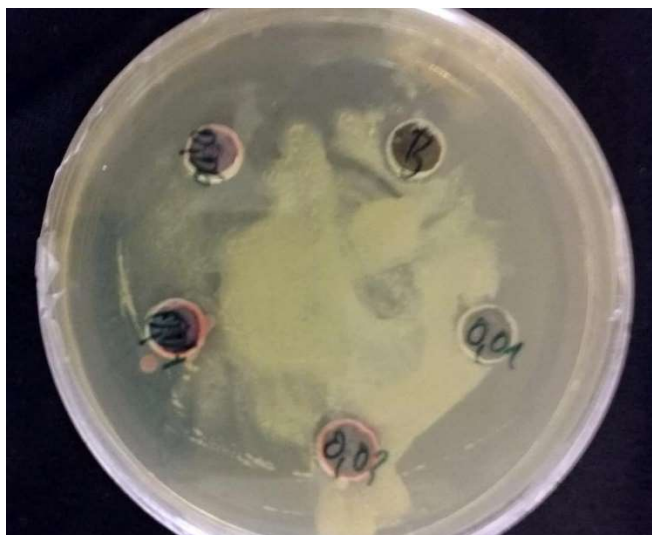
Antimikrobiální aktivita vodných extraktů proti *Micrococcus luteus* a *Serratia marcescens* byla testována pomocí agarósové difuzní metody. Extrakty byly porovnávány vůči blanku, tj. destilované vodě.

Test byl proveden pro dva vzorky s největší antioxidační aktivitou a o čtyřech různých koncentracích. Proti kmenu *Serratia marcescens* byly všechny extrakty neúčinné. Proti kmenu *Micrococcus luteus* došlo k utvoření inhibiční zóny kolem jamky v jednom případě.

U přípravku Apotex Forte o koncentraci 2 mg/ml byla naměřena inhibiční zóna přibližně 1 mm.

Zbylé vzorky neprojevily aktivitu vůči kmenům *Micrococcus luteus*, *Serrtia marcescens* a kvasince *Candida glabrata*. To může být způsobeno nízkou koncentrací glukanů v testovaných vzorcích, nevhodnou formou, či molekulovou hmotností glukanů, popř. změnou struktury glukanů v průběhu zpracování komerčního preparátu. Rovněž vybrané kmeny nemusely být dostatečně citlivé.

Chyba mohla nastat také při výběru testovaných vzorků, poněvadž antimikrobiální aktivita nemusí nutně souviset s antioxidační aktivitou extraktů.



Obrázek 18: Antimikrobiální test, Apotex Forte $c=1 \text{ mg/ml}$, inhibiční zóna 1mm

5.10 MTT testy

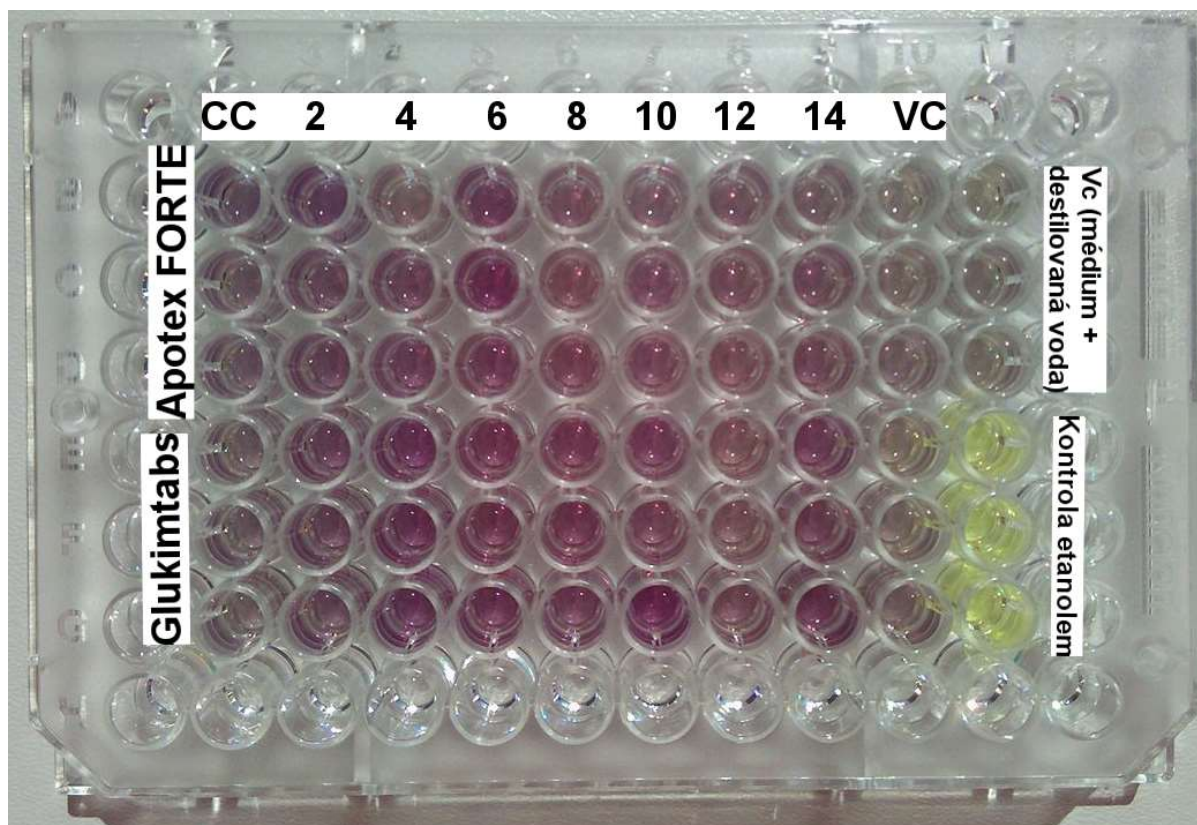
MTT test byl prováděn na 96 – jamkové destičce, podle postupu 4.8.2. Testovány byly extrakty přípravků Apotex Forte a Fin Glukimtabs. Testovány byly vodné extrakty, které měly nejvyšší antioxidační aktivitu. Jako blank byly použity neovlivněné buňky extraktem.

5.10.1 Testy viability pro buňky HaCaT

Tabulka 9: Parametry MTT testu

Buněčná kultura	HaCaT – imortalizované keratinocyty
Médium	DME/High Glucose
Buněčná hustota	$2,5 \cdot 10^4$ buněk/ml
Objem jamky [μl]	100
Čas expozice [hod]	24
Vlnová délka [nm]	540

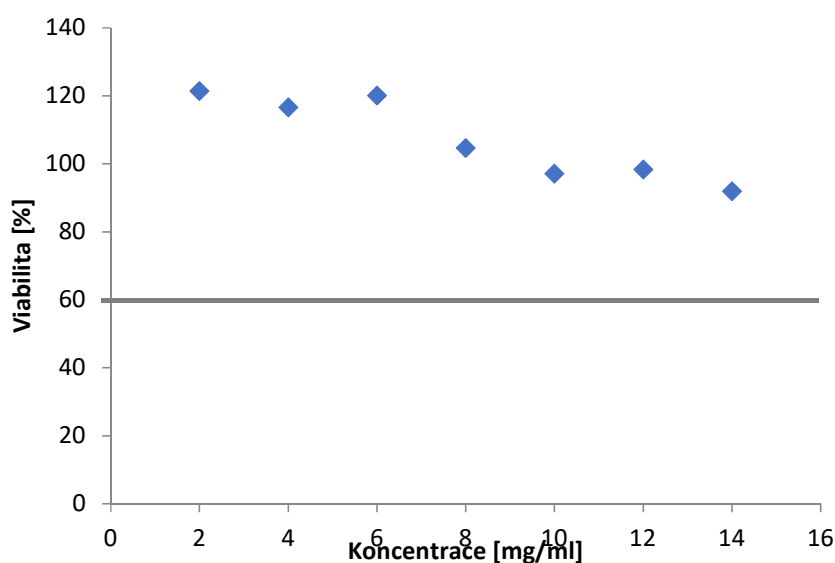
Stanovované vzorky nevykazovaly vůči HaCaT buňkám žádnou cytotoxicitu. Pozorování znázorňující výsledky testů toxicity buněk jsou uvedeny níže.



Obrázek 19: Test cytotoxicity na buňkách HaCaT

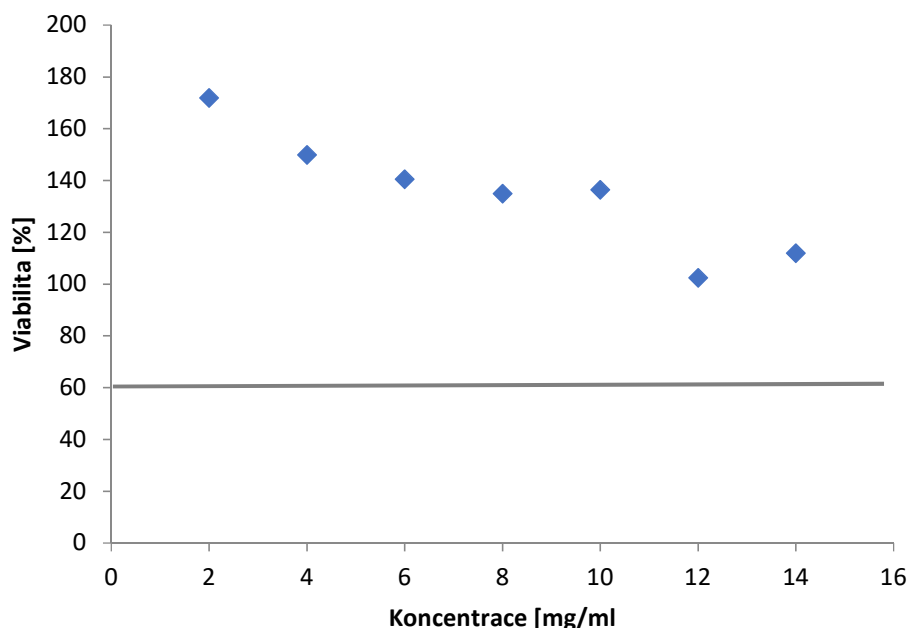
Z Obrázek 19 je zřejmé, že na počátku experimentu jsou buňky živé. Díky tomu, že buňky jsou ve vitální formě, dochází k redukci žlutého MTT na fialový formazanový derivát, který zůstává uvnitř buněk ve formě nerozpustných krystalů. Přidáním SDS došlo k rozpuštění krystalů a vzniku fialového roztoku, jenž proměřujeme pomocí ELISA readeru. Pomocí sloupce CC kontrolujeme pozitivní výsledek testu, kdy je přítomna 100% viabilita buněk.

Pozorujeme, že se zvyšující se koncentrací roztoku dochází k poklesu viability buněk u obou vzorků. Mezní hodnotou viability pro stanovení cytotoxicity, kdy vzorek nepovažujeme za cytotoxický, je hranice 60 %.



Graf 15: Viabilita buněk v závislosti na rostoucí koncentraci extraktu Apotex Forte

Z Graf 15 je vidět, že viabilita buněk u extraktu přípravku Apotex Forte klesá pozvolna. U žádné z testovaných koncentrací nedochází k poklesu viability pod hranici 60 %.



Graf 16: Viabilita buněk v závislosti na rostoucí koncentraci extraktu fin Glukimtabs

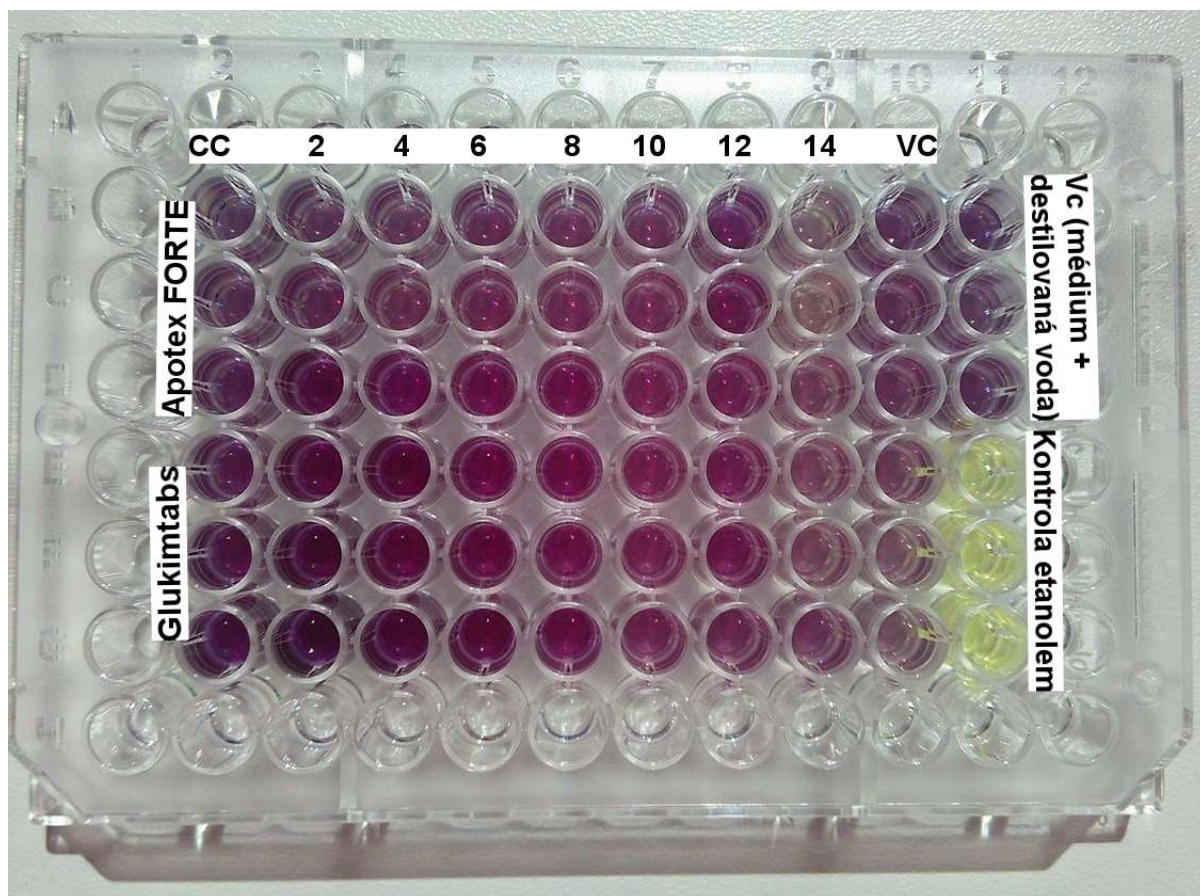
Z Graf 16 vidíme, že viabilita u přípravku Glukimtabs je podobná jako u přípravku Apotex Forte. Viabilita neklesá pod hranici 60 % u žádné z koncentrací. Nejnižší viabilitu vykazovala koncentrace 12 mg/ml.

5.10.2 Testy viability pro buněčnou linií B16F1

Tabulka 10: Parametry MTT testu na buňkách myšího melanomu

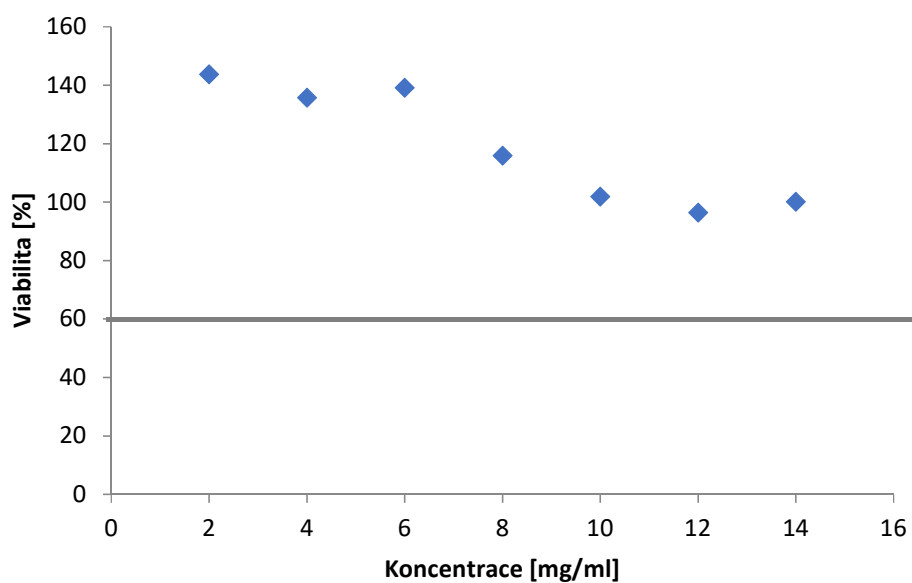
Buněčná kultura	B16F1
Médium	DME/High Glucose
Buněčná hustota	$2,5 \cdot 10^4$ buněk/ml
Objem jamky [μ l]	100
Čas expozice [hod]	24
Vlnová délka [nm]	540

Stanovované vzorky opět nevykazovaly žádnou cytotoxicitu při testovaných koncentracích. Pozorování znázorňující výsledky testů toxicity buněk jsou uvedeny níže.

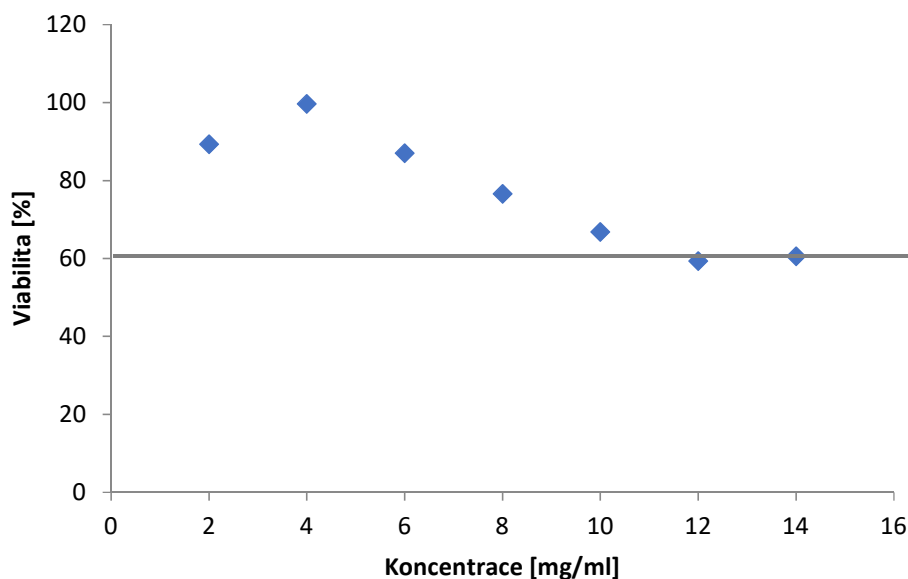


Obrázek 20: Test genotoxicity na buňkách B16F1

Na Obrázek 20 vidíme vizuální vyhodnocení MTT testu u melanomových buněk (B16F1). Vzorky byly použity stejné jako u testu na HaCaT buňkách. S rostoucí koncentrací extraktů se snižuje rovnoměrně viabilita buněk.



Graf 17: Viabilita buněk v závislosti na rostoucí koncentraci extraktu Apotex Forte



Graf 18: Viabilita buněk v závislosti na rostoucí koncentraci extraktu fin Glukimtabs

Na Graf 17 můžeme vidět, že u žádné z koncentrací nedochází k poklesu viability pod 60 %, tudíž extrakty přípravku Apotex Forte nejsou vůči melanomovým buňkám cytotoxické.

Na Graf 18 vidíme, že nejvyšší koncentrace extraktů přípravku Glukimtabs mají své hodnoty viability mírně pod 60 %, což značí, že při vyšších koncentracích by tento přípravek mohl vykazovat protinádorové účinky.

6 ZÁVĚR

Tato bakalářská práce byla zaměřena na stanovení obsahu vybraných látek v komerčně dostupných přípravcích s obsahem beta-glukanu. Mezi stanovované látky patří neutrální sacharidy, redukující sacharidy, obsah beta-glukanů, polyfenoly, proteiny, mastné kyseliny, vitamín C a celková antioxidační aktivita.

Beta-glukany jsou přírodní látky hojně se vyskytující v přírodě, obzvláště v řasách, houbách a kvasinkách, ale také ve vyšších rostlinách. V práci byly hlavně řešeny zdroje z hub a kvasinek.

V teoretické části byla vypracována krátká rešerše o beta-glukanech, jejich chemických vlastnostech, struktuře, zdrojích a využití. Ze zdrojů byly blíže popsány *Saccharomyces cerevisiae* a hlíva ústříčná, které byly použity v experimentální části. Teoretická část je ukončena stručným popisem použitých analytických metod stanovení.

Na začátku experimentální části byly z tobolek vzorků připraveny vodné extrakty, které byly poté využity pro jednotlivá stanovení. Takto připravené extrakty byly využity pro stanovení antioxidační aktivity, neutrálních sacharidů, redukujících sacharidů a proteinů. Pro stanovení polyfenolů bylo potřeba upravit poměry navážky a rozpouštědla. Při stanovení antioxidační aktivity bylo zjištěno, že největší antioxidační aktivity, 62,13 mg/ml extraktu, dosahuje výrobek Apotex FORTE a také výrobek Finclub Glukimtabs s antioxidační aktivitou 62,03 mg/ml extraktu.

Největší obsah neutrálních sacharidů byl naměřen u výrobku Finclub Glukimtabs, 21,01 mg/g vzorku, redukujících sacharidů měl největší obsah také produkt Glukimtabs s obsahem 663,17 mg/g vzorku. Produkt s největším obsahem proteinů, 10,90 mg/g vzorku byl Superionherbs Betaglukan MaxCell.

Obsah vitamínu C byl stanovován pro produkty Apotex Forte, Superionherbs a Imunoglukan P4H. Nejvyšší obsah, 17,86 mg/g vzorku obsahoval produkt Apotex FORTE. Obsah polyfenolů byl proveden pro všechny vzorky, největší obsah polyfenolů byl zjištěn u produktu Apotex FORTE, 183,70 g/ml extraktu.

Pomocí specifické enzymové soupravy „Yeast β -Glucan Assay Kit“ od firmy Megazyme byla provedena izolace glukanů. Nejprve došlo k hydrolýze vzorků kyselinou sírovou a následně byl proveden enzymatický rozklad. Pomocí spektrometru byly proměřeny absorbance alfa-glukanů a celkových glukanů. Z jejich rozdílů byl vypočítán obsah beta-glukanů. Nejvyšší obsah beta-glukanů byl stanoven u produktu Finclub Glukimtabs, 52,59 %. Vzorky byly porovnány s údaji uvedenými výrobcí. Nejnižší obsah beta-glukanů byl naměřen u produktu Imunoglukan P4H, 0,79 %.

Nejvyšší obsah celkových glukanů byl naměřen u produktů Superionherbs Betaglukan MaxCell (58,37 %) a Finclub Glukimtabs (57,34 %), nejnižší u Imunoglukan P4H (1,33 %).

Nejvyšší obsah alfa-glukanů byl naměřen u produktu Superionherbs Betaglukan MaxCell (13,676 %), nejnižší u produktu Apotex Forte (0,593 %) a Imunoglukan P4H (0,055 %).

Mastné kyseliny u sledovaných produktů byly stanoveny pomocí plynové chromatografie. U všech produktů se vyskytovala kyselina palmitová a stearová, které měly také většinou největší zastoupení. Největší obsah mastných kyselin, 4,963 mg/g vzorku, byl naměřen u přípravku Finclub Glukimtabs. Tento produkt obsahoval 52 % kyseliny olejové. Nejmenší obsah mastných kyselin byl nalezen u vzorku Imunoglukan P4H, 0,024 mg/g vzorku.

Dále byly provedeny antimikrobiální testy vůči *Serratia marcescens* (G- bakterie), *Micrococcus luteus* (G+ bakterie) a kvasince *Candida glabrata*. K testům byly použity dva ze vzorků, které měly nejvyšší antioxidační aktivitu, Apotex Forte a Finclub Glukimtabs. Antimikrobiální účinnost projevil pouze produkt Apotex Forte při koncentraci 1 mg/ml, a to vůči *Micrococcus luteus*, velikost inhibiční zóny byla 1 mm.

Posledním stanovením v této bakalářské práci bylo stanovení cytotoxicity. Cytotoxicita byla testována pomocí MTT testů. Pro testování byly opět vybrány produkty s nejvyšší antioxidační aktivitou. Produkty nebyly cytotoxické pro testovaný rozsah koncentrací, poněvadž nedošlo k poklesu viability HaCaT buněk pod 60 %. Viabilita klesala pozvolna s rostoucí koncentrací extraktu.

V případě buněčné kultury myšího melanomu (B16F1) testované vzorky rovněž nevykazovaly cytotoxicitu. Viabilita buněk s rostoucí koncentrací extraktu klesala, ale v rozsahu stanovovaných koncentrací nedošlo k poklesu viability pod 60 %. U produktu Apotex Forte došlo k přiblížení křivky k hranici 60 %, lze tedy předpokládat, že se zvyšující koncentrací by docházelo k úhynu melanomových buněk.

Závěrem lze shrnout, že analyzované preparáty beta-glukanů obsahují řadu aktivních látek pocházejících jak z biologického zdroje, případně nebo přidané v procesu zpracování preparátu. Z přírodního materiálu pochází kromě deklarovaných beta-glukanů proteiny, mastné kyseliny, některé fenolické látky a další sacharidy, zatímco vitamin C a větší množství polyfenolů pochází z přídatných látek. S ohledem na nulovou toxicitu a vysokou antioxidační aktivitu lze uvedené preparáty považovat za vhodný potravinový doplněk k prevenci zdraví.

7 ZDROJE

- [1] CHIHARA, G., HAMURO, J., MAEDA, Y., ARAI, Y, and FUKUOKA (1970). *Cancer Res.*, 30, 2776-2781
- [2] Co jsou to beta glukany? Doktorka.cz [online]. - : Vitamins Cosmetics, 2014 [cit. 2017-05-08]. Dostupné z: <http://zdravi.doktorka.cz/jsou-beta-glukany/>
- [3] ŠÍMA, Petr. Betaglukany - nadějně přírodní imunomodulační látky. *Ziva.avcr.cz*. 2012, 2012(-), 52-54.
- [4] HOLUBOVÁ, Jana. Biologicky aktivní látky Hlívy ústříčné. Zlín, 2007. Bakalářská práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně. Vedoucí práce Ing. Pavel Valášek, Csc.
- [5] VELÍŠEK, J.: *Chemie potravin 1*. OSSIS, 1.vydání. Tábor 1999, 352 str, ISBN 80-902391-3-7
- [6] ZEKOVIĆ, Djordje B , et al. Natural and Modified (1→3)- β -D-Glucans in Health Promotion and Disease Alleviation. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2005, roč. 25, č. 4, s. 205-231.
- [7] CHOVANCOVA, A., ŠTURDIK, E. Vplyv beta-glukanov na imunitny system človeka. In *Nova Biotechnologica V-1*. 2005, s. 105-121.
- [8] CHARALAMPOPOULOS, D., WANG, R., PANDIELLA, S. S., WEBB, C.: Application of cereals and cereal components in functional food: a review. *Int. J. Food Microbiol.*, 79, 2002, s. 131 – 141.
- [9] BOHN, J. A., BeMILLER, J. N.: (1-3)- β -D-Glucans as biological response modifiers: a review of structure-functional activity relationships. *Carbohydrate Polym.*, 28, 1995, s. 3 – 14.
- [10] KARÁCSONYI, Š., KUNIAK, L.: Polysaccharides of *Pleurotus ostreatus*: Isolation and structure of pleuran, an alkali-insoluble β -D-glucan. *Carbohydrate Polym.*, 24, 1994, s. 107 – 111.
- [11] CHANG, R.: Functional properties of edible mushrooms. *Nutr. Rev.*, 54, 1996, s. 91 – 93.
- [12] MCGOVERN, PE.; ZHANG, J.; TANG, J., et al. Fermented beverages of pre- and proto-historic China.. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Dec 2004, roč. 101, čís. 51, s. 17593-8. DOI:10.1073/pnas.0407921102. PMID 15590771
- [13] MÁROVÁ, Ivana a Dana VRÁNOVÁ. Praktikum z biochemie. Ústav chemie potravin a biotechnologií FCH VUT v Brně: Fakulta chemická VUT v Brně, 2002.
- [14] JABLONSKÝ, I., ERBAN, V. Houby k pochutnání ale i pro zdraví. *Výživa a potraviny*, 2005, roč. 60, č. 2, s. 45-47.
- [15] KLIS, Frans M., Pieternella MOL, Klaas HELLINGWERF a Stanley BRUL. Dynamics of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Reviews*. 2002, 26(3), 239-256. DOI: 10.1111/j.1574-6976.2002.tb00613.x. ISSN 1574-6976. Dostupné také z: <https://academic.oup.com/femsre/article-lookup/doi/10.1111/j.1574-6976.2002.tb00613.x>

- [16] KALINA, Tomáš a Jiří VÁŇA. Sinice, řasy, houby, mechorosty a podobné organismy v současné biologii. Vyd. 1. Praha: Karolinum, 2005, 606 s., 32 s. obr. příl. ISBN 978-80-246- 1036-8
- [17] Houby : česká encyklopedie : neobvyklá kniha o světě hub u nás i v cizině, praktická příručka houbaře pro určování, sběr, ochranu, pěstování a zpracování hub. 1. Praha: Reader's Digest Výběr, 2003. ISBN 80-86196-71-2.
- [18] MURTEY, Mogana Das a Patchamuthu RAMASAMY. Sample Preparations for Scanning Electron Microscopy – Life Sciences. 2016-02-18. DOI: 10.5772/61720. ISBN 10.5772/61720. Dostupné také z: <http://www.intechopen.com/books/modern-electron-microscopy-in-physical-and-life-sciences/sample-preparations-for-scanning-electron-microscopy-life-sciences>
- [19] <http://www.i-hlivausticna.cz/fotogalerie>
- [20] KALACH, Pavel. Funkční potraviny: kroky ke zdraví. České Budějovice: Dona, 2003. ISBN 80-732-2029-6.
- [21] BRAND-WILLIAMS, W., M.E. CUVELIER a C. BERSET. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. LWT - Food Science and Technology. 1995, 28(1), 25-30. DOI: 10.1016/S0023-6438(95)80008-5. ISSN 00236438. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0023643895800085>
- [22] NĚMCOVÁ, Irena, Petr RYCHLOVSKÝ a Ludmila ČERMÁKOVÁ. Spektrometrické analytické metody. Praha: Karolinum, 1998. ISBN 80-718-4365-2.
- [23] MCCLEAR, Barry V. a Malcolm GLENNIE-HOLMES. ENZYMIC QUANTIFICATION OF (1→3) (1→4)-β- D -GLUCAN IN BARLEY AND MALT. Journal of the Institute of Brewing. 1985, 91(5), 285-295. DOI: 10.1002/j.2050-0416.1985.tb04345.x. ISSN 00469750. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/j.2050-0416.1985.tb04345.x>
- [24] VOLKA, Karel. Analytická chemie. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 1995. ISBN 80-708-0227-8.
- [25] FISK, Helena L., Annette L. WEST, Caroline E. CHILDS, Graham C. BURDGE a Philip C. CALDER. The Use of Gas Chromatography to Analyze Compositional
- [26] Changes of Fatty Acids in Rat Liver Tissue during Pregnancy. DOI: 10.3791/51445. ISBN 10.3791/51445. Dostupné také z: <http://www.jove.com/video/51445/the-use-gas-chromatography-to-analyze-compositional-changes-fatty>
- [27] MIWA, Thomas K., Kenneth L. MIKOLAJCZAK, Fontaine R. EARLE a Ivan A. WOLFF. Gas chromatographic characterization of fatty acids. Identification constants for mono- and dicarboxylic methyl esters. DOI: 10.1021/ac50153a010. ISBN 10.1021/ac50153a010. Dostupné také z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ac50153a010>
- [28] KLOUDA, P. Moderní analytické metody. 2. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 2003, 132 s. ISBN 80-86369-07-2
- [29] SOMMER, L. Základy analytické chemie 2. 1. vyd. Brno: VUTIUM, 2000. 347 s. ISBN 80-214-1742-0.

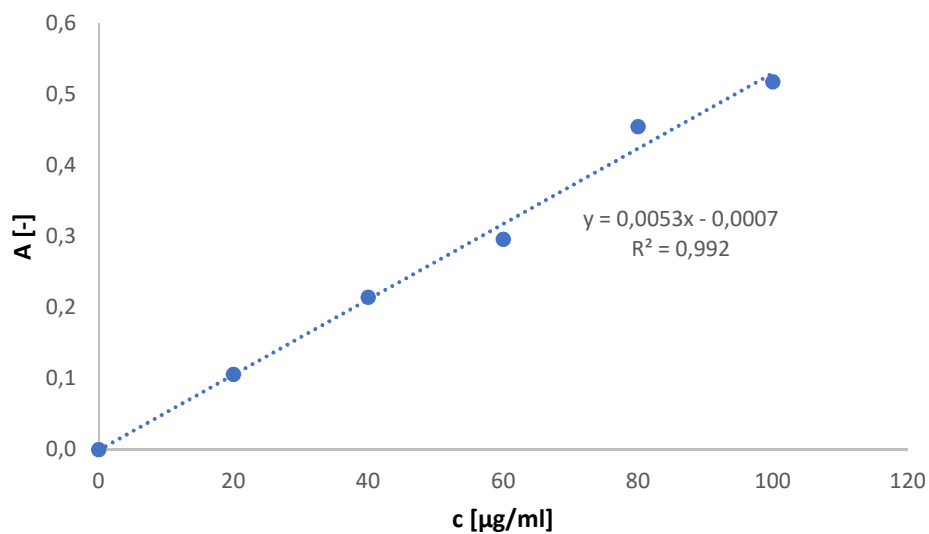
- [30] ŠTULÍK, Karel. Analytické separační metody. Praha: Karolinum, 2004. ISBN 80-246-0852-9.
- [31] Mobilní fáze : kapalina (kapalinová chromatografie) LC. In: Web.natur.cuni [online]. [cit. 2018-04-28]. Dostupné z: <https://web.natur.cuni.cz/~pcoufal/hplc.html>
- [32] Plynová chromatografie [online]. [cit. 2018-05-26]. Dostupné z: <http://slideplayer.cz/3648503/12/images/6/Sch%C3%A9ma+plynov%C3%A9ho+chromatografu.jpg>
- [33] Kultivace bakterií: Půdy, podmínky a metody. VETERINÁRNÍ A FARMACEUTICKÁ UNIVERZITA BRNO. Fakulta veterinárního lékařství: Mikrobiologie pro farmaceuty. ISBN 978-80-7305-676-6
- [34] TROGL. NÁVODY PRO CVIČENÍ Z MIKROBIOLOGIE. 2008. Dostupné z: <http://fzp.ujep.cz/~trogl/NavodyMikrobiologie.pdf>
- [35] JULÁK, Jaroslav. Úvod do lékařské bakteriologie. 1. vyd. Praha: Karolinum, 2006, 404 s. Učební texty Univerzity Karlovy v Praze. ISBN 80-246-1270-4.
- [36] HEJAZI, A. a F. R. FALKINER. *Serratia marcescens*. DOI: 10.1099/00222615-46-11-903. ISBN 10.1099/00222615-46-11-903. Dostupné také z: <http://jmm.microbiologyresearch.org/content/journal/jmm/10.1099/00222615-46-11-903>
- [37] *Micrococcus*: Pathogen safety data sheet - infectious substances. 2011. Public health agency of Canada [online]. [cit. 2018-04-30]. Dostupné z: <http://www.phacaspc.gc.ca/lab-bio/res/psds-ftss/micrococcus-eng.php>
- [38] BETHEA, E. K., B. J. CARVER, A. E. MONTEDONICO a T. B. REYNOLDS. The inositol regulon controls viability in *Candida glabrata*. DOI: 10.1099/mic.0.030072-0. ISBN 10.1099/mic.0.030072-0. Dostupné také z: <http://mic.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/mic.0.030072-0>
- [39] CARVER, Billy J. *Candida glabrata* -- 1600x [online]. In: . 2016-04-6 [cit. 2018-04-30]. Dostupné z: https://en.wikipedia.org/wiki/Candida_glabrata#/media/File:Glabrata.jpg
- [40] HERRIMAN, Robert. *Serratia marcescens* [online]. In: . 2017-02-01 [cit. 2018-04-30]. Dostupné z: <http://outbreaknewstoday.com/spain-serratia-marcescens-outbreak-prompts-closure-icu-99358/>
- [41] NĚMENC, CSC., Doc. RNDr. Miroslav, RNDr. Ludmila KOTOUČKOVÁ, PHD. a RNDr. Zdena PÁČOVÁ. *Micrococcus luteus* [online]. In: . [cit. 2018-05-03]. Dostupné z: <http://old.vscht.cz/obsah/fakulty/fpbt/ostatni/miniatlas/micr.htm>
- [42] BEDNÁŘ, Marek. Lékařská mikrobiologie: bakteriologie, virologie, parazitologie. Praha: Marvil, 1996. ISBN 859-4-315-0528-0.
- [43] ScienceCell Research Laboratories [online]. CA, 2016 [cit. 2018-05-15]
- [44] Základy toxikologie: Prof. RNDr. Jiří Patočka, DrSc. Toxikology.cz [online]. České Budějovice: Zdravotně sociální fakulta, Jihočeská univerzita, 2005 [cit. 2018-05-15]. Dostupné z: <http://www.toxicology.cz/modules.php?name=News&file=print&sid=10>

8 SEZNAM ZKRATEK

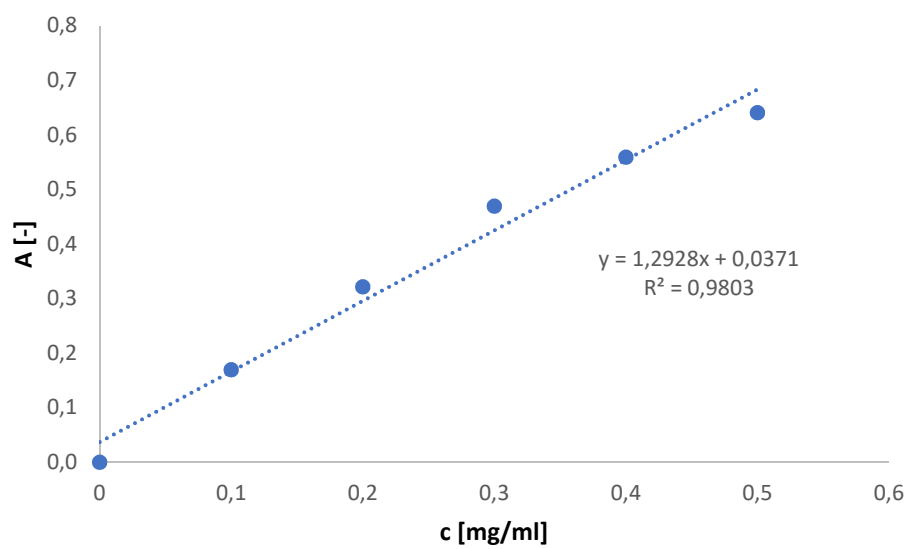
A	absorbance
λ	vlnová délka
m	hmotnost
V	objem
t	teplota
ABTS ⁺	2,29-azinobis-(3- etylbenzotiazolin-6-sulfonová kyselina)
nm	nanometr
GC	plynová chromatografie
FID	plamenově ionizační detektor
UV	oblast – ultra fialová oblast
MIC	minimální inhibiční koncentrace
TEAC	Trolox Equivalent Antioxidant Capacity
MTT	3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyltetrazolium bromid)
SDS	dodecylsírán sodný
MK	mastné kyseliny

9 PŘÍLOHY

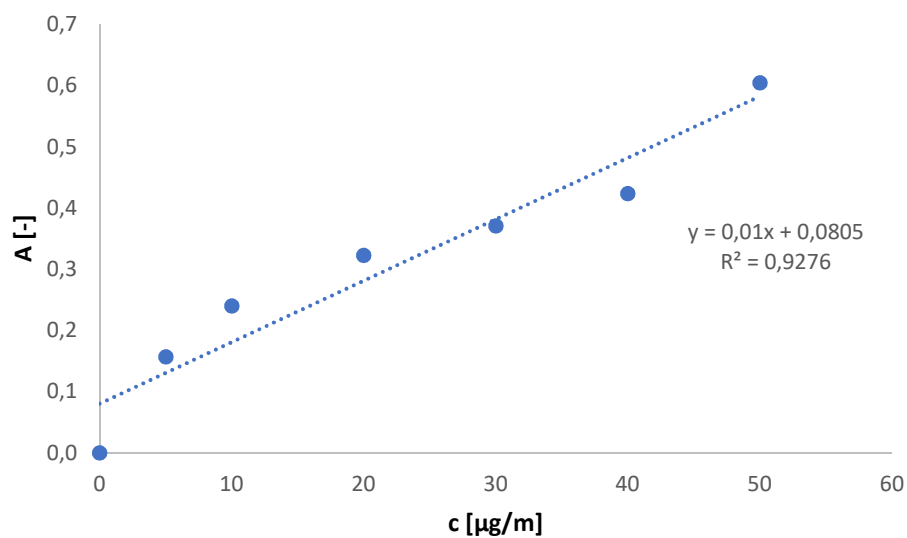
9.1 Příloha 1: Kalibrační křivky



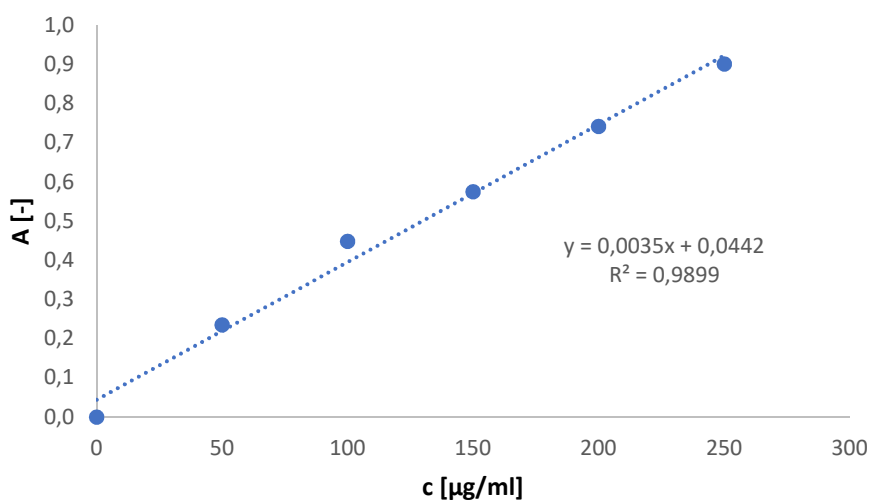
Kalibrační křivka – stanovení celkových sacharidů dle Duboise



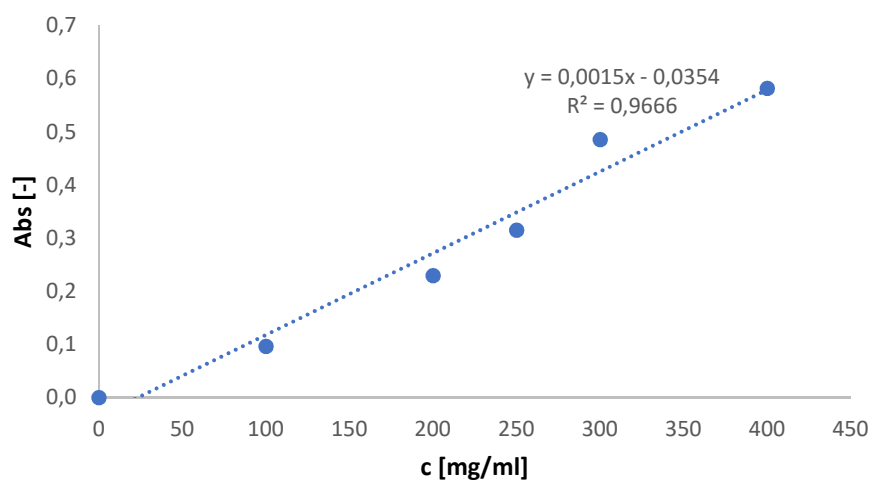
Kalibrační křivka – stanovení polyfenolů



Kalibrační křivka – stanovení redukujících cukrů metodou dle Somogyi-Nelsona



Kalibrační křivka – stanovení celkových proteinů dle Lowryho

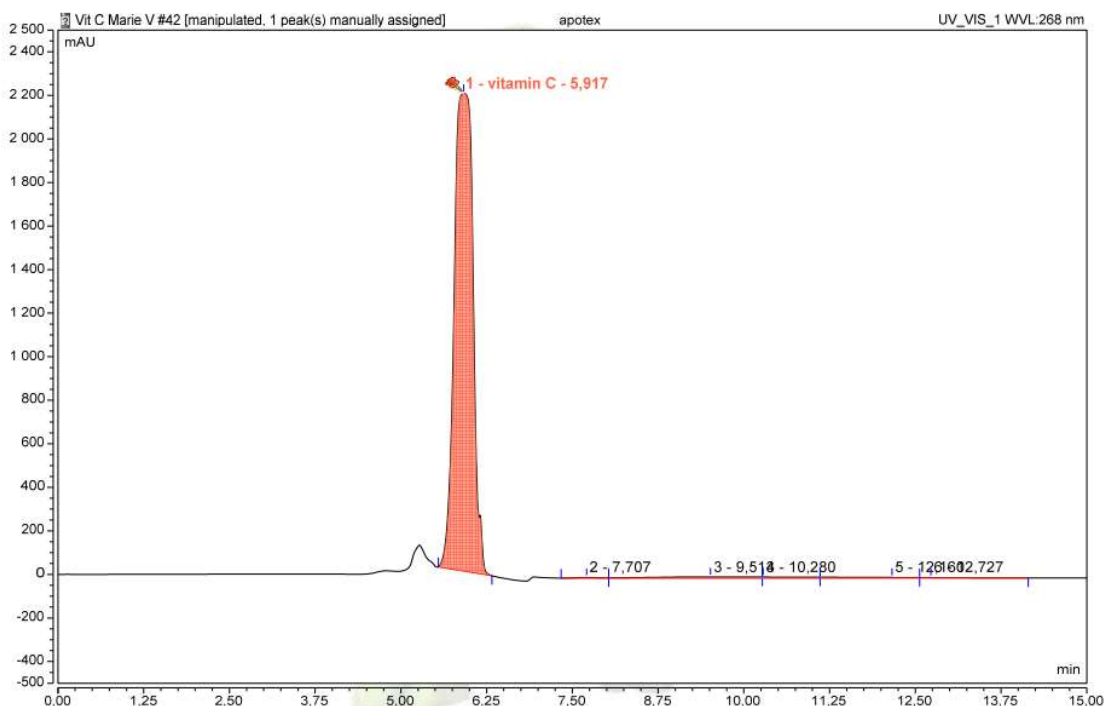


Kalibrační křivka – stanovení celkové antioxidační aktivity metodou TEAC

9.2 Příloha 2: Chromtogram HPLC stanovení vitamínu C

Sequence: Vit C Marie V
Injection #42: apotex

Chromatogram



Chromeleon 7,
Version 7.2.0.3765, Thermo Fisher Scientific

Page 1 of 1

Printed by Ultralum
26.03.18 15:11

HPLC chromatogram pro stanovení obsahu vitamínu C