

**JIHOČESKÁ UNIVERZITA
V ČESKÝCH BUĎĚJOVICÍCH
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA**

DISERTAČNÍ PRÁCE

**β -glukany a možnosti využití jejich fyziologických účinků při
výrobě funkčních potravin**

Ing. Šárka Silovská

2011

Školitel: prof. Ing. Ladislav Kolář, DrSc.
Školitel specialista: prof. Ing. Stanislav Kužel, CSc.

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Zemědělská fakulta
Katedra aplikovaných rostlinných biotechnologií

Ráda bych poděkovala vedoucímu disertační práce **prof. Ing. Ladislavu KOLÁŘOVI, DrSc.**, za pomoc a cenné rady, které mi poskytoval v průběhu doktorandského studia a při řešení této práce.

Dále bych ráda poděkovala **prof. Ing. Stanislavu KUŽELOVI, CSc.**, za pomoc a rady, které mi poskytl při řešení této práce.

Prohlašuji, že jsem disertační práci vypracovala samostatně na základě vlastních zjištění a za pomoci uvedené literatury.

.....

V Českých Budějovicích dne

ABSTRAKT

Byl vypracován způsob koncentrace houbového β -glukanu (pleuranu) z procesní kapaliny sorpčním postupem, postup izolace houbových a obilních β -glukanů extrakční a rozpouštěcí technologií a výroba bílkovino- β -glukanového koncentrátu v technologii komplexního bezodpadového zpracování zrna ječmene. Byl navržen způsob výroby potravního doplňku a výrobku z kategorie funkčních potravin z tohoto nového produktu. Byla navržena levná viskozimetrická provozní metoda ke kontrole molekulové hmotnosti izolovaných β -glukanů. Byla ověřena míra degradace molekulové hmotnosti β -glukanů při kuchyňském zpracování a potravinářských technologiích v produktu z biorafinerie bílkovino- β -glukanového koncentrátu.

KLÍČOVÁ SLOVA

β -glukany houbové; β -glukany obilné; izolace; molekulová hmotnost; degradace zpracovatelskými technologiemi; potravní doplněk; funkční potravina.

ABSTRACT

The way of concentration of fungal β -glucan from processional liquid with sorptive process, and the method of isolation of fungal and cereal β -glucans with extraction and dissolving technology was worked up. The production of protein- β -glucan extract in technology of complex wasteless processing of barley corns was worked up. The way of production dietary supplement and product from functional food category from this new product was suggested. The low-cost functional viscosimetric method to control molecular weight of isolated β -glucans was suggested. The measure of molecular weight degradation during cooking processes and food-technology in product from biorafinery protein- β -glucan extract was verified.

KEY WORDS

fungal β -glucans; cereal β -glucans; isolation; molecular weight; degradation with technological processes; dietary supplement; functional food.

OBSAH

1. ÚVOD.....	7
2. LITERÁRNÍ PŘEHLED.....	11
2.1. Izolace β -glukanů.....	11
2.1.1. Zhodnocení první části literárního přehledu.....	12
2.2. Relativní molekulová hmotnost β -glukanů.....	15
2.2.1. Zhodnocení druhé části literárního přehledu.....	15
2.3. Změny β -glukanů ve výrobcích při technologických operacích.....	16
2.3.1. Zhodnocení třetí části literárního přehledu.....	16
3. CÍL PRÁCE.....	19
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	20
4.1. Pleuran z hlívy ústříčné (<i>Pleurotus ostreatus</i>) a možnosti jeho koncentrace pro výrobu funkčních potravin.....	20
4.2. Výroba surového β -glukanu z plodnic houby hlívy ústříčné (<i>Pleurotus ostreatus</i>) nebo ze substrátu po pěstování hlívy ústříčné.....	26
4.3. Potravní doplněk s obilnými a houbovými β -glukany a arabinoxylany a výrobek stejného charakteru z kategorie funkčních potravin.....	29
4.4. Stanovení molekulové hmotnosti β -glukanů viskozimetrem dle Ubellohde.....	43
4.5. Ječmenová biorafinerie s výrobou bílkovino- β -glukanového koncentráту k výrobě funkčních potravin, kvasničné bílkoviny, bioetanolu a krmiva pro skot a drůbež.....	55
4.6. Degradace β -glukanu technologickými operacemi.....	62
5. DISKUSE.....	66
6. ZÁVĚR.....	75
7. LITERATURA.....	77
8. POUŽITÉ SYMBOLY A ZKRATKY.....	88
9. PŘÍLOHY.....	89
9.1. Seznam publikovaných prací.....	89
9.2. Separáty publikovaných prací.....	91

1. ÚVOD

Tuto úvodní kapitolu zařazuji jen proto, abych zde pro laskavého čtenáře mé disertační práce, který je odborníkem v jiném oboru, odlišném od vlastního tématu práce, usnadnila orientaci. Funkční potraviny a β -glukany dnes budí zájem u odborníků v oblasti ekonomické, léčitelské, podnikatelské a mnoha dalších. Samozřejmě že nepodceňuji jejich vzdělání, ale je logické, že problém β -glukanů je pro ně sice zajímavý, ale z hlediska jejich profese přece jen okrajový a proto jim ušetří čas i námahu, získají-li zde základní informace.

Odborníky z oboru, tedy potravinářské chemiky, biochemiky, zemědělce, lékaře a farmaceuty prosím o shovívavost při čtení tohoto úvodního textu a prosím je, aby úvod nepovažovali za začátek mé disertační práce. Opravdu netrpím vysvětlovací mánií, i když jako učitel k ní nemám daleko.

Závěrem tohoto úvodu bych chtěla poděkovat všem, kteří mé disertační práci věnovali pozornost a projevíli o ni zájem. Tento zájem je pro mne odměnou za práci, která opravdu nebyla lehká.

Můj dík patří mým školitelům, kteří se mi plně věnovali a přispěli výrazně ke zdaru celého díla a také celé mé rodině, manželovi a dvěma dcerkám, kteří trpělivě snášeli skutečnost, že po určitou dobu musí být až na druhém místě mého zájmu. Všem upřímně děkuji.

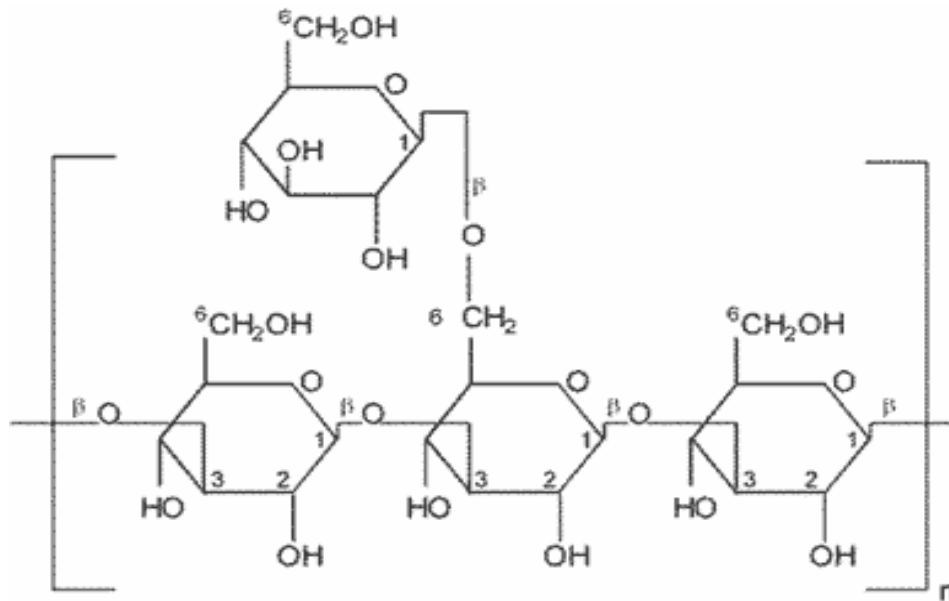
β -glukany jsou polysacharidy se smíšenými vazbami (jejich dřívější název byl licheniny), označují se také β -(1 \rightarrow 3),(1 \rightarrow 4)-D-glukany, vyskytují se hlavně v semenech některých obilovin, hlavně v ječmeni a ovsu. Příbuzné polymery se stejným názvem „ β -glukany“, syntetizují vyšší houby, plísně a kvasinky. Jejich vnitřní struktura je však přece jen trochu odlišná. Jsou to β -(1 \rightarrow 3),(1 \rightarrow 6)-D-glukany.

Ale i obilné glukany se nepatrně liší: Pro oves je typický β -(1 \rightarrow 3),(1 \rightarrow 4)-D-glukan (v ovesných otrubách je ve značném množství a nazývá se „ovesná guma“). Pro ječmen jsou typické β -glukany s dvěma nebo více sousedícími (1 \rightarrow 4) vazbami.

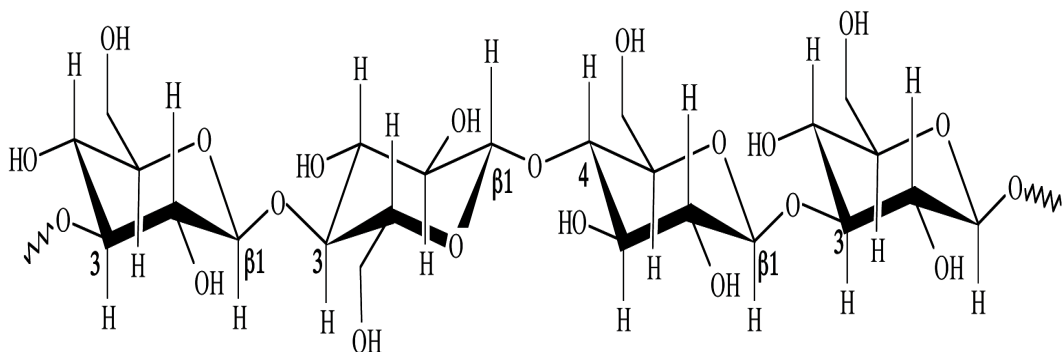
Rozpustnost β -glukanů ve vodě závisí především na jejich struktuře. Čím více je v molekule vazeb (1 \rightarrow 4), tím nižší je rozpustnost polymerů. Nejvíce rozpustné jsou polymery s obsahem zhruba 30 % vazeb (1 \rightarrow 3) a 70 % vazeb (1 \rightarrow 4), jejichž řetězec je složen z 2-3 jednotek β -D-glukózy spojených vazbami (1 \rightarrow 4), mezi

nimiž se nachází jednotka vázaná vazbou (1→3). Je to zřejmé ze základní struktury β -glukanu (viz. obrázek č. 1 a obrázek č. 2).

Obrázek č. 1: **Základní molekulární vzorec houbového beta glukanu (KIDD 2000).**



Obrázek č. 2: **Chemická struktura ovesného beta-glukanu ukazující strukturu beta 1,4 a beta 1,3 glykosidické vazby (PILLAI 2003).**



β -glukany podléhají celkem snadno enzymové degradaci endo- β -(1 \rightarrow 3),(1 \rightarrow 4)-glukanásou, také endo- β -(1 \rightarrow 3)-glukanásou a β -glukosidásou (laminarinasou). Toto se využívá ve výrobě piva, kde β -glukany jsou ve sladu velmi nežádoucí. Působí totiž jako polymery vyšší viskozitu a tím horší filtrovatelnost sladiny i mladiny a dokonce i zákal hotového piva. Proto při rmutování (při výrobě sladiny) nesmí překročit rmutovací teplota 70 °C, aby tyto enzymy nebyly inaktivovány.

Obilné β -glukany mají prokázané tyto významné fyziologické účinky:

1. Snižují obsah glukózy v krvi
2. Snižují hladinu celkového a LDL cholesterolu, při tom hladinu „příznivého“ HDL cholesterolu neovlivňují.

Jsou tedy perspektivní pro výrobu funkčních potravin pro nemocné s cukrovkou a s poruchami lipidového metabolismu.

U zvířat bylo navíc prokázáno, že jsou antinutričním faktorem, který brání využití živin z krmiv. U lidí tyto pokusy uzavřeny vědeckými pokusy nebyly, ale je zde naděje, že by β -glukany mohly sloužit i v boji proti významné civilizační chorobě – obezitě.

Až do nedávné doby se považovalo za prokázané, že na rozdíl od β -glukanů obilninových β -glukany hub, kvasinek a plísní mají další významnou vlastnost – chránit jedince před vznikem nádorového bujení. Posilují imunitní systém a inhibují růst nádorů. Tato jejich aktivita závisí na molekulové hmotnosti, četnosti větvení a konformaci vazeb. Nejvyšší protinádorovou účinnost mají β -D-glukany se stupněm větvení 0,20-0,33 a vyšší relativní molekulovou hmotností (100-200 kDa), některé tyto β -glukany, např. lentinan z houby houževnatec jedlý (*Lentinus edodes*) nebo schizophyllan z klánolístky obecné (*Schizophyllum commune*) se úspěšně zkouší v USA při léčbě nádorových onemocnění. Jejich stupeň větvení je 0,23-0,33 a je proto zajímavé, že i pleuran, β -glukan z hlívy ústřičné (*Pleurotus ostreatus*) se stupněm větvení 0,25, je protinádorově perspektivní.

V poslední době však byla teorie, že protinádorová aktivita β -glukanů patří jen houbovým β -glukanům, zcela vyvrácena s tím, že různě silnou aktivitu tohoto typu mají i β -glukany ječmene a ovsá. Bohužel, tyto účinky jsou velmi nestandardní a množství a fyziologická účinnost obilných β -glukanů závisí nejen na obilnině, na jejím druhu a odrůdě, ale dokonce na klimatu, agrotechnice, půdních podmínkách a dalších faktorech - snad nejméně na výživě a hnojení.

Problém je také v tom, že minimální denní dávka pro dospělého člověka je z hlediska možné fyziologické účinnosti dosti vysoká: průměrně by neměla být nižší než 3 g za den.

Ve své disertační práci jsem se nejdříve zabývala β -glukany houbovými, spolu se svými školiteli jsem se snažila o technicky schůdnou a provozně levnou izolaci β -glukanu (pleuranu) z plodnic v ČR pěstované hlívy ústříčné. Výroba ale byla pro praxi stále velmi drahá, protože β -glukanů je v hlívě ústříčné asi 50x méně než v ječmeni či ovsu. Proto jsme se snažili získat pleuran ze substrátu pro pěstování hlívy, který je zcela prorostlý myceliem houby. Bohužel, současně s pleuranem jsme získali velké množství polymerních arabinoxylanů, které také tvoří velmi viskózní roztoky, stejně jako β -glukany ovlivňující využití živin v tenkém střevě člověka, viskozita roztoků by mohla působit podobně jako viskozita β -glukanů, která je podle literatury úměrná jejich účinku snižovat hladinu glukózy v krevním řečišti. Zatím ale žádná vědecká práce shodnost účinků β -glukanů a arabinoxylanů neprokázala.

Další část mé práce je věnována obilným β -glukanům, kterým jsem se věnovala po uveřejnění zpráv, že obilné β -glukany mají stejný účinek jako houbové β -glukany v léčbě a prevenci nádorových bujení.

Svoji práci, která je velmi různorodá v důsledku dvou různých surovin, obilí a zdrojů houbových β -glukanů, jsem pro přehlednost rozdělila do několika samostatných kapitol, z nichž každá má svůj vlastní literární přehled, svoji metodiku, výsledky a diskuzi. Jen seznam literatury je společný. Snad laskavý čtenář ocení tuto troufalou inovační novinku, v případě, že vzbudí odpor, slibuji, že se příště žádné inovace už nedopustím.

2. LITERÁRNÍ PŘEHLED

β -glukany hub, plísní a kvasinek v pojetí obecné informace jsem zpracovala jako písemnou práci k Státní doktorské zkoušce (SILOVSKÁ 2007). Zde se tedy budu zabývat už jen β -glukany ječmene a ovsu.

Vzhledem k fyziologickým účinkům β -glukanů na lidský organismus a k možnostem jejich komerčního využití v průmyslové výrobě účinných i neúčinných výrobků v kategorii „potravinové doplňky“ (kde není průkaz v skutečně léčebných účinků preparátu vědeckými pokusy vyžadován) je vědecká i odborná literatura literárními prameny doslova zaplavena. Je tedy nutno pro rešerši v dané oblasti zvolit poměrně úzké specifické požadavky a k literárním pramenům přistupovat velice kriticky, má-li mít provedená rešerše nějakou praktickou cenu. Vzhledem k cíli mé práce, kterým má být relativně levný způsob izolace β -glukanů ze základní suroviny (hlíva ústříčná, oves, ječmen), stanovení relativní molekulové hmotnosti izolátu a popis změn, ke kterým dochází při kuchyňských a technologických operacích ve výrobcích, obohacených β -glukany (funkční potraviny), orientovala jsem literární přehled do těchto tří kategorií:

1. Izolace β -glukanů.
2. Relativní molekulová hmotnost β -glukanů.
3. Změny β -glukanů ve výrobcích při technologických operacích.

2.1. Izolace β – glukanů

Izolace β -glukanů je jedním z nejfrekventovanějších odkazů v literatuře a počet jednotlivých způsobů, forem a variet izolace z ječmene a ovsu je udivující. Opravdu významně přispěli k řešení tohoto problému včetně popisu fyzikálních vlastností produktu (PRECCE, HOBKIRK 1954; PREECE, MACKENZIE 1952; WOOD 1977, 1984, 1986; WOOD et al. 1978, 1989, 1990; AUTIO et al. 1987, 1992; DAWKINS, NNANNA 1993, 1995; BHATTY 1993, 1995, 1999; HENRY 1988; FARAJ et al. 2006; SYMONS, BRENNAN 2004; TEJINDER et al. 2000, 2003; BURKUS, TEMELLI 1998; TEMELLI 1997; NNANNA, GUPTA 1996; BEER et al. 1996; TOSH et al. 2002, 2004.

S izolací je řešená samozřejmě i analytika β -glukanů (DUBOIS et al. 1956; KARKALAS 1985; MC CLEARY, GLENIE-HOLMES 1985; WOOD, WEISZ 1984; AUTIO et al. 1987, 1992; CARR 1990; WOOD 1977, 1984).

Izolace β -glukanů je často spojována s vlivem na fyziologické účinky produktu (LUND et al. 1989; NOVÁK 2007; LAZARIDOU et al. 2007; BRENNAN, CLEARY 2005; HARALDSSOU et al. 2005; WOOD 1989).

Izolaci β -glukanů a význam genotypu obilniny řeší (WELCH et al. 1989; VASANTHAN, BHATTY 1995; BHATTY, ROSSNAGEL 1998; BHATTY et al. 1991; AMAN et al. 2010; SHEWRY et al. 2010; ANDERSSON et al. 2003, 2008; AJITHKUMAR et al. 2005).

Vztah arabinoxylanů a β -glukanů řeší (ANDERSSON, AMAN 2005; ROUBROEKS et al. 2000).

2.1.1. Zhodnocení první části literárního přehledu

Ze záplavy literárních odkazů je zcela zřejmé, že původní, pilířové práce věhlasných autorů, které obsahují skutečně nové poznatky, tvoří jen minimální podíl celkem publikovaných prací. Je zcela markantní, že většina prací vychází ze základních poznatků předních badatelů v tomto oboru a modifikuje je podle různých, často mimořádných podmínek svých experimentů. Zdá se, že je to výsledek dnes snad už celosvětové touhy za publikacemi, které se stávají jediným měřítkem aktivity výzkumné práce a věc kvality a novosti získaných poznatků je věcí už dosti podružnou.

V podstatě lze celou první část literárního přehledu zobecnit takto: Izolace β -glukanů z výchozího materiálu se dnes provádí v podstatě jen dvěma cestami: První bychom mohli označit jako extrakční. β -glukany se izolují ze základní suroviny buď horkou vodou nebo alkalickými roztoky, z extraktu se oddělí škrob, potom bílkoviny a ze zbytku se β -glukany vyloučí precipitací propanolem nebo etanolem.

Druhá cesta je rozpouštěcí. Vhodným způsobem se zhydrolyzuje a rozpustí škrob, pak se oddělí bílkoviny zpravidla srážením v isoelektrickém bodě, ze zbytku se opět vyloučí β -glukany alkoholem, jehož množství ve směsi musí být větší, než 50 % obj.

Obě dvě cesty mají své velké nevýhody. Fyziologická účinnost β -glukanů je závislá na jejich relativní molekulové hmotnosti a na větvení molekuly. Ideální by

bylo, kdyby bylo možné podávat β -glukan v tom tvaru a stavu, v jakém se vyskytuje ve výchozí surovině. Počítáme-li s průměrným obsahem β -glukanů v ječmeni a ovsu asi 5 % a předpokládáme, že zpracování v kuchyni či průmyslové technologii znamená ztráty β -glukanové účinnosti asi 50 %, pak by denní nutná spotřeba obilniny k zajištění fyziologicky účinné dávky β -glukanů pro dospělého člověka byla asi 150-200 g. Je to mnoho, ale přesto je zde reálná představa, že speciálně šlechtěné odrůdy ječmene a nahého ovsu ve zvlášť příznivých půdně-klimatických podmínkách a pečlivé agrotechnice by mohly sloužit jako reálný, relativně levný zdroj β -glukanů u lidí, kteří by byli ochotni ječmeno-ovesné dietě (dlouhotrvající!) se přizpůsobit.

U houbových β -glukanů, při velmi nízkém obsahu účinné látky v plodnicích (0,1-0,2 %) by denní spotřeba plodnic musela být kolem 2000 g a je tedy zřejmé, že to reálné není. Z toho je také možno odvodit, že prodávané potravní doplňky vyrobené pouhým lisováním moučky ze sušených plodnic β -glukanových hub či kvasinek nemohou dodat spotřebiteli požadovaných minimálních 3 g β -glukanu za den a že tedy tvrzení o jejich zdravotní prospěšnosti je jen klamavá reklama a je podivuhodné, že je kontrolními orgány trpěna. Kladný efekt z jejich používání může člověku přinést jen jeho hluboká víra.

Je tedy zřejmé, že obohacovací technologie, ať první či druhé cesty, jsou žádoucí a pro houbové β -glukany naprosto nutné. Problém je ale v tom, že v našich představách spojujeme polymerní polysacharid β -glukan s jiným polymerním sacharidem, celulózou. O té je známo, že je zcela mimořádně stabilní a že její hydrolýza, ať kyselá či enzymatická, je možná až po předúpravě suroviny. Ta se provádí tzv. „parní explozí“, v podstatě extruzí a i tak je výsledek často nejistý. Na rozdíl od celulózy je hemicelulóza β -glukan poměrně snadno hydrolyzovatelný a proto jakýkoliv zásah či manipulace vede k snížení molekulové hmotnosti a tím k znehodnocení fyziologických účinků izolovaných β -glukanů.

Při první cestě se k extrakci používají voda či alkalické roztoky o různém pH. Čím je pH vyšší, tím výtěžek extrakce je sice vyšší, ale destrukce molekuly a tím snížení fyziologické účinnosti je také vyšší. U druhé cesty je problém stejný: Čím je kyselá hydrolýza drastičtější, tím je sice hydrolýza doprovodného škrobu a jeho transformace na vodorozpustné monosacharidy rychlejší, ale destrukce molekuly β -glukanů větší. Jestliže se rozhodneme k hydrolýze škrobu obilniny použít enzymatickou cestu, tedy hydrolýzu α -amylázou, případně α i β -amylázou, je

situace prakticky stejná: I specifické amylázy, u kterých předpokládáme účinek orientovaný na škrob, polymerní β -glukan tříští. A to ještě nutno dát pozor na to, aby nižší teploty (do 70 °C) neumožnily destrukční účinek i enzymům, přítomným v obilnině, tedy endo- β -(1 \rightarrow 3),(1 \rightarrow 4)glukanáze, β -glukosidáze a endo- β -(1 \rightarrow 3)glukanáze. Je proto nutno použít výhradně jen vysoce termostabilní amylázy, pracovat při teplotách 95-100 °C, při nichž jsou už enzymy přímo štěpící β -glukany zničeny.

Analytika β -glukanů je podle literárních pramenů sice velmi složitá, ale v podstatě se používají jen dvě metody: První je metoda průtokové injekční analýzy (FIA) na analyzátoru SKALAR firmy Carbon Instruments s fluoridem, který stanoví míru zvýšení fluorescenčního záření komplexu β -glukanu s fluorescenčním barvivem Calcofluor WHITE M2R (SIGMA-ALDRICH, USA). Jeho roztok je nutno stabilizovat zvláštním postupem, který je popisuje (JORGENSEN 1988). Někteří autoři pracují s přístroji, které jsou vlastní modifikací Skaláru (HUBÍK, TICHÝ 1996), jiní autoři upravují vlastní SKALAR, případně používají speciální analyzátor pro stanovení β -glukanů Carlberg (ANALYTICA EBC 1997).

Druhá metoda k stanovení β -glukanů je enzymatická (MC CLEARY, GLENIE-HOLMES 1985). Pracuje se s nejjednodušší lichenázou a β -glukosidázou, vzniklá glukóza z rozložených β -glukanů se měří spektrofotometricky (MANZI, PIZZOFERRATO 2000) nebo amperometricky glukózovou elektrodou (BOYACI et al. 2002). Existují i modifikace této metody (ZYKMUNT et al. 1993).

I když mé pracoviště vlastní základní SKALAR, jeho příslušenství včetně fluorimetru stojí přes 4 mil. Kč a proto zakoupeno být nemohlo. Enzymatická metoda vyžaduje práci s drahými anglickými enzymy ve velkých seriích. Proto bylo pro nás jediným řešením využít analytické kapacity Zemědělského ústavu v Kroměříži a výzkumné laboratoře pivovaru Nymburk. Kompletní zařízení pro SKALAR má i českobudějovický pivovar BUDVAR, ale zatím nebylo uvedeno do činnosti.

Sledování obsahu β -glukanů a podmínek, které vedou k jejich maximální produkci, ve vědecké literatuře řeší mnoho autorů. Bohužel, závěry jsou pro průmyslovou výrobu β -glukanů velmi tristní: Obsah β -glukanů v ječmeni i ovsu závisí na interakcích velkého počtu faktorů, z nichž největší vliv má zřejmě průběh počasí během vegetace a kupodivu nejnižší vliv má hnojení. Jinými slovy: surovina má velmi kolísavé složení. Z tohoto důvodu je jisté, že druhá metoda izolace,

rozpouštěcí, je nesporně výhodnější, než první metoda extrakční. Rozpouštěcí metoda izolace je výhodná také proto, že nemá žádný odpad. Patří už do kategorie bezodpadové biorafinerie ječmene. Musí být ale vždy spojena se zpracováním hlavního produktu – sacharidických roztoků (třeba na bioetanol). Extrakční metoda má mnoho odpadu a produkuje ječný či ovesný nativní škrob - je dobře využitelný v kosmetickém průmyslu, ale na trhu o něj zájem není.

2.2. Relativní molekulová hmotnost β -glukanů

Jak už jsem uvedla, je velikost molekuly kvalitativním znakem β -glukanů z hlediska jejich fyziologické účinnosti. Proto nepřekvapuje, že vědecká literatura obsahuje až hrozivé množství publikací, které se této problematice věnují z velmi širokého spektra různých podmínek. nejvýznamnější jsou publikace výrazných kapacit v tomto oboru (ANDERSSON et al. 2004, 2008, 2009; AJITHKUMAR et al. 2005; FRANK et al. 2004; AMAN et al. 2004; RIMSTEN et al. 2003; ROUBROEKS et al. 2000, 2001; TOSH et al. 2004; DAWKINS, NNANNA 1995; WOOD et al. 1991).

2.2.1. Zhodnocení druhé části

Solidní pracoviště dnes sleduje molekulovou hmotnost β -glukanů v podstatě jen jednou metodou a to kalibrovanou vysoce výkonnou gelovou chromatografií s detekcí Calcofluorovou metodou (viz analytika). Chudší a méně vybavená pracoviště již nemají záviděníhodnou automatiku analytických prací a proto jejich analytika je více „ruční“, používají se molekulová síta (dextranové gely, sephadexy) a různé zjednodušující pracovní postupy, samozřejmě méně spolehlivé. Spíše výjimkou jsou další metody, např. klasická Svedbergova metoda stanovení relativní molekulové hmotnosti na ultracentrifuze s detekcí světelnou absorpcí či refraktometricky. Ještě méně vybavená pracoviště používají různě automatizované metody viskozimetrické. Zcela chudá pracoviště, jsou pak už odkázána na pracná a zdlouhavá měření na obyčejných viskozimetrech. To je i případ mého pracoviště, na kterém se k měření molekulové hmotnosti β -glukanů používá klasický skleněný viskozimetr dle Ubellohde.

2.3. Změny β -glukanů ve výrobcích při technologických operacích

Pilířovou publikací v této oblasti je rozsáhlá práce (AMAN et al. 2004). Další autoři už přináší méně významné výsledky (AUTIO, MALKKI, VIRTANEN 1992; BRENNAN, CLEARY 2005; THAMMAKITI et al. 2004; DAWKINS et al. 2001; CARR 1990; BAIRD, PETTITT 1991; WOOD 1984; SYMONS et al. 2004; VOLIKAKIS et al. 2004).

2.3.1. Zhodnocení třetí části literárního přehledu

Průměrná molekulová hmotnost β -glukanů ovesa se pohybuje v intervalech $2,06-2,30 \times 10^6$ g/mol, u ječmene je interval poněkud širší. Pasteurizace, pečení, extruze a jakékoliv kynutí (fermentační proces) degradují β -glukany na hodnotu molekulové hmotnosti $0,24-1,67 \times 10^6$ g/mol. Vaření a smažení degraduje β -glukany méně, největší degradační účinek má jakýkoliv fermentační proces. Degradace je tím větší, čím je zrno materiálu s obsahem β -glukanů menší a čím je doba fermentace delší.

Na závěr literárního přehledu mé disertační práce bych se ráda zmínila i o perspektivách a dalším výzkumu v této oblasti:

Zjištění, že problematika β -glukanů ve fyziologii člověka není tak přímočará, jak se původně předpokládalo a že β -glukany mohou být i dosti problematické (viz diskuse mé práce) je zřejmé, že počáteční nadšení a obrovský zájem o β -glukany pozvolna odpadá a na pořad dne se dostávají témata nová:

- a) Pozornost se zaměřuje na dietní vlákninu jako celek. Byla vyvinuta rychlá metoda k stanovení celkové dietní vlákniny (tzv. UPPSALA-METODA), která stanoví neutrální cukerné zbytky, zbytky odvozené od uronových kyselin a tzv. „Klasonův lignin“, t.j. bezpopelné, v kyselinách nerozpustné zbytky (THEANDER et al. 1995; THEANDER et al. 1994) a je sledován vliv genotypu a prostředí na fytochemii dietní vlákniny – steroly, alkylresorcinoly, foláty, polyfenoly a další a to nejen v ovsu a ječmeni, ale i v pšenici (RAKSREGI et al. 2010).
- b) Obrovský zájem je věnován fyziologicky účinným látkám a vláknině žita jsou sledovány nejen β -glukany (ANDERSSON et al. 2008), ale hlavně

jeho lignany (HALLMANS et al. 2003; NILSSON et al. 1997) a isoflavonoidy (PETTERSSON et al. 1996) i arabinoxylany (ROUBROEKS, ANDERSSON, AMAN 2000), obecně všem látkám vlákniny žita (AMAN et al. 2010; RAKHA et al. 2010; SHEWRY et al. 2010; ANDERSSON et al. 2009; AMAN et al. 1997; HALLMANS et al. 1997; BENGSTON 1992). I když žito není předmětem mé disertační práce, uvádím zajímavé okolnosti, že špičkoví badatelé v oblasti β -glukanů přesouvají nyní svůj zájem k žitu!

- c) Vlastní výzkum β -glukanů se nyní věnuje opravám vžitých představ z minulých let. Tak význam velké a nízké molekulové hmotnosti β -glukanů z hlediska fyziologických účinků sleduje (FRANK et al. 2004), rozdělení molekulové hmotnosti ve vztahu k extrahovatelnosti β -glukanů v potravinářských výrobcích z ovsa i ječmene sledují další práce (AMAN et al. 2004; ANDERSSON et al. 2003; AJITHKUMAR et al. 2005; AMAN et al. 2008).
- d) Největší zájem je dnes věnován enzymatickým přeměnám β -glukanů, zvláště ve spojení s technologickými operacemi v potravinářském průmyslu (ANDERSSON et al. 2004; TROGH et al. 2004; SUNDBERG et al. 1994; WESTERLUND et al. 1990). Z tohoto hlediska je významné zjištění, že enzymatická hydrolýza β -glukanů je velmi snadná a může probíhat nejen za spoluúčasti známých enzymů, štěpících β -glukany, ale i enzymatickými systémy jinými, např. činností bakterií mléčného kvašení (AMAN et al. 1990) nebo celulázami z *Trichoderma resei*, jejichž součástí je vždy endo-1,4- β -glukanáza (AJITHKUMAR et al. 2006; ROUBROEKS et al. 2001). Zajímavé jsou některé podrobnosti těchto studií, které jsou však dobře využitelné v praxi: Např. zjištění, že při sladování ječmene postřik kyselinou mléčnou v kombinaci s vyšší teplotou redukuje významně obsah fytátů v materiálu i aktivitu β -glukanázy (HARALDSON et al. 2004; RIMSTEN et al. 2002; ROUBROEKS 2001) nebo vliv železa na degradaci β -glukanů ječné kaše v zažívacím traktu (HARALDSON et al. 2005). Citlivost fyziologicky účinných látek na vnější vlivy je neuvěřitelně vysoká, např. změny těchto látek nastávají už během izolace škrobu z ječmene, tedy vodou a teplem (ANDERSSON A. A. M. et al. 2001). Literatura se shoduje v názoru, že

v obecném pojetí polysacharidy jsou všestranně výhodné substráty pro nejrůznější enzymatické reakce (AMAN et al. 2000).

V analytice β -glukanů už žádný nový vývoj nenastal. Poslední metodická modernizace ostatně už staré známé metody je od známých autorů vedených Rimstenem (RIMSTEN et al. 2003), která je určena pro obilné extrakty a β -glukany jsou zde stanoveny moderní HPSEC chromatografií – ovšem opět s detekcí obvyklým Calcofluorem.

3. CÍL PRÁCE

Má doktorská práce je orientována na praktickou možnost levné výroby β -glukanů k výrobě výrobků a potravních doplňků pro pacienty, kteří β -glukany potřebují a jsou dnes odkázáni na drahý skandinávský preparát VITALBREN (s 14 % a 22 % β -glukanů obilného typu), tedy pro diabetiky a cholesterolemiky. Má být nabídkou pro českou podnikatelskou sféru. Z tohoto pohledu lze cíl této disertační práce formulovat takto:

1. Izolovat β -glukan (pleuran) z hlívy ústřičné a pokusit se o technologicky levný způsob jeho koncentrace z procesní kapaliny.
2. Ověřit perspektivní možnost izolovat β -glukany z vyplozeného substrátu po pěstování hlívy ústřičné a o ekonomické využití tohoto substrátu.
3. Navrhnout nový výrobek z kategorie funkčních potravin a potravních doplňků s β -glukany a arabinoxylany.
4. Ověřit provozní analytickou metodu na principu viskozimetrie ke kontrole molekulové hmotnosti vzorků izolovaných β -glukanů.
5. Výrobu β -glukanového koncentrátu k výrobě funkčních potravin včlenit do technologie komplexního využití zrna ječmene, tzv. „ječmenové biorafinerie“.
6. Ověřit degradaci molekulové hmotnosti β -glukanového koncentrátu z ječmenové biorafinerie, při dalším zpracování tohoto výrobku kuchyňskými postupy a potravinářskými technologiemi.

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1. Pleuran z hlívy ústříčné (*Pleurotus ostreatus*) a možnosti jeho koncentrace pro výrobu funkčních potravin.

Pleuran from (*Pleurotus ostreatus*) and possibilities of its concentration for production of nutraceuticals.

Abstract

In fruit bodies and gathering wastes of *Pleurotus ostreatus*, there are 0,19-0,32 % mass in dry matter soluble beta-glucans of HA type, and, in comparison with beta-glucans of cereals, this content is not dependent on substrate composition of cropping technology, type of the hall for mushroom cropping. By sorption and flocculation with thermally modified starch in presence of CaCO₃, it has been managed to concentrate this beta-glucan content 12-13 times. From aspect of market price of a presupposed nutraceutical, it is evidently still too little.

Key words

nutraceuticals; beta-glucans; HA beta-glucan; concentration; sorbents

Souhrn

V plodnicích a sběrových odpadech *Pleurotus ostreatus* je 0,19-0,32 % hm. v suš. rozpustných beta-glukanů typu HA a na rozdíl od beta-glukanů obilovin je tento obsah nezávislý na složení substrátu pěstební technologie, druhu pěstírny. Sorpcí a flokulací termicky modifikovaným bramborovým škrobem v přítomnosti CaCO₃ se podařilo tento obsah beta-glukanů zkoncentrovat 12-13 krát. Z hlediska prodejní ceny předpokládané funkční potraviny je to zřejmě ještě málo.

Klíčová slova

funkční potraviny; beta-glukany; pleuran; koncentrace; sorbenty

Úvod

Funkční potraviny jsou takové, které kromě výživové hodnoty mají příznivý účinek na zdraví konzumenta a jsou vyrobeny z přirozeně se vyskytujících složek (KALACĚ 2003). Jejich význam je v tom, že především působí preventivně proti nemocím, posilují přirozené obranné mechanismy v organismu, zpomalují proces stárnutí a příznivě ovlivňují fyzický a duševní stav. V kvasinkách, plísních a v některých vyšších houbách jsou obsaženy beta-(1→3)-D-glukany, které mají výrazné antivirové, antibakteriální a hlavně antikancerogenní účinky. Nejvyšší antinádorovou účinnost mají beta-D-glukany se stupněm větvení 0,20 až 0,33 s vyšší relativní molekulovou hmotností, 100-200 kDa. Jsou strukturně podobné skleroglukanu (v houbách rodu *Sclerotium*) a mají glukózové jednotky vázané v hlavním řetězci vazbami (1→3) a s postranními řetězci připojenými vazbami (1→6). V americké klinické medicíně při léčbě nádorových onemocnění se už úspěšně používají izoláty lentinanu z houževnatce jedlého (*Lentinus edodes*) a schizofyllan z klánolístky obecné (*Schizophyllum commune*) se stupněm větvení 0,23 a 0,33 (VELÍŠEK 1999). V ČR se téměř už průmyslově pěstuje hlíva ústřičná (*Pleurotus ostreatus*) s obsahem beta-(1→3)-D-glukanu, označovaného HA nebo pleuran se stupněm větvení 0,25. Většina vyráběných přípravků využívá jako zdroj beta-glukanů pekařské kvasnice (VĚTVIČKA, MODRIANSKÝ 2000).

Beta-glukany patří do skupiny hemicelulóz, tedy necelulózových polysacharidů buněčných stěn rostlin. Patří mezi neškrobové polysacharidy, označované NSP. Hemicelulózy kromě dalších skupin polysacharidů zahrnují dvě významné skupiny, heteroxylany a heteroglukany. Heteroglukany se dělí na xyloglukany (v buněčných stěnách dvouděložných rostlin) a beta-glukany v buněčných stěnách jednoděložných rostlin, zvláště obilovin. Beta-glukany jsou sice řazeny do antinutričních polysacharidů (KALACĚ, MÍKA 1997), protože snižují využitelnost živin a užítkovost při krmení drůbeže a prasat (CAVE 1992, DRITZ 1995), v lidské výživě je oceňován tento účinek při tvorbě redukčních diet a také jejich vliv na snižování hladiny cholesterolu. Jde hlavně o cereální výrobky z ječmene a ovsu (WHYTE 1992, INGLET, NEWMANN 1994). Zatímco v ovesných otrubách je zdroj beta-(1→3),(1→4)-D-glukanu, který je také nazýván „ovesná guma“, pro ječmen jsou typické beta-glukany s dvěma či více sousedícími (1→4) vazbami.

Bohužel, beta-glukany obilovin mají svůj význam při výrobě piva a redukčních diet, ale antivirové a antikancerogenní účinky nemají (DENG 2000).

V této práci jsme se snažili dojít k závěru, zda funkční potraviny s beta-D-(1→3) glukany je lépe vyrábět přímo z hlívy ústříčné, nebo by bylo vhodnější z výroby těchto hub a jejich odpadů připravit glukanový koncentrát a z něho připravovat funkční potraviny.

Materiál a metody

Plodnice a myceliem prorostlý pěstební substrát a sběrové odpady jsme získávali ze dvou zdrojů: soukromé malopěstírny ve Štěpánovicích (Š) a z pěstírny v Mostě (M). Samotné plodnice z pěstírny v Soběslavi (S). Analytika beta-glukanů je instrumentálně i materiálově velmi náročná. Používá se metoda průtokové injekční analýzy (FIA) na analyzátoru SKALAR firmy Carbon Instruments s fluorimetrem, který stanoví míru zvýšení fluorescenčního záření komplexu beta-glukanu s fluorescenčním barvivem Calcofluor White M2R (SIGMA-ALDRICH, USA), jehož roztok je nutno stabilizovat postupem Skandinavisk Bryggeri Laboratorium ApS, Denmark, původní metodikou podle JORGENSENA (1988), nebo s analyzérem pro stanovení beta-glukanů systém Carlberg (ANALYTICA EBC 1997) nebo v modifikovaném přístroji vlastní konstrukce (HUBÍK, TICHÝ 1996) nebo s použitím zařízení SKALAR (SKALAR METHODS 1992). Pro školská pracoviště je toto vybavení nedostupné a je proto možné využít služeb firem Skatec Praha, sladařského ústavu v Brně či sladovny v Nymburce.

Druhou používanou metodou stanovení beta-glukanů je metoda enzymatická (MC CLEARY, GLENNIE-HOLMES 1985). Také zde jsou velké analytické problémy s cenou a časovou omezeností použití drahých enzymatických systémů s lichenázou a beta-glukosidázou. Vzniklá glukóza se měří spektrofotometricky (MANZI et al. 2000) nebo amperometricky glukózovou elektrodou (BOYACI et al. 2002). Existují modifikace enzymatické metody (ZYGMUNT et al. 1993). I u této metody je výhodné využít zavedenou spolehlivou analytiku při velkých sériích vzorků v Zemědělském výzkumném ústavu v Kroměříži.

Extrakce materiálů byla provedena horkým (80°C) 1 M NaOH, od ostatních alkalirozpustných NSP byly rozpustné beta-glukany odděleny chromatograficky na

anexu podle CHEUNG a LEE (2000). Jako referenční srovnávací standard byl použit izolát pleuranu z Biovety Nitra.

Proti cereálním vodorozpustným beta-glukanům, jejichž obsah např. v ječmeni dosahuje až 16 % suš., v ovsu až 6,8 % suš. (VELÍŠEK 1999) je celkový obsah β -glukanů v hlívě ústřičné podstatně nižší, 0,24-0,38 % suš. (MANZI, PIZZOFERRATO 2000) podle kmenů. Podle našich analýz mají plodnice této houby průměrně 91,7 % vody, je tedy obsah vodorozpustných beta-glukanů v čerstvých plodnicích opravdu mimořádně nízký a pro praktické účely využití této cenné součásti je zkoncentrování jejího množství naprostou nutností.

Houbové beta-glukany jsou biopolymery s vysokou relativní molekulovou hmotností, v intervalu 600000 – 700000 (AUGUSTIN 1998) a mají proto tomu odpovídající vlastnosti viskostatické, rheologické i sorpční. Proto jsme pro jejich koncentraci zvolili kombinovaný proces sorpce a flokulace z extraktů, který ovšem musí být realizován nejen jedlým, ale i přirozeným sorbentem a flokulátorem, má-li být splněna definice funkční potraviny. Z přirozených flokulátorů vyhovuje jediné nativní bramborový škrob, jehož aktivitu jsme zvýšili termickou modifikací na desce při 150°C s použitím inhibitoru mazovatění (KODET, BABOR 1991), kterým byl v našich pokusech derivát celulózy – karboxymetylcelulóza AKUCCELL AF 2985, která je ve výrobě redukčních diet známa jako zahušťovadlo s vlastností rozpustné vlákniny bez energetické hodnoty. V další části pokusů jsme k pokusům použili také získaný vzorek kvarterního derivátu kationického aminoetheru škrobu. Proti očekávání však tento flokulant, doporučený i pro čištění odpadních vod, neměl výrazný efekt proti námi připravenému vzorku s CMC termicky modifikovaného bramborového škrobu a proto jsme tyto pokusy přerušili, také proto, že tento derivát už by porušil zásadu „přirozenosti“ funkční potraviny.

Z hlediska sorpčních dějů nativní škroby a nesubstituované modifikace škrobů (termické modifikace, oxidované škroby a odbourané škroby) mají jediný sorpční mechanismus – adsorpci hydroxylových skupin D-glukózových jednotek na záporně nabitých částicích. Jsou pravděpodobně vázány vodíkovými můstky s hydroxylovými skupinami hydratačního obalu částic suspenze. Zásadní roli u přírodních škrobů hraje vázaná kyselina fosforečná, která je charakteristická především pro bramborový škrob. V přítomnosti iontů Ca^{2+} či suspenze CaCO_3 dojde k dalšímu řetězení v systému a zvyšuje se sorpční a flokulační účinnost (KODET, BABOR 1991). Proto jsme při sorpci a flokulaci přidávali suspenzi

sráženého CaCO_3 v dávce 1 % hm. a alternativně 250 mg Ca^{2+} ve formě octanu vápenatého na 1000 ml extraktu. Koncentrace β -glukanů sorpcí a flokulací byla prováděna při teplotě 30 °C dávkou 400 mg/1000 ml škrobového srážedla rozptýleného ve vlažné (35 °C) vodě. (Běžné dávky flokulátorů při čištění vod jsou asi 100x nižší.) Podrobný postup přípravy termické modifikace škrobu s přidavkem CMC je předmětem chráněného prům. vzoru v jednání a bude zveřejněn později.

Matematicko-statistické vyhodnocení výsledků bylo provedeno stanovením intervalu spolehlivosti průměrů a statistické významnosti rozdílu průměru podle Deana a Dixona pro máloprvkové soubory (ECKSCHLAGER et al. 1980).

Výsledky a diskuse

V tabulce č. 1 jsou uvedeny průměrné obsahy pleuranu v plodnicích, v sběrových odpadech a z myceliem prorostlého substrátu ze 3 různých zdrojů: Mostu (M), Štěpánovic (Š) a Soběslavi (S). Je zřejmé, že substrát pleuran prakticky neobsahuje, plodnice a sběrové odpady mají z hlediska surovinového zhruba stejnou hodnotu. Ačkoliv ve 3 pěstírnách jsou různé substráty a různé technologie, je překvapující, že obsahy beta-glukanů v plodnicích i ve sběrových odpadech na tuto významnou skutečnost prakticky nereagují a rozdíly nejsou statisticky významné. Naopak při studiu beta-glukanů obilnin je známo, že jejich obsahy jsou poměrně silně závislé na odrůdách, lokalitách, půdně-povětrnostních podmínkách, agrotechnice, méně už na hnojení (HUBÍK, TICHÝ 1996, EHRENBERGEROVÁ et al. 1997). Také v submersních kulturách hub rodu *Pleurotus* v třepaných lahvích produkci extracelulárních polysacharidů ovlivňuje poměrně značně poměr C : N (GUTTIEREZ et al. 1996).

V tabulce č. 2 jsou uvedeny výsledky koncentrace beta-glukanů sorpcí a flokulací z extraktu plodnic *Pleurotus ostreatus* termicky modifikovaným bramborovým škrobem s inhibicí mazovatění CMC (BŠ), kvarterním derivátem aminoetheru škrobu (KAŠ) bez aplikace Ca (bez Ca) s přidavkem Ca^{2+} (Ca^{2+}) a s přidavkem Ca ve formě sráženého CaCO_3 (CaCO_3). Z výsledků je zřejmé, že nejvyšší koncentrace pleuranu bylo dosaženo ve finálním produktu, který byl připraven sorpcí a flokulací BŠ s přidavkem CaCO_3 . Očekávali jsme vyšší účinnost

Ca²⁺, to se však nepotvrdilo, zřejmě CaCO₃ podporuje nejen flokulační, ale sorpční mechanismus, protože flokulace s CaCO₃ byla mnohem rychlejší.

I když koncentrací sorpcí a flokulací se podařilo zvýšit koncentraci rozpustných beta-glukanů typu pleuranu z 0,32 % hm. suš. v plodnicích houby na 4,02 % hm. suš. v koncentrátu bez nutnosti odpařovat celý objem extraktu, tedy zhruba 12-13x, je to z hlediska reálné ceny předpokládané funkční potraviny stále ještě málo a je nutno v práci pokračovat v hledání odpovědi, zda vhodnější surovinou pro fungální beta-glukany nejsou některé kvasinky, nebo zda by profylaktický účinek těchto důležitých látek v lidské stravě nebylo možno řešit pro spotřebitele ekonomicky výhodněji přímo vývojem vhodných kvasničných a hlívoých jídel.

Tento výzkum byl umožněn finanční podporou grantu MSM 600 766 5806.

Tabulka č. 1: **Obsah pleuranu v produktech třech různých pěstíren s výrobou *Pleurotus ostreatus* [% v suš.].**

Table No. 1: **Pleuran content in products of three different cropping halls with *Pleurotus ostreatus* production [% in dry matter].**

Pěstírna Cropping hall	Plodnice Fruit bodies	Sběrové odpady Cathering wastes	Myceliem prorostlý substrát With mycelium proliferated substrate
Most (M)	0,32 (0,22 – 0,42)	0,32 (0,24 – 0,40)	0,05 (?)
Štěpánovice (Š)	0,26 (0,19 – 0,31)	0,25 (0,20 – 0,31)	0,03 ? (?)
Soběslav (S)	0,25 (0,20 – 0,30)	-	-

Tabulka č. 2: **Průměrný obsah pleuranu v koncentrátu extraktu plodnic *Pleurotus ostreatus* z pěstírny Most, Soběslav a Štěpánovice [% suš.].**

Table No. 2: **Average pleuran content in extract of *Pleurotus ostreatus* fruit bodies cropping halls Most, Soběslav and Štěpánovice [% in dry matter].**

Sorpce a flokulace Sorption and flocculation	Pěstírna Cropping hall		
	M	Š	S
BŠ	3,15	3,00	2,92
KAŠ	1,25	1,40	1,54
BŠ + Ca ²⁺	3,83	3,58	3,60
KAŠ + Ca ²⁺	1,76	2,29	2,45
BŠ + CaCO ₃	4,02	4,00	3,85
KAŠ + CaCO ₃	2,43	2,86	2,60

4.2. Výroba surového β -glukanu z plodnic houby hlívy ústřičné (*Pleurotus ostreatus*) a ze substrátu po pěstování hlívy ústřičné.

Součást užitného vzoru UV 20058 z 22. 7. 2009, Státní úřad průmyslového vlastnictví ČR, Praha.

Návrh na užitný vzor

„Výroba surového β -glukanu z plodnic houby Hlíva ústřičná (*Pleurotus oestratus*) nebo ze substrátu po pěstování hlívy ústřičné“

Úvod

Na rozdíl od subaleuronových vrstev obilek ovsa, které obsahují β -(1 \rightarrow 3), (1 \rightarrow 4)-D-glukan a celého endospermu obilek ječmene, který obsahuje β -glukany s dvěma nebo více sousedícími (1 \rightarrow 4) vazbami, kvasinky, plísně a vyšší houby

produkují poměrně významné množství různých extra a intracelulárních polysacharidů, z nichž neškrobové polysacharidy, které lze považovat za hemicelulózy, β -(1 \rightarrow 3)-D-glukany mají unikátní vlastnosti. Jsou to účinky antibakteriální, antivirové, antikoagulační a hlavně antikancerogenní. Jsou to β -glukany s glukosovými jednotkami vázanými v hlavním řetězci vazbami (1 \rightarrow 3) a s postranními řetězci připojenými vazbami (1 \rightarrow 6). Posilují imunitní systém a inhibují vznik nádorů. Jejich fyziologická aktivita závisí na molekulové hmotnosti (velmi široký interval desítky až tisíce kDa), četnosti větvení a konfrontaci molekul. Nejvyšší protinádorovou aktivitu a účinnost mají β -D-glukany se stupněm větvení 0,22-0,33 a vyšší relativní molekulovou hmotností (100-200 kDa). Tomuto požadavku vyhovují prakticky jen tři pěstované houby: houževnatec jedlý – shiitake (*Leutinus edodes*), jehož β -D-glukan má větvení 0,23-0,33, dále klánolístka obecná (*Schizophyllum commune*) se stupněm větvení 0,33 a hlíva ústříčná (*Pleurotus oestratus*), která produkuje β -D-glukan se stupněm větvení 0,25.

Tyto houby však obsahují β -glukanů ve své značně vodnaté hmotě velmi málo, asi 10x méně než oves a ječmen, ale bohužel β -glukany obilnin sice mají také příznivé vlastnosti (snižují hladinu cholesterolu a krevních cukrů, působí proti plnému využití živin v organismu), ale antikancerogenní účinky nemají. Proto izolace β -glukanů z jedlých hub je drahá a produkty velmi drahé. Přesto se β -glukan lentinan z houževnatce a β -glukan schizofyllan z klánolístky obecné používají v klinické medicíně USA jako immunoterapeutická léčiva při léčbě nádorových onemocnění, většinou v kombinaci s radioterapií.

Předmět užitého vzoru

Zjistili jsme, že vyplozený substrát po pěstování jedlé houby hlívy ústříčné, který je vždy plně prorostlý myceliem houby, obsahuje prakticky stejné množství β -glukanu pleuranu, jako drahé plodnice této houby. Substrát pro pěstování této houby může mít rozdílné složení: nejčastěji jsou to drcené kukuřičné palice po sklizni kukuřice, mohou to být i dřevěné odpady listnáčů či kombinace. Pro izolaci cenných β -glukanů to není rozhodující, významný je jen stupeň prorostlosti substrátu myceliem.

Postup izolace

Z roztoku Na_2CO_3 a roztoku NaHCO_3 se obvyklým a obecně známým postupem připraví pufr s hodnotou 9,5 -10,0 pH. Roztok se zahřeje na teplotu 60-70°C a do roztoku se zamíchají drcené části plodnic houby nebo vyplozeného substrátu s myceliem tak, aby jednotlivé částice nebyly větší než 10 mm a aby směs pufru a suspendované hmoty substrátu neobsahovala vyšší množství sušiny, než 8%. Je-li překročena tato hodnota, extrakce probíhá nedokonale, protože styk fází je obtížný i při intenzivním míchání. Extrahuje se 60 minut při stálém míchání.

Filtrát se oddělí od extrahované hmoty hrubým sítem a ihned se zahřeje na 90 °C po dobu 15-20 minut, aby byly inaktivovány enzymy endo- β -(1 → 3),(1 → 4)glukanáza, endo- β -(1 → 3)glukanáza a β -glukosidáza jejichž činností by izolované β -glukany byly přeměněny rozpustné β -glukanové dextriny se smíšenými vazbami, které by v dalším reakčním postupu vedly ke vzniku neúčinných cukrů, cellobiosy, laminaribiosy a glukózy (VELÍŠEK 1999).

Po tepelném ošetření se roztok zneutralizuje HCl p.a. ředěnou 1:5 vodou na pH = 4,5 a zchladí se na teplotu 2-4 °C. Případně vysrážené bílkoviny se odstředí a ke kapalině po odstředění se přidá stejný objem 2-propanolu (zchlazeného na teplotu 2-4 °C) a promíchá se. Sražený β -glukan se odstředí, z odstředěné kapaliny se získá zpět 2-propanol destilací na destilační koloně.

Surový β -glukan, který je znečištěn jinými polysacharidy, houbovými a jinými proteiny a hemicelulózou, polysacharidy ze skupiny arabinoxylanů, se rozpustí v destilované vodě a za pomoci ultrazvukového desintegrátoru při teplotě 90-100 °C na koloidní roztok, který se sterilně plní do obalů.

4.3. Potravní doplněk s obilnými a houbovými β -glukany a arabinoxylany a výrobek stejného charakteru z kategorie funkčních potravin.

Tento cíl práce je naplněn třemi užitnými vzory, které byly podány prostřednictvím patentové kanceláře Kudrlička & Sedlák, České Budějovice, Státnímu úřadu průmyslového vlastnictví ČR, Praha. Vlastníkem užitných vzorů a poskytovatelem licencí je JČU v Českých Budějovicích, autory kolektiv katedry

aplikovaných biotechnologií ZF JČU v Českých Budějovicích, s kterým jsem na daných problémech spolupracovala:

1. Potravinářská surovina s obsahem ječných a ovesných β -glukanů a arabinoxylanů pro přípravu vařených a pečených kynutých funkčních potravin pro diety při vysokém a vyšším BMI.
2. Potravní doplněk s obilnými a houbovými β -glukany a arabinoxylany.
3. β -glukanové knedlíčky ve švestkové omáčce (s textem prodejního letáku a informací pro obchodní sféru).

1. Návrh na užitný vzor

„Potravinářská surovina s obsahem ječných a ovesných β -glukanů a arabinoxylanů pro přípravu vařených a pečených kynutých funkčních potravin pro diety při vysokém a vyšším BMI“

Úvod

Omezením vlastního pohybu a relativně blahobytným způsobem života spěje civilizace vyspělých zemí celého světa k obezitě, která má nepříznivé důsledky ve vyšším výskytu cévních chorob, nádorových onemocnění, cukrovky – tedy nejpočetnějších příčin smrti.

$$\text{BMI} = \frac{\text{hmotnost [kg]}}{(\text{výška})^2 \text{ [m]}}$$

BMI (Body Mass Index) by u neohroženého člověka neměl přesáhnout hodnotu 25, oblast 25 – 30 je považována za nadváhu, nad 30 za obezitu.

Možnosti omezit růst hmotnosti jsou obecně známé: Výdej energie nesmí být podstatně menší, než její příjem. To tedy znamená: dostatek vlastního pohybu a omezení příjmu energie podstatným omezením tuků a sacharidů.

Bohužel tato jednoduchá závislost je značně komplikována četnými faktory: organismus nesmí hladovět, aby nenastalo lepší využívání energie z potravy. To znamená jíst 5-6x denně, ale málo. Pocit hladu se dá omezit vyšším příjmem

vlákniny a nesladkými nápoji. Hlavně není možno střídat období jistého omezení příjmu energie s obdobím příjmu „ad libitum“. Pak nástup tzv. „jo-jo efektu“ se zvýšeným nástupem hmotnosti je zcela přirozený jev. Dalším problémem je zvýšený příjem bílkovin, který je pro otlého nutností. Především ztrácí pocit neúprosného hladu a do jisté míry omezuje dopad jakéhokoliv hubnutí – při ztrátě zbytečného tuku se zároveň bohužel ztrácí i svalová hmota. Ale bílkoviny na druhé straně mohou být komplikací pro jedince, kteří trpí ledvinovými chorobami a také vznik odpadních produktů z bílkovin může vést ke komplikacím v tlustém střevě a konečníku. Je proto nutno věnovat pozornost výběru druhu bílkovin. Rostlinné bílkoviny jsou sice méně problematické, než bílkoviny živočišné, ale z hlediska nutričního mají nižší kvalitu. Proto jen část živočišných bílkovin lze nahradit bílkovinami rostlinnými. Ideálním zdrojem živočišných bílkovin jsou bílkoviny mléka a rybího masa. Z rostlinných bílkovin jsou nejkvalitnější bílkoviny sóji.

Otlý člověk, který chce zhubnout, musí dbát na zásady racionální výživy mnohem razantněji, než jedinec, jehož BMI je v pořádku. To znamená, že při nutném snížení příjmu energie, zvýšeném příjmu optimální skladby bílkovin musí více dbát na příjem vlákniny, zvláště rozpustné, tedy hlavně pektinových látek z ovoce a zeleniny, na příjem vitaminů a minerálních látek, které v běžné stravě přijímáme málo, např. hořčíku. Potřebuje i ochranné látky v potravě více, než jedinec s normální hmotností: Tedy potřebuje vyšší příjem inhibitorů a blokátorů karcinogeneze (např. β -karoten a karotenoidy, sloučeniny selenu, tokoferoly), antioxidanty, vysoce nenasycené mastné kyseliny, látky snižující HDL cholesterol (omega-3-nenasycené mastné kyseliny), fytosteroly a fytostanoly k omezení cholesterolu v krevním séru a tedy také s antisklerotickým účinkem (zdrojem je hlavně řepkový olej a u nás výrobek FLORA pro activ), lecithin zvyšuje účinnost fytosterolů, fosfolipidy s posilujícími a povzbuzujícími účinky (výše uvedený lecithin je fosfolipidem). Významný je i příjem kyseliny listové (s účinkem antidepresivním, antisklerotickým, antianemickým a antikancerogenním, účinná při krvetvorbě, zvláště důležitá při požívání alkoholu a aplikaci hormonální antikoncepce) obsažené hlavně v droždí. Významnou součástí racionální výživy otlého jedince je i zvýšený příjem obilních β -glukanů, které snižují hladinu LDL a celkového cholesterolu i hladinu glukózy v krvi. Patří mezi tzv. „antinutriční faktory“, u zvířat snižuje využití živin z krmiv, zvláště tuků. Jsou obsaženy v ječmeni a ovsu.

Otlý člověk však potřebuje daleko více, než jedinec s běžnou hmotností upravit svoji střevní mikroflóru probiotiky (bakterie rodu *Lactobacillus* a *Bifidobacterium*) k posílení imunitního systému zvýšení vstřebávání vápníku, snížení hladiny cholesterolu, snížení tvorby bakteriálních enzymů v tlustém střevě, s mutagenními a kancerogenními vlastnostmi. (Zdrojem jsou jogurty a acidofilní mléka.)

Významný je i příjem prebiotik, tj. nestravitelných složek potravin, které selektivně podporují růst či aktivitu některých bakterií v tlustém střevě. Tuto funkci plní především nestravitelné oligosacharidy, neúčinnější je z přirozených látek inulin (fruktooligosacharid z kořene čekanky či hlíz topinamburu). Místo „fruktooligosacharid“ je také běžný název „oligofruktosa“.

Velmi výhodná je aplikace synbiotik, tj. současný přídavek probiotik a prebiotik do jednoho produktu.

Jedinec, který chce pomalu a rozumně hubnout, bez komplikací a bez nebezpečí, že posléze ztuční, místo očekávaného hubnutí, by měl dát na tyto zásady.

- 1) Denní příjem energie max. 5 000 kJ
- 2) Denní rozdělení energetického příjmu:

snídaně:	1 000 kJ
oběd, večeře:	1 400 kJ x 2 = 2 800
2 svačiny:	400 kJ x 2 = 800 kJ
rezerva:	400 kJ

Bylo zjištěno, že hemicelulózy z kategorie neškrobových polysacharidů jsou ve vyšším množství obsaženy v ječmeni než v ovsu, a že vyšší obsah těchto látek je v bezpluchých odrůdách. U ječmenů jde o tzv. „vaxy“, tj. ječmeny s voskovým (měkkým) typem endospermu, který je hlavním zdrojem β -glukanů ječmene a cenné arabinoxylany jsou orientovány spíše na obalové vrstvy (aleuronové vrstvy). V ječmeni je 15-24 % dieteticky příznivě působící vlákniny, z toho asi 85 % připadá na neškrobové polysacharidy, z toho asi 55 % tvoří (1 \rightarrow 3),(1 \rightarrow 4)- β -glukany a asi 25 % arabinoxylany (EHRENBERGEROVÁ et al. 2006).

V ČR je zaregistrován užitný vzor č. 200 56 738 „Potraviny s bezpluchým ječmenem“ z Výzkumného ústavu potravinářského v Praze.

Zatím co jiné obilniny obsahují celkovou i rozpustnou vlákninu především v obalových vrstvách zrn, v ječmeni je obsaženo v celé obilce.

Stejně jako u ovsu i u ječmene je jistou nevýhodou, že bezpluché odrůdy nedosahují ve srovnatelných podmínkách takového výnosu, jako pluchaté odrůdy (PRUGAR et al. 2008).

Arabinoxylany jako typ vlákniny mají účinky podporující β -glukany, ale hlavně působí při přípravě těst vysokou absorpci vody (hydrataci těsta) a působí příznivě na viskozitu a rheologické vlastnosti těsta, výrobky mají větší objem po kynutí, zadržují lépe CO_2 a jsou pak kypřejší, snižuje se retrogradace škrobu, a proto stárnutí výrobků je pomalejší (VELÍŠEK 1999).

β -glukany ovsu podle četných pramenů (SAASTAMOINEN 1992, PRUGAR 2008) jsou obsaženy hlavně v ovesných otrubách, zatímco nejnovější prameny tvrdí, že jsou hlavně v endospermu, tedy středové části obilky. U ječmene to platí jednoznačně, u ovsu jde spíše o směšování pojmů „ovesná guma“ a β -glukany, protože i arabinoxylany tvoří velmi viskózní roztoky (PRUGAR 2008, NEWMANN et al. 1989, VELÍŠEK 1999). Současné znalosti orientují místo nejvyšších obsahů β -glukanů u ovsu na subaleuronovou vrstvu, tedy nikoli na svrchní a aleuronovou vrstvu.

Je tedy nutno opravit názor o otrubách jako hlavního zdroje β -glukanů.

Je nesporné, že oves má s ječmenem z hlediska nutričního mnoho společného, ale oves má ještě některé další funkce, které zhodnotil WELCH (1998) a dospěl k názoru, že oves je multifunkční potravina. To potvrzuje i KALÁČ (2003) poukazem na skutečnost, že výrobky z ovsu jsou prvními potravinami, které bylo povoleno v USA označovat na etiketách jejich zdravotním přínosem – snížením rizika srdečně-cévních chorob.

Příprava výrobku

Smísí se 23-25 % inaktivované ovesné mouky, získané semletím ovesných otrub a svrchní části endospermu z bezpluchých genotypů ovsu se 77-75 % ječné mouky, resp. rozemletých ječných krup z potravinářského ječmene, perspektivně z bezpluchých linií, z křížení vax typů, resp. s pluchatými odrůdami (podle možnosti získání produktu v ČR).

2. Návrh na užitečný vzor

„Potravní doplněk s obilnými a houbovými β -glukany a arabinoxylany“

Úvod

Výroba β -glukanů z ovsa je popsána v našem podaném patentu (PV 2008-24) „Způsob zpracování ovsa zejména při výrobě nutričně upravených ovesných vloček, produkty získané tímto způsobem, zařízení k provádění tohoto způsobu, použití ovesných otrub k izolaci cenných látek“ a v užitém vzoru (č. 18765 ze 4.8. 2008) „Produkty z ovesných vloček a zařízení pro jejich výrobu“. Výroba β -glukanů z ječmene je zcela analogická, jen s tím rozdílem, že se nepoužijí k výrobě otruby s aleuronovou a subaleuronovou vrstvou, ale celý endosperm obilky ječmene, např. z mletých ječných krup či ječné mouky. Výrobu β -glukanů z hlívy ústříčné, respektive z vyplozeného substrátu po pěstování hlívy ústříčné, který je ekonomicky mnohem atraktivnější, obsahuje náš návrh užitého vzoru „Výroba surového β -glukanu z plodnic houby Hlíva ústříčná (*Pleurotus oestratus*) nebo ze substrátu po pěstování hlívy ústříčné“.

Při výrobě obilných β -glukanů se odstraňuje v procesu izolace β -glukanů hlavní podíl škrobu a obilných bílkovin. Při výrobě z plodnic hlívy ústříčné či vyplozeného substrátu po pěstování hlívy ústříčné se škrob a bílkoviny již neodstraňují, protože jejich množství je zcela zanedbatelné a nejsou žádnou škodlivou nebo nebezpečnou složkou.

Další vedlejší složkou izolovaných surových β -glukanů jsou arabinoxylany. Jsou to také polysacharidy s identickými monomery, mohla by tedy patřit do skupiny homopolysacharidů čili homoglykanů. V této skupině tvoří arabinoxylany podskupinu polymerů s názvem „pentosany“ protože základní jednotkou jejich stavby je pentósa, a to D-xylosa. V postranním řetězci je přítomna L- arabinosa. Proto arabinoxylany patří do skupiny heteropolysacharidů čili heteroglykanů.

Arabinoxylany stejně jako jiné polysacharidy jsou polydispersní látky, protože jsou směsí polymerů o různém stupni polymerace a mají tedy určitou průměrnou molekulovou hmotnost. Druh monosacharidových jednotek, jejich konformace a způsob vzájemné vazby mají vliv na konformaci makromolekuly, tzv. „sekundární strukturu“ glykanu. Hlavními stavebními jednotkami arabinoxylanů je

α -L-arabinofuranosa (α -L-Araf)
 β -L-arabinopyranosa (β -L-Arap)
 α -D-xylopyranosa (α -D-Xylp)

A jsou proto podobné rostlinným gumám a pektinům. Hlavním zdrojem arabinoxyfanů je pšenice a žito (v pšeničné mouce 1-3 %).

Heteroxyfanly jsou hlavními polysacharidy primárních buněčných stěn jednoděložných rostlin a lignifikovaných buněk jednoděložných i dvouděložných rostlin, např. v kukuřičné hmotě klasů tvoří 20-35 % všech polysacharidů. Stěny buněk endospermu většiny obilovin obsahují 60-70 % arabinoxyfanů.

Z těchto důvodů jejich přítomnost jako znečišťující součásti izolovaných surových β -glukanů vůbec nepřekvapuje.

Je možno je prakticky úplně odstranit několikrát opakovanou isolační operací včetně srážení β -glukanu isopropanolem, kterou jsme popsali v užitém vzoru č. 18765. Tím však pracnost izolace a tím i výtěžky produktu ekonomiku výroby prudce zhoršují a bylo by tak možné velmi snadno dospět sice k dokonale čistému, ale finančně téměř nedostupnému preparátu.

Všimněme si tedy vlastností arabinoxyfanů: mají vysokou schopnost vázat vodu (15-100 g H₂O/1 g sušiny), tvoří mimořádně viskozni disperze, oxidací dávají měkké a elastické gely. Vazba vody vyvolává potřebu vyprazdňování tlustého střeva, zvětšuje objem stolice, působí proto jako slabé projímadlo a zabraňuje vzniku zácpy. Arabinoxyfanly mají tedy typické vlastnosti rozpustné vlákniny, s příznivým vlivem na metabolismus cukrů a lipidů - jsou proto prospěšné při prevenci a léčbě aterosklerózy, diabetu a obezity. Prakticky v účincích podporují hlavní význam β -glukanů. Urychlují průchod tráveniny střevním traktem a to je významné i z hlediska odstraňování škodlivých látek, vznikajících trávením, z těla. Arabinoxyfanly stejně jako β -glukany a další složky rozpustné vlákniny zvyšují pocit sytosti, snižují příjem potravy a tím i celkový energetický příjem (STRATIL 1993).

Z těchto důvodů jsme se rozhodli arabinoxyfanly ze surového β -glukanu neodstraňovat, naopak jejich příznivých vlastností využít.

Předmět užitného vzoru

Surový β -glukan z obilných surovin izolovaný z ječmene a ova (viz nově předkládaný užitný vzor na potravinářskou surovinu se zdrojem β -glukanů) podle užitného vzoru č. 18765 z 4. 8. 2008 a převedený do formy viskózního roztoku ultrazvukovou desintegrací ve vodě se směsí se stejným množstvím surového houbového β -glukanu ze substrátu po pěstování hlívy ústříčné převedeného na viskózní roztok stejným způsobem (viz nově předkládaný užitný vzor „ Výroba surového β -glukanu z plodnic houby Hlíva ústříčná nebo ze substrátu po pěstování hlívy ústříčné“) v poměru sušin 1:1, okyselí se přidavkem 2 g kyseliny citrónové na 1 l směsi, přidá se 3 ml jahodového aroma fy. METAROM, Tábor zn. LM 4835, 2 ml 4 % vodního roztoku červeného barviva „ jahoda“ do zmrzlin fy. AROCCO Praha na 1 l směsi a obohatí se 50 g fruktózy/1 l. Směs se stočí do lahve a pasteruje se 15 minut při 95 °C. Dodává se v lahvích nejlépe objemu 100 ml s etiketou, udávající obsah celkové sušiny a obsah sušiny celkových β -glukanů (obilných i houbových) v 100 ml.

Roztok je možno použít i k plnění želatinových kapslí s denním množstvím minimálně 3 g sušiny β -glukanů/den.

Informace pro obchodní sféru

„Výrobky z ova a ječmene“

Výrobky z ova jsou z hlediska lidského zdraví vysoce ceněny už dávno. Známý léčitel farář Kneipp považoval ovesný nápoj s medem za vynikající lék pro osoby, zotavující se z těžkých operací, chorob, ale také pro neurasteniky a vyčerpané jedince – ať z důvodů fyzických či psychických. Český léčitel Petr Mikeš ze šumavských Čestic měl svůj předpis na posilující „ovsovku“ a pokračoval tak v myšlenkách léčitele Kneippa. Úspěch ovesných produktů v péči o lidské zdraví však nezůstal jen v zájmu lidových léčitelů, ale vyvolal i zájem vědeckých pracovišť o vysvětlení příčin příznivého působení ova. Na základě prací z těchto pracovišť získaly výrobky z ova jako první potraviny v USA povolení, aby na jejich etiketách směl být uváděn jejich zdravotní přínos – snížení rizika srdečně

cévních chorob. Vědecké práce totiž prokázaly, že konzumace výrobků z ovsu snižuje krevní hladiny celkového a LDL cholesterolu a při tom neovlivňuje hladinu žádoucího HDL cholesterolu. Později se zjistilo, že výrobky z ovsu mají rovněž schopnost snižovat hladinu glukózy v krvi a stávají se tak významnou složkou diety při cukrovce.

Účinnou složkou výrobků z ovsu, která má vliv na tak závažná onemocnění v období prevence i již probíhající choroby, jsou β -glukany. Později prokázaly pokusy na zvířatech, že β -glukany mají další důležitou vlastnost: jsou antinutričním faktorem, ve střevním traktu bobtnají, zvyšují viskozitu tráveniny a tím zhoršují pohyblivost živin i trávicích enzymů. Tím zhoršují možnost využití živin, zejména tuků. β -glukany, vlastně smíšené β -(1 \rightarrow 3),(1 \rightarrow 4)-D-glukany jsou polysacharidy tvořené β -D-glukopyranosou, která je asi ze 30 % vázána glykosidickými vazbami (1 \rightarrow 3) a převážně vazbami (1 \rightarrow 4). Patří mezi tzv. „neškrobové polysacharidy“ označované jako NSP (non-starch polysacharides) a jsou považované za vlákninu.

Celkový obsah β -glukanů v ovsu kolísá většinou v intervalu 2,4-4,2 % hm. v sušině. Z toho rozpustných β -glukanů je průměrně 80 %, ale interval je dosti široký (65-90 %). Obsah β -glukanů v ovsu je závislý především na odrůdě. Kromě odrůdy má na obsah β -glukanů prokazatelný vliv také soubor půdně-klimatických podmínek, úroveň hnojení nikoliv. β -glukany ovsu (ale i ječmene) mají řadu příznivých účinků ve výživě, které jsou charakteristické pro vlákninu, omezují riziko výskytu rakoviny tlustého střeva, jsou prevencí proti cukrovce, zácpě i obezitě. Na druhé straně snižují využitelnost živin a tím snižují nutriční hodnotu přijímané potravy. To může být značná výhoda pro jedince, jejichž příjem energie v stravě je vyšší, než výdej. Tedy pro jedince s omezeným pohybem, pro duševně pracující, pro všechny, kteří mají sklon k otylosti.

významnou vlastností β -glukanů a důvodem, proč jim je věnováno tolik pozornosti, jsou jejich fyziologické účinky. β -glukany patří do skupiny fyziologicky účinných látek, které se souborně označují jako modifikátory biologické odpovědi (biological response modifiers, BRMs). Modifikátory biologické odpovědi lze podle mechanismu účinku rozdělit v zásadě na dvě skupiny – cytokininy a imunomodulátory, ovlivňující funkci imunitního systému, buď pozitivně (imunopotenciace) nebo negativně (imunosuprese). Mezi mnoha dosud známými a vyzkoušenými imunomodulátory první skupiny zaujímají významné místo

polysacharidy izolované z různých rostlinných druhů. Do této skupiny náleží i β -glukany.

Vlastní historie použití polysacharidů jako imunomodulátorů sahá do čtyřicátých let minulého století, kdy Shear se spolupracovníky popsal látku – z kultury *Serratia marescens*, která způsobovala nekrózu tumorů. později tato látka (tzv. Shearův polysacharid) byla identifikována jako směs tří polysacharidů, obsahujících hlavní řetězec z D-glukanových a D-manozových zbytků vázaných (1→3) glykosidovými vazbami.

Počátky výzkumu β -glukanů spadají do šedesátých a sedmdesátých let minulého století. V historii β -glukanů lze vystopovat dvě linie, vycházející z odlišných východisek, ale postupně konvergující: první probíhala především v USA a také v Evropě, druhá v Asii, především v Japonsku. Výzkum β -glukanů v euro americkém prostředí vycházel z poznatků o imunomodulačním účinku zymosanu, což je směs polysacharidů izolovaná ze stěn kvasinek *Saccharomyces cerevisiae*. Při hlubším zkoumání byl jako primární účinná složka identifikován právě β -glukan.

V Japonsku k β -glukanu dospěli poněkud odlišným způsobem. V asijské medicíně má velmi dlouhou tradici konzumace různých léčivých hub (shiitake, maitake, reishi a další). Podobným zkoumáním biologických efektů, zejména antikancerogenních účinků těchto hub byl opět jako hlavní příčina nespecifické imunomodulace zajištěn β -glukan.

Hlavní imunofarmakologické aktivity β -glukanů zahrnují zvýšení rezistence hostitele vůči virovým, bakteriálním, fungálním a parazitárním infekcím, protinádorový efekt a prevenci karcinogeneze a radioprotektivní účinky; v Japonsku se využívá fungálních β -glukanů (lentinan, schizophyllan) při léčbě rakoviny klinicky. Je známa projektivní role β -glukanů vůči genotoxickým účinkům některých protirakovinových léčiv.

V poslední době se rovněž prokázalo, že β -glukan může mít významný efekt při profylaxi následků použití biologických zbraní, především nákazy anthraxem. Významný je účinek obilovin (ječmen, oves) a jedlých hub, daný obsahem β -glukanů, na snižování hladiny sérového cholesterolu a jaterního lipoproteinu, vedoucí ke snižování rizika aterosklerózy a onemocnění srdce. Je známo, že obilniny, houby a kvasinky podporují střevní motilitu a mohou být využity k zlepšení intestinálních potíží, zejména obstipace, nestravitelné β -glukany

představují významnou složku těchto látek, mohou rovněž modulovat mukosální imunitu střevního traktu. V centrálním nervovém systému β -glukany aktivují mikrogliové buňky; mikroglia hrají významnou úlohu při ochraně před onemocněním Alzheimerovy choroby nebo AIDS.

Možné účinky β -glukanů v makroorganismu jsou tedy velmi rozmanité a zasahují nejen imunitní systém, pravděpodobně je však většina popsanych účinků určitým způsobem s funkcí imunitního systému více či méně spojena. V projevech biologické aktivity β -glukanů se nejvíce uplatňují makrofágy, které jsou považovány za základní výkonné Buňky v obraně hostitele proti bakteriím, prvokům, virům více buněčným klonům.

Závěrem tedy můžeme poznatky o β -glukanech shrnout takto:

1. Co jsou β -glukany?

Jsou to polysacharidy, které patří mezi hemicelulózy, tedy vlákninu. Některé z nich jsou rozpustné, jiné nerozpustné, tvoří tedy rozpustnou i nerozpustnou vlákninu. Jsou řazeny do skupiny neškrobových polysacharidů (NSP), a protože zhoršují využití živin, patří také do skupiny antinutričních polysacharidů. β -glukany ovesných otrub se nazývají „ovesná guma“.

2. Jaké jsou jejich účinky na lidský a zvířecí organismus?

- a) Působí vyšší viskozitu a objem střevního obsahu a tím:
 - 1) se sníží pohyblivost substrátů trávicích enzymů i emulgujících žlučových kyselin, a tak se zhorší podmínky pro kontakt s povrchem střevní mukózy a pro vstřebávání živin.
 - 2) snižuje se možnost styku reakčních složek ve střevech, včetně emulgace tuků, tím klesá jejich využitelnost, pokud jsou nasycené, tím více.
 - 3) snižuje se příjem potravy omezením hladu, zvyšuje se spotřeba vody, zvyšuje se obsah vody ve výkalech, horší využitelnost všech živin (nejen tuků) vede k poklesu hmotnosti.
- b) S trávicími enzymy tvoří komplexy, a tím snižují jejich aktivitu. Důsledkem je opět větší pokles využitelnosti živin stravy.

- c) Mění se mikroflóra tenkého střeva – množí se bakterie, které zkvašují sacharidy na těkavé mastné kyseliny. Tím množství využitelných sacharidů v organismu klesá. Proto klesá také obsah krevního cukru (glukózy).
- d) Dochází ke zvýšené sekreci střevní mukózy, zřejmě jako důsledek zvýšení viskozity střevního obsahu. Tím se zvýší odpor vůči transportu nepolárních živin přes vodní vrstvu na povrch epitelu buď zvětšením její tloušťky nebo kombinací se změnou fyzikálně-chemických vlastností slizové vrstvy. Může dojít ke změnám morfologie střevních klků a mikroklků. Důsledkem je opět ztížené využití živin potravy.
- e) Vliv na metabolismus tuků vede ke snížení hladiny krevního cholesterolu. To se uplatňuje jako prevence cévních, cévně-mozkových a cévně-srdečních onemocnění. Proto výrobky z ovsu byly v USA první potraviny, které mohly být na etiketách přímo označovány jejich zdravotním přínosem – snížením rizika srdečně-cévních chorob.

3. Jak se β -glukany rozkládají?

V rostlinných materiálech jsou poměrně rychle rozkládány hned třemi enzymy:

endo- β -(1 \rightarrow 3), (1 \rightarrow 4)glukanázou

endo- β -(1 \rightarrow 3)glukanázou

β -glukosidázou

Proto při výrobě musí být tyto enzymy rychle inaktivovány vyšší teplotou. Ta je však po určitou dobu nutná, aby došlo k hydrolýze frakce glukánů vázaných na proteiny karboxypeptidásami. Tato frakce je nerozpustná a váže tak značné množství aktivních β -glukánů.

V živočišných organismech, kde rozkládané enzymy nehrají roli, je skupina β -glukánů naopak velmi stálá. Protože podporují zánětlivé procesy, mohlo by to u jedinců se zánětlivým onemocněním vyvolat nežádoucí komplikace a problém, jak přebytek β -glukánů z organismu odstranit. To však jen při

injekčním podání. U orální cesty toto nebezpečí nehrozí – β -glukany tělem volně procházejí.

4. β -glukanům ovsa a ječmene jsou příbuzné β -glukany kvasinek, plísní a vyšších hub.

Ty mají navíc účinky antibakteriální, antivirální, antikoagulační a hlavně antikancerogenní. Posilují imunitní systém a inhibují růst nádorů. Bohužel β -glukany ovsa a ječmene tyto vlastnosti nemají.

3. Návrh na užžitný vzor

„Beta-glukanové knedlíčky ve švestkové omáče“

Úvod

Vážení zákazníci, na trh přichází nový výrobek, který patří už do skupiny tzv. „funkčních potravin“. Ty by Vás měly nejen nasycit, ale aktivně přispět k zlepšení Vašeho zdraví. Účinnou látkou jsou v novém výrobku beta-glukany. Není to žádná chemie, ale zcela přirozené, přírodou vytvořené látky, které jsou vlastně vlákninou (jsou to neškrobové polysacharidy) a mají dvě vědeckými studii bohatě doložené vlastnosti: Snižují obsah cukru v krvi a současně snižují hladinu cholesterolu v krvi. Chrání nás tedy proti cukrovce i proti ateroskleróze a dalšími cévními chorobami. Beta-glukany jsou obsaženy ve větším množství v některých odrůdách ovsa – ale jen v podpovrchových vrstvách obilky a v některých odrůdách ječmene. Mají i další významnou vlastnost: omezují využití tuků a částečně i cukrů v organismu, patří proto mezi tzv. „antinutriční faktory“. To znamená, že při dostatečném příjmu (3 g denně) mohou zabránit tomu, abychom ztloustli. Bohužel, tento efekt byl vědecky dokázán jen na zvířatech, na prasatech a drůbeži. Experimenty s lidskými konzumenty zatím uveřejněny nebyly.

Nečekejte ale, že když si koupíte 1x za měsíc naše β -glukanové knedlíčky, že Vám hned klesne cukr nebo cholesterol, nebo že dokonce zhubnete. Důležité je, aby přísun do organismu byl třeba malý, ale dlouhodobější. Protože při neustálé konzumaci našich knedlíčků by se Vám přejedly, střídejte je s různými pokrmy z ječné mouky, ječných a ovesných vloček. V Maroku, Etiopii, Alžíru, Iráku a

Afghanistanu je spotřeba ječmene vysoká, a proto výskyt civilizačních chorob je nízký. V ČR se zatím na přímý konzum spotřebuje jen 0,5 % produkce ječmene a ječnou mouku u nás budete obtížně shánět. Ale snadno si ji připravíte rozemletím ječných krup, krupek či lámanky na tříštivém mlýnku každého kuchyňského robotu. Ale pozor! Nepoužívejte krupici a dětskou krupičku, ty jsou z pšenice!

Závěrem lze říci jen to, že citát F. O. Poupe (1753-1805) „Ječmen na pivo, pšenice na koláče, oves pro koně“ už dávno neplatí. Americký úřad pro kontrolu potravin a léčiv (FDA) pro zdravou výživu doporučuje pouze dva druhy cereálií – oves a ječmen.

β-glukanové knedlíčky ve švestkové omáčce – pracovní postup

Na sucho se smísí směs 3,2 kg ječné mouky, 0,8 kg bílkovino-β-glukanového koncentrátu (viz v dalším textu užitiný vzor : „Ječmenová biorafinerie s výrobou proteino-β-glukanového koncentrátu k výrobě funkčních potravin, kvasničné bílkoviny, bioetanolu a krmiva pro skot a drůbež“), 0,15 kg kukuřičného škrobu „Gustin“ fy Dr. Oetker, 0,10 kg soli, 0,12 kg kypřicího prášku fy Dr. Oetker.

V mísícím stroji se přidá směs 20ks rozšlehaných vajec, 300 ml slunečnicového oleje a 5 kg měkkého tvarohu.

Po homogenizaci se směs vpustí do knedlíčkovače, po vytvoření knedlíčků se výrobek umístěný na drátěných sítích uvaří v parním vařáku parou během 7-10 minut.

Hotový výrobek se plní do průhledných termoplastových misek spolu se švestkovou omáčkou tohoto složení: 1,2 kg švestkových povidel, 0,6 kg cukru krupice, 3,75 l vody, 15 g kyseliny citrónové, 30 g mleté skořice, 25 g celých hřebíčků, 0,6 l studené vody s rozmíchaným malinovým pudingovým práškem Dr. Oetker v množství 140 g.

Omáčka se rozváří po dobu 10 minut a za horka se plní do odděleného prostoru obalové misky knedlíčků.

V plnicím stroji se miska naplní dusíkem a zavaří neprodyšně foliovým víkem.

Po zchladnutí se výrobek skladuje v chladicí skříni při teplotě do + 10 °C.

Předmět posledního užitého vzoru β -glukanové knedlíčky, byl již vyzkoušen v průmyslové výrobě JEDNOTY v Týně nad Vltavou s vynikajícím výsledkem. Výrobek byl balen v 250g dávkách v ochranné atmosféře N_2 a byl zařazen do pokusného prodeje. Bohužel jeho výrobní cena byla o několik korun vyšší než výrobku „Babiččiny knedlíčky“ t.j. výrobku z tvarohového těsta bez β -glukanů. Zákazníci na letáky s vysvětlením významu β -glukanů pro vlastní zdraví nedali nebo je obtěžovalo tyto tiskoviny číst – zájem o výrobek neměli, ačkoliv chuťové a senzorické hodnocení na výstavě ZEMĚ ŽIVITELKA v Českých Budějovicích v létě 2010 dopadly výborně. Podle mikrobiologických zkoušek požadovaná trvanlivost výrobku (pět týdnů) byla více než dvojnásobná, ale zákaznický nezáměr nedovolil výrobě potravin JEDNOTA zahájit běžnou velkovýrobu. Ostatně v současné době propadl nezáměr i srovnatelný výrobek bez β -glukanů a je vyprodáván s 50% snížením prodejní ceny.

4.4. Stanovení molekulové hmotnosti β -glukanů viskozimetrem dle Ubellohde

Úvod

Viskozita kapalin (i plynů) se projevuje při jejich toku a vysvětluje se představou o posouvání rovnoběžných vrstev kapaliny, při kterém se uplatňuje vnitřní tření mezi těmito vrstvami. Viskozita kapalin je řádově větší než u plynů a je charakterizována koeficientem η . Význam tohoto koeficientu je zřejmý ze vztahu:

$$f = \eta A \frac{du}{dx}$$

f = síla, která udržuje rozdíl rychlostí du [cm/sek] mezi rovnoběžnými vrstvami kapaliny o stykové ploše A [cm²], jež se po sobě posouvají ve stejném směru a jež jsou od sebe vzdáleny dx [cm] (BRDIČKA 1952).

Pro $A = 1 \text{ cm}^2$ a $(du/dx) = 1 \cdot \text{sec}^{-1}$ se tato síla rovná právě koeficientu viskozity η , jehož jednotkou je poise, t.j. dyn. sec/cm². Reciproká hodnota viskozity udává tzv. „fluiditu“ kapaliny, jejíž mírou je koeficient fluidity $\varphi = \frac{1}{\eta}$.

Na vnitřním tření závisí objem kapaliny V , který proteče kapilární trubicí o délce l a poloměru kapiláry r za čas t při tlakovém rozdílu na koncích kapiláry P . Na základě představy, že kapalina proudí trubicí v koaxiálních válcových vrstvách, kterým přibývá na rychlosti od stěny ke středu trubice, odvodil Poiseuille vztah, který je znám jako Poiseuilleův zákon:

$$\eta = \frac{t}{V} \cdot \frac{\pi P r^4}{8l}$$

Umožňuje stanovit koeficient viskozity η .

Viskozita kapalin se mění poměrně značně s teplotou. Změnu viskozity kapalin s teplotou lze vyjádřit empirickým vztahem:

$$\log \eta = \frac{A}{T} + B$$

kde A , B jsou individuální konstanty pro danou kapalinu.

Měření viskozity podle Poiseuilleova zákona lze provést tak, že se měří objem kapaliny, který proteče za určitý čas standardní kapilárou (se známou délkou, poloměrem) při známém přetlaku. Častěji se ale provádí měření relativní, při kterém se stanoví poměr viskozit dvou kapalin. Je-li viskozita jedné ze srovnávaných kapalin známa, vyplývá z určeného poměru viskozit viskozita druhé kapaliny.

K měření se používají průtokové kapilární viskozimetry, nejjednodušší je Ostwaldův, na mém pracovišti je poněkud dokonalejší viskozimetr dle Ubbelohdeho. Princip měření je stejný:

Přesně odpipetovaný objem kapaliny se nalije do přístroje, podtlakem se nasaje kapalina do kapilárního ramene nad horní značku a měří se čas, za který proteče rozhraní kapaliny od horní k dolní značce. Viskozimetr musí být v termostatu s konstantní teplotou $\pm 0,1$ °C. Koeficient η je úměrný době t , za kterou proteče určený objem kapaliny standardní kapilárou a také specifické hmotnosti kapaliny S , protože přetlak zde je dán jejím hydrostatickým tlakem:

$$\eta = C s t$$

kde C je konstanta, závislá na rozměrech přístroje. Tuto konstantu lze stanovit pro každý konkrétní přístroj z měření, provedeného s kapalinou o známé viskozitě. Lze ji ale zcela eliminovat při srovnávání viskozit dvou kapalin. Je-li známa hodnota η_0 pro jednu kapalinu, jejíž specifická hmotnost je S_0 a doba průtoku t_0 , platí pro koeficient viskozity η srovnávané kapaliny:

$$\eta = \eta_0 \cdot \frac{S \cdot t}{S_0 \cdot t_0}$$

Za standardní kapalinu lze běžně používat vodu, jejíž viskozita při 20 °C je 0,01 poise.

Místo absolutní viskozity se často udává viskozita relativní, vztahující se k viskozitě vody a ta se klade rovna 1.

Metodika

Viskozita zředěných roztoků polymerů je za stálé teploty v prvním přiblížení závislá pouze na délce řetězce, na molekulové hmotnosti makromolekul. Viskozimetrických měření lze tedy využít i pro stanovení průměrné molekulové hmotnosti vysokomolekulárních látek.

Používá se k tomu většinou stanovení absolutní viskozity kapaliny podle

Poisenillova vzorce, ale viskozita relativní η_{rel} :

$$\eta_{rel} = \frac{\eta}{\eta_0} = \frac{t}{t_0}$$

Relativní změna viskozity, vyvolaná rozpuštěním nějaké látky v rozpustidle, se označuje jako „specifická“ viskozita η_{sp} :

$$\eta_{sp} = \frac{\eta - \eta_0}{\eta_0} = \eta_{rel} - 1$$

Pro roztoky lineárních polymerů platí Staudingerův vztah mezi specifickou viskozitou roztoku a molekulovou hmotností rozpuštěného polymeru:

$$\lim_{c \rightarrow 0} \frac{\eta_{sp}}{c} = K_m \cdot \frac{M}{M_o} = K_m \cdot P$$

kde je

η_{sp} = specifická viskozita roztoku

c = koncentrace roztoku (g/l)

M = průměrná molekulová hmotnost polymeru

M_o = molekulová hmotnost základní stavební jednotky

P = polymerační stupeň

K_m = empirická konstanta, charakteristická pro danou látku a rozpustidlo.

Symbol „ \lim “ naznačuje, že tento vztah je platný jen v extrémně zředěných

roztocích. Proto se hodnoty $\frac{\eta_{sp}}{c}$, změřené v zředěných roztocích, graficky

extrapolují na nulovou koncentraci. Takto získaná mezní hodnota $\lim_{c \rightarrow 0} \frac{\eta_{sp}}{c}$, která

se označuje jako „vnitřní viskozita $[\eta]$ “, se pak používá k výpočtu polymeračního stupně.

Pracovní postup

1. 5 baněk označit čísly: 1, 2, 3, 5, 7 (znamená to koncentraci v g/l).
2. Do kádinky 1 navážit 0,05 g β -glukanu.
Do kádinky 2 navážit 0,10 g β -glukanu.
Do kádinky 3 navážit 0,15 g β -glukanu.
Do kádinky 4 navážit 0,25 g β -glukanu.
Do kádinky 5 navážit 0,35 g β -glukanu.

3. Do všech kádinek přilít asi 30 ml destilované vody teplé 20 °C a β -glukan rozpustit.
4. Obsah kádinek kvantitativně převést do odměrných baněk a destilovanou vodou doplnit na 50 ml ke značce.
5. Viskozimetr se nejprve propláchne vodou.
6. Postranní trubice viskozimetru se uzavře (prstem či gumovou hadičkou s tlačkou) a vodní vývěvou se prosaje viskozimetrem směs 1 g KM_nO_4 v 100 ml konc. H_2SO_4 .
7. Viskozimetr se pak několikrát propláchne vodou. Na povrchu skla se nesmí tvořit kapičky, ale souvislý vodní film! (Místo s $\text{KM}_n\text{O}_4 + \text{H}_2\text{SO}_4$ je možno pracovat s teplou vodou s Jarem).
8. Viskozimetr se nesuší. Pokud se s ním hned nepracuje, tak se naplní destilovanou vodou a položí se do stojánku. Se stojánkem se dá do termostatu při 20 °C.
9. Měření:
 - a) Nejdříve se měří čisté rozpustidlo. Pipetou se odměří do viskozimetru tolik vody, aby banička pod kapilárou byla naplněna asi do 2/3, ne více.
 - b) Na rameno s kapilárou se nasadí gumová hadička, prstem se uzavře boční tenké rameno a kapalina (voda) se nasaje až do 1/2 horní menší baničky.
 - c) Přestaneme sát, tím se odtrhne spodní hladina, odstraníme hadičku a změříme čas, kterého je třeba k průchodu hladiny kapaliny mezi oběma ryskami viskozimetru. Čas se měří s přesností 0,1 sek. Měří se 5x, bere se průměr.

10. Měření roztoků:

- a) Odměrná baňka s roztokem 1 se protřepe, několika ml roztoku se viskozimetr propláchne. Pak se to opakuje dalšími několika ml tohoto roztoku.
- b) Viskozimetr se naplní roztokem 1 stejným postupem, který byl popsán u vody (viz 9. a,b,c).
- c) Pak se měří roztok 2, 3, 4, 5, 7 a vždy se novým roztokem viskozimetr 2x propláchne. Na mytí se užije 2x asi 10 ml roztoku.

11. Výpočet:

- a) Z průměrů výtokových časů vypočítáme relativní viskozitu η_{rel} :

$$\eta_{rel} = \frac{t}{t_0}$$

t = doba výtoku roztoků

t₀ = doba výtoku vody

Tu vypočítáme pro všechny roztoky, č: 1, 2, 3, 4, 5 a 7.

- b) Nyní pro všech 5 roztoků spočítáme specifické viskozity η_{sp} :

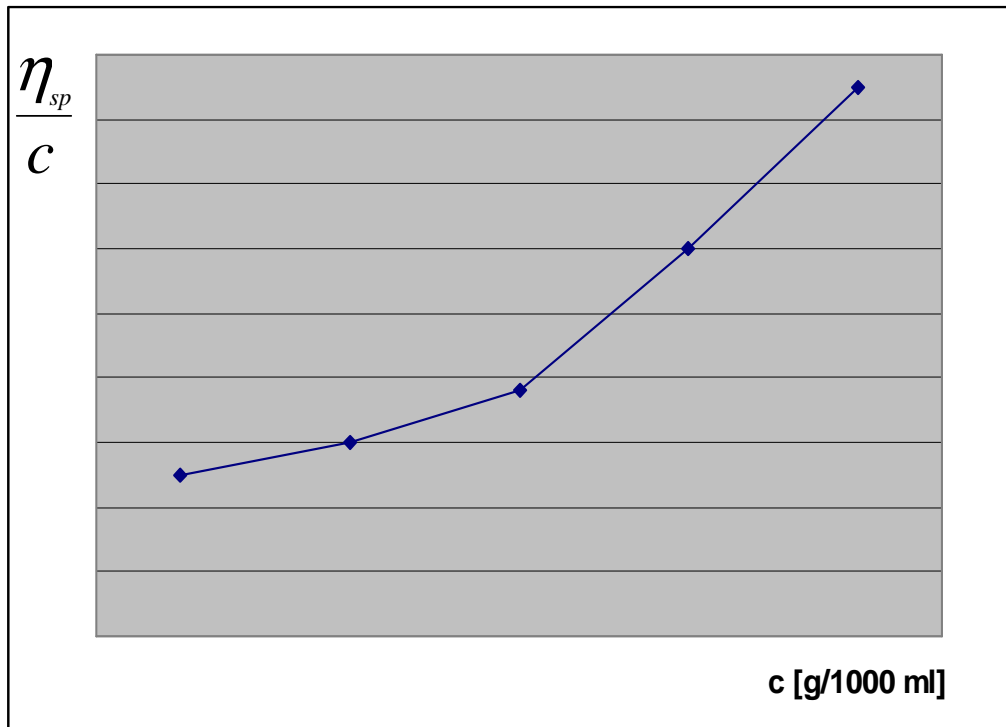
$$\eta_{sp} = \eta_{rel} - 1$$

- c) Nyní vypočítáme hodnotu podílu $\frac{\eta_{sp}}{c}$ pro všech 5 roztoků. Tedy:

$$\frac{\eta_{sp}}{1} \quad \frac{\eta_{sp}}{2} \quad \frac{\eta_{sp}}{3} \quad \frac{\eta_{sp}}{5} \quad \frac{\eta_{sp}}{7}$$

d) Sestrojíme graf:

Graf č. 1: Graf $\frac{\eta_{sp}}{c}$ proti c (extrapolací křivky na $c = 0$ odečteme $[\eta]$).



Hodnoty $\frac{\eta_{sp}}{c}$ pro několik různých koncentrací graficky vyneseme

proti c , pak extrapolace křivky na $c = 0$, tam odečteme limitní

hodnotu: $\lim_{c \rightarrow 0} \frac{\eta_{sp}}{c} = [\eta]$

e) Konečně vypočteme molekulovou hmotnost β -glukanu:

$$M = \frac{[\eta]}{K_m} \cdot M_o$$

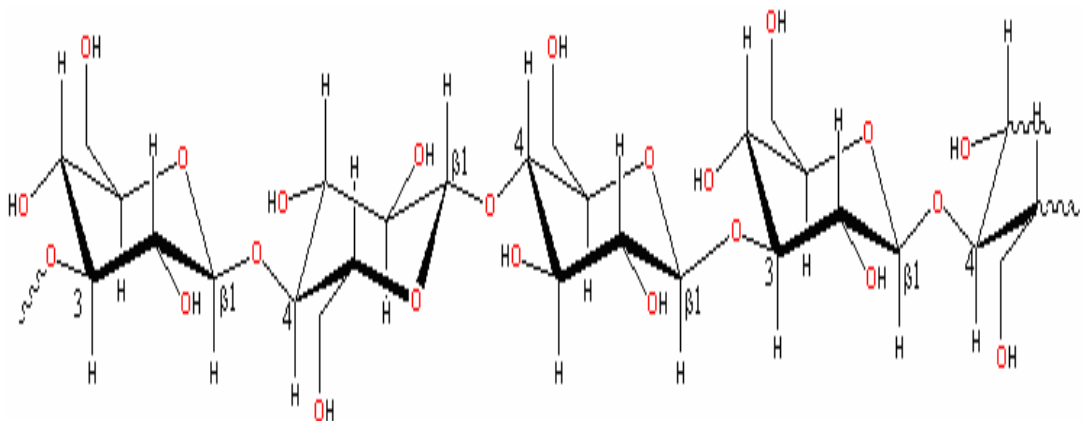
η je limitní hodnota odečtená z grafu při $c = 0$

K_m je konstanta, $11 \cdot 10^{-5}$

M_o je molekulová hmotnost monomeru

β -glukanový monomer je toto:

Obrázek č. 3: **Struktura β -D-glukanového monomeru (CHAPLAIN 2002).**



tedy $M_o = 628$

Výsledky

Tabulka č. 3: Porovnání výsledků měření molekulové hmotnosti 10 vzorků z různých výrobních šarží β -glukanů z ječmenové biorafinerie viskozimetrickou metodou s výsledky objednaných analýz z VŠCHT Praha, provedených gelovou chromatografií. (Interval spolehlivosti průměru $L_{1,2}$ byl vypočítán pro hladinu významnosti $\alpha = 0,95$, směrodatná odchylka rozpětí R ($S_{\bar{R}}$), pro $n = 10$, $k_n = 0,3249$).

číslo vzorku	viskozimetrická metoda		metoda gelové chromatografie	
	molekulová hmotnost [g/mol] 10^6	interval spolehlivosti průměru $L_{1,2}$ pro $\alpha = 0,05$	molekulová hmotnost [g/mol] 10^6	interval spolehlivosti průměru $L_{1,2}$ pro $\alpha = 0,05$
1	1,65	$\bar{x} \pm 0,11$	2,03	$\bar{x} \pm 0,09$
2	1,54	$\bar{x} \pm 0,10$	1,91	$\bar{x} \pm 0,08$
3	1,27	$\bar{x} \pm 0,13$	2,23	$\bar{x} \pm 0,09$
4	1,38	$\bar{x} \pm 0,08$	2,14	$\bar{x} \pm 0,10$
5	1,35	$\bar{x} \pm 0,11$	1,85	$\bar{x} \pm 0,08$
6	1,44	$\bar{x} \pm 0,11$	1,92	$\bar{x} \pm 0,10$
7	1,5	$\bar{x} \pm 0,09$	1,98	$\bar{x} \pm 0,08$
8	1,39	$\bar{x} \pm 0,09$	1,95	$\bar{x} \pm 0,07$
9	1,48	$\bar{x} \pm 0,12$	2,06	$\bar{x} \pm 0,10$
10	1,46	$\bar{x} \pm 0,14$	1,94	$\bar{x} \pm 0,11$
\bar{x}	1,45	-	2	-
R	0,38	-	0,29	-
$S_{\bar{R}}$	0,123	-	0,094	-

Analýzy jednotlivých vzorků byly 5x opakovány u vlastního stanovení ($K_m = 0,51$) a 4x u objednaného stanovení gelovou chromatografií ($K_m = 0,92$).

Tabulka č. 4: Analýza jednoho vzorku β -glukanů z ječmenové biorafinerie 10x opakovaná v porovnání viskozimetrické a chromatografické metody ($K_m = 0,3249$ a $K_m = 0,23$ pro $\alpha = 0,05$).

číslo vzorku	viskozimetrická metoda	chromatografická metoda
	molekulová hmotnost [g/mol] · 10 ⁶	molekulová hmotnost [g/mol] · 10 ⁶
1	1,52	2,03
2	1,54	2,08
3	1,52	2
4	1,53	2,08
5	1,51	2,05
6	1,52	2,1
7	1,54	2,07
8	1,52	2,06
9	1,5	2,05
10	1,52	2,07
\bar{x}	1,522	2,059
R	0,04	0,1
$s_{\bar{R}}$	0,013	0,032
$L_{1,2}$	$\bar{x} \pm 0,01$	$\bar{x} \pm 0,02$

Tabulka č. 5: Naměřené a vypočítané hodnoty z viskozitního měření k sestavení grafu č. 2,3 pro vzorek č. 1

c [g/mol]	$\eta_{rel} = \frac{t}{t_0}$ [sec]	$\eta_{sp} = \eta_{rel} - 1$	$\frac{\eta_{sp}}{c}$
0,05	1,0125	0,0125	0,25
0,1	1,03	0,03	0,3
0,15	1,057	0,057	0,38
0,25	1,15	0,15	0,6
0,35	1,2975	0,2975	0,85

$$\eta = \lim_{c \rightarrow 0} \frac{\eta_{sp}}{c} = 0,183$$

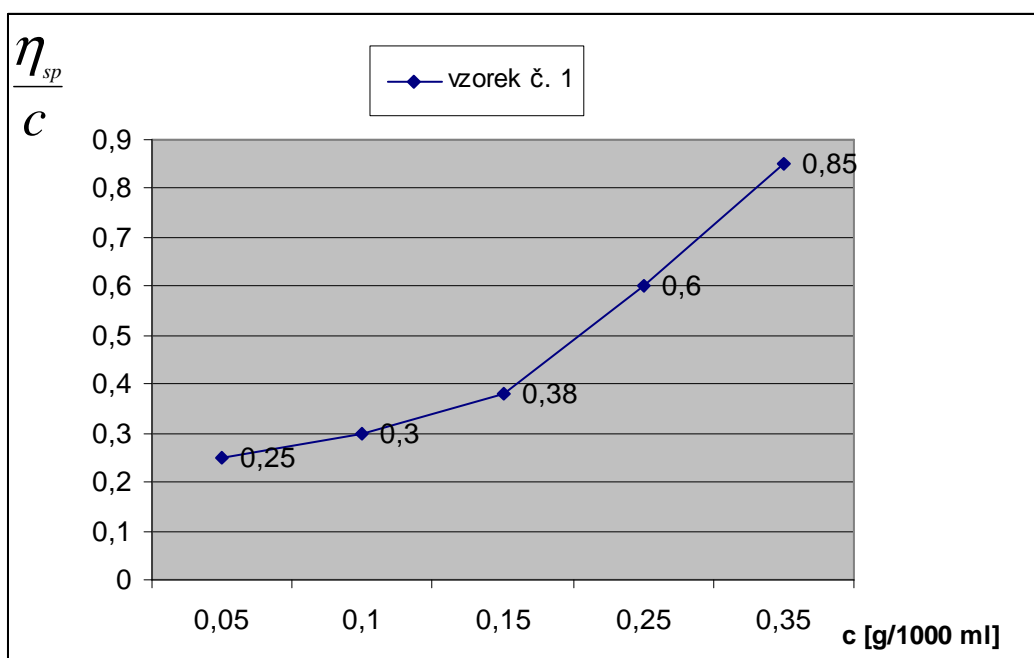
$$M = \frac{\eta}{K_m} \cdot M_0 = \frac{0,183}{11 \cdot 10^{-5}} \cdot 628$$

($K_m = 11 \cdot 10^{-5}$; $M_0 = 628$)

$$M = 1,65 \cdot 10^6$$

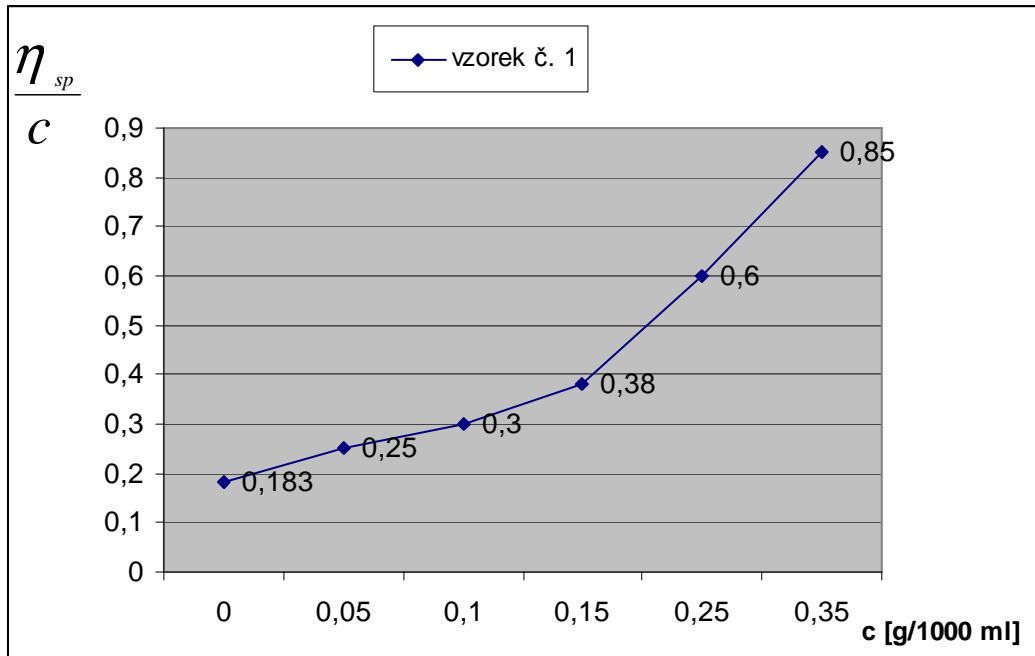
Graf č. 2: Graficky vynesené hodnoty $\frac{\eta_{sp}}{c}$ proti c [g/1000ml] β -glukanu

na příkladu vzorku č. 1 ($M = 1,65 \cdot 10^6$ g/mol).



Graf č. 3: Grafické stanovení limitní hodnoty η ($\lim_{c \rightarrow 0} \frac{\eta_{sp}}{c}$) při hypotetické

nulové koncentraci β -glukanu na příkladu vzorku č. 1 ($M = 1,65 \cdot 10^6$ g/mol).



(Grafy ostatních vzorků pro úsporu místa už nejsou v disertační práci uváděny).

Diskuse

Shodnost výsledků byla testována Lordovým testem (ECKSCHLAGER et al. 1980):

$$u = \frac{\overline{x_A} - \overline{x_B}}{R_A + R_B}$$

Kritická hodnota Lordova testu u_α pro $\alpha = 0,05$ a 10 vzorků je 0,152.

$$u = \frac{0,55}{0,67} = 0,82$$

Protože je $u > u_{\alpha}$ lze dospět k závěru, že rozdíl průměrů nalezeného množství β -glukanů oběma metodami je při $\alpha = 0,05$ statisticky významný a že tedy obě metody dávají rozdílné výsledky. Je zřejmé, že viskozimetrická metoda dává výsledky nižší.

Použitá viskozimetrická metoda zcela zjevně není správná, protože v literatuře uvedené hodnoty molekulové hmotnosti β -glukanů ječmene se pohybují okolo $2 \cdot 10^6$, tedy podobně, jako výsledky stanovené objednanou gelovou chromatografií. Ale rozpětí a směrodatná odchylka rozpětí a hlavně interval spolehlivosti průměru mé viskozimetrické metody se od standardní metody chromatografické příliš neliší a proto v souhlase se svými školiteli jsem dospěla k závěru, že tuto zdlouhavou, pracnou a zastaralou metodu v podmínkách naprosté bídy pracoviště budu moci použít k řešení změn obsahu β -glukanů při kuchyňských a potravinářských technologiích. Otázka ovšem je ta, s jakou ochotou se budu setkávat při snaze o publikaci ve vědeckých časopisech s IF při použití této metody.

4.5. Ječmenová biorafinerie s výrobou bílkovino- β -glukanového koncentrátu.

Návrh na užitný vzor

„Ječmenová biorafinerie s výrobou proteino- β -glukanového koncentrátu k výrobě funkčních potravin, kvasničné bílkoviny, bioetanolu a krmiva pro skot a drůbež“

Úvod

Obilné β -glukany (z obalových vrstev zrn ovsa a z celého endospermu zrna ječmene) mají ve vědecké literatuře mnohokrát ověřený vliv na snížení hladiny krevního cukru a na snížení hladiny škodlivého LDL (nizkohustotního) cholesterolu. Protože cukrovka (diabetes) je nemoc, která prokazatelně zvyšuje riziko pro vznik srdečně-cévních chorob (které jsou hlavní příčinou smrti), stejně

jako LDL-cholesterol v krevní plasmě, nízká fyzická aktivita, vysoký tlak, kouření, konzumace alkoholu a obezita, stres a měkká pitná voda – je zřejmé, že prakticky každý moderní člověk v civilizované společnosti se všemi nepříznivými vlivy na jeho zdraví potřebuje funkční potraviny s β -glukany a tím spíše je potřebují lidé s diabetes a nemocní, kteří trpí hyperlipidemií, tj. zvýšeným obsahem cholesterolu a triacylglycerolů (tuků) v krevní plasmě.

Prevenčí proti vzniku srdečně-cévních chorob samozřejmě nejsou jen β -glukany. Velký ochranný význam je připisován také velké skupině antioxidantů z konzumované zeleniny a ovoce (vitamin E, C, karotenoidy, fenolické antioxidanty), probiotikům a prebiotikům (acidofilní mléko, kysané mléčné výrobky, výrobky obohacené bifidobakteriemi), fytosterolům (řepkový olej a panenské – extra virgin – oleje), fosfolipidům (výrobky ze sóji), lignanům (chléb se lněnými semínky). Značný význam mají flavonoidy ze skupiny antioxidantů, jejichž nejbohatším zdrojem je červená cibule, také kapusta, z ovoce hlavně jablka (ale asi 700x méně, než v červené cibuli).

U každé látky, má-li se využít v prevenci srdečně-cévních chorob, je důležité nutné denní množství, které musí dospělý jedinec konzumovat. U obilních β -glukanů je to průměrně 3 g/den na osobu. Protože v obilkách některých speciálních odrůd ječmene je až 10 % β -glukanů a v obilkách ovsa až 7 % β -glukanů, zdálo by se, že výroba funkčních potravin s β -glukany není žádný problém. Opak je však pravdou. Speciální odrůdy ječmene, bohaté na β -glukany, jsou pro pěstitele rizikové. Jsou to tzv. „vaxy“ s voskovým typem endospermu a bezpluché odrůdy, jejich výnosy jsou zřetelně nižší, než výnosy běžných pluchatých odrůd. Odbyt pro takovou odrůdu pěstitel zajištěn nemá a proto nechce riskovat. Navíc obsah β -glukanů je velmi závislý na průběhu povětrnosti, na lokalitě, i na agrotechnice – i když vliv hnojení je malý. U ovsa je situace ještě horší, není odbyt ani pro běžné pluchaté odrůdy ovsa, pro tyto účely by bylo nutno pěstovat jen tzv. „nahý“ oves, bezpluché odrůdy, které jsou na β -glukany bohatší. Ale i zde platí pravidlo, že obsah β -glukanů v ovsu velmi kolísá podle lokality i ročníku a proto pěstování ovsa pro tyto účely představuje v drastických podmínkách zemědělské výroby v ČR pro pěstitele neúnosné riziko. Navíc oves na rozdíl od ječmene obsahuje β -glukany nikoliv v celém endospermu, ale jen v subaleuronových, podpovrchových vrstvách. Proto je velmi výhodné používat jako zdroj β -glukanů jen rozemleté podpovrchové

vrstvy ovesných obilek, v podstatě ovesné otruby. Tímto směrem jsme postupovali v předchozích letech a to velmi neúspěšně. V ČR jsme nenalezli vhodné mlecí zařízení pro výrobu takového produktu a museli jsme využívat málo produktivní zařízení starých historických mlýnů a přes všechny těžkosti i to s nepříliš povzbudivým efektem. V zahraničí, např. ve Skandinávii, je tato výroba ze speciálních odrůd zcela běžná, bohužel produkty dovážené do ČR jsou extrémně drahé; 1 kg švédského Vitalbrenu se 14 % β -glukanů se prodává u překupníků za 1 000 Kč. V českých podmínkách jsme byli rádi, když jsme alespoň nějaký nahý oves sehnali, o možnosti získat větší množství speciální odrůdy s vyšším obsahem β -glukanů nebylo ani řeči.

Chceme-li v ČR vyrábět z ječmene či ovsa β -glukany pro výrobu funkčních potravin a vyrobit základní produkt levnější, než dovozní švédský výrobek a zároveň zbavit se těžkostí se získáváním suroviny, s vyšším obsahem hledané látky, jsme limitováni takto:

- 1) Vyrábět lze jen z běžně pěstovaných ječmenů, ovsy jsou v podmínkách rostlinné výroby ČR nevýhodné, i z hlediska přístupných omílacích technologií.
- 2) Na rozdíl od jinde užívaných technologií rozpouštění a izolace β -glukanů v základní surovině musíme jít cestou rozpouštění hlavní součásti obilky – škrobu.
- 3) Kromě snížení hladiny LDL-cholesterolu a krevního cukru je známo, že β -glukany jsou antinutričním faktorem, který zhoršuje využití živin z přijaté stravy či krmiva. Bohužel to zatím nebylo prokázáno u lidí, ale u zvířat (prasat, drůbeže) zcela jednoznačně. Při zkrmování krmiv s vyšším obsahem β -glukanů jsou přírůstky hmotnosti zvířat prokazatelně nižší. Zdá se logické, že podobný efekt lze očekávat i u lidí. Protože základem odtučňovacích diet u lidí je snížený příjem tuků a sacharidů a zvýšený příjem bílkovin, jsou rostlinné bílkoviny ječmene k tomu účelu mimořádně vhodné, protože vyrovnávají nerovnováhu mezi živočišnými a rostlinnými bílkovinami u otlých, které tyto diety používají. Přebytek živočišných bílkovin by mohl vyvolat ledvinové komplikace a i z hlediska hygieny střev je jednoznačně záporný.

Proto orientujeme výrobní postup na současnou izolaci β -glukanů s ječnými bílkovinami. Biologická hodnota bílkovin ječmene je proti pšenici i kukuřici

vyšší, protože obsahují nižší podíl prolaminů a vyšší podíl esenciálních, přístupných aminokyselin.

Pracovní postup

- 1) 1 kg ječmene se rozemele na hrubou mouku. Toto množství se vloží do nádrže s míchadlem a přilije se 40 l 0,25 M NaOH.
- 2) Směs se míchá rychlostí 1–2 ot/sek při teplotě $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 4\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 60 minut. Pak se hrubá ječná drť oddělí od kapalně fáze scezením na síť s velikostí ok 0,2 – 0,5 mm.
- 3) Filtrát se přečerpá do nádoby obsahu 80–100 l, z hrubé mokré ječné drti se v nádrži s míchadlem přidá dalších 20 l 0,25 M NaOH, opět se 60 minut při teplotě $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 4\text{ }^{\circ}\text{C}$ míchá a pak se cedí sítím s velikostí ok 0,2–0,5 mm.
- 4) Ječmenná drť se několikrát promyje studenou vodou s přídavkem octa (2 – 4 %), zjisti se indikátorovým papírkem, zda už není alkalická, vysuší se a využije jako krmivo pro drůbež.

Filtrát se spojí s prvním filtrátem v nádobě o obsahu 80–100 l, promíchá se a neutralizuje zředěnou HCl (1 : 2 až 1 : 3) za stálého míchání a měření pH pH-metrem na hodnotu pH = 6,5.

- 5) Změří se přesně objem zneutralizované kapaliny. (Z původních 60 l se část kapaliny zachytila v ječmenné drti, část kapaliny naopak přibyla při neutralizaci kyselinou.)

Na každých 5 l kapaliny se přidá 0,35 g bezvodého CaCl_2 a 5 ml enzymu α -amylázy typu TERMAMYL-120 (termoodolný enzym) firmy NOVOZYMES, Dánsko. Do kapaliny se vloží teploměr a zahřívá se na teplotu $95\text{ }^{\circ}\text{C}$. Občas je nutno kapalinu promíchat. Po dosažení této teploty se kapalina udržuje při $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ celkem 60 minut (pouze s přerušáním na promíchání).

- 6) Po této době se kapalina nechá volně zchladit na teplotu $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 10\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- 7) Po ochlazení se za stálého míchání a přesného měření pH neutralizuje HCl (1 : 2 až 1 : 3) tak dlouho, až se dosáhne hodnoty přesně pH = 4,5. Nechá se v klidu do druhého dne.
- 8) Druhý den se v kapalině objeví vysrážené bílkoviny. Na každých 5 l kapaliny s vysráženými bílkovinami se přidá 5 l benzinem denaturovaného lihu (96 %),

promíchá se a zchladí na teplotu 4 °C, která se udržuje 24 hodin. (V alternativě b lze bílkoviny oddělit další filtrací.)

- 9) Vysráží se gumovitá hmota, která se spolu s již vysráženými bílkovinami oddělí filtrační plachetkou. Skvěle se osvědčila i letní dámská punčocha, rozstřížená a přetažená přes velkou skleněnou nálevku. Má výhodu v tom, že gumovité β -glukany a arabinoxylany se na ni nelepí a dokonale se oddělují. Z filtrátu se použitý líh regeneruje destilací v destilační koloně, cukry z rozštěpeného škrobu se zkvasí a vydestiluje se nový etanol.
- 10) Vlhká hmota se zváží, stanoví se obsah sušiny. Suší se v sušárně při 105 °C, pak se suchá hmota mele v mlýnku, nejlépe v tříštivém mlýnku (mlýnky na kávu u běžných kuchyňských robotů).

Příbuzné užité vzory

Výzkumný ústav potravinářský, Praha:

Užitný vzor 20056738 s názvem: Potraviny s bezpluchým ječmenem.

Úřad průmyslového vlastnictví, Praha.

Výsledky

Tabulka č. 6: **Složení vzorku použitého ječmene v sušině [%] (odrůda:**

BLANÍK).

škrob	60,0
bílkoviny	13,0
N-látky rozpustné	2,0
celulóza	5,0
pentosany	9,0
β -glukany	3,5
nízkomolekulární sacharidy (sacharóza, maltóza, glukóza, fruktóza)	2,5
tuky	3,0
minerální látky	2,0
celkem	100

Produkt v množství 13,4 % suš. původního množství rozemletého ječmene obsahuje 81,1 % bílkovin a 18,9 % β -glukanů. Denní nutná dávka tohoto produktu je 15,9 g/den pro 1 dospělou osobu.

Důležité upozornění

Nejlepší surovinou pro tuto technologii jsou ječmeny, označované jako ječmeny potravinářské, mají vyšší obsah vlákniny i β -glukanů. Méně vhodné jsou odrůdy ječmene, které se zařazují do skupiny ječmenů průmyslových (k výrobě whisky, škrobu, etanolu) a ječmeny sladovnické. Nejhorší surovinou jsou ječmeny krmné, které mají vysoký obsah bílkovin a nízký obsah β -glukanů. Ale i z těchto ječmenů lze β -glukany úspěšně vyrábět, jestliže v bodě technologického postupu č. 8 před přidáním lihu zařadíme další filtraci plachetkovým filtrem a oddělíme vysrážené ječné bílkoviny. Tím sice konečný produkt ztratí bílkovinou část bílkovino- β -glukanového koncentrátu, což podle našeho názoru je škoda, ale koncentrace β -glukanů v konečném produktu se prudce zvýší na hodnotu 80 – 90 %. Jeho výtěžek bude samozřejmě menší, zhruba 20 % obvyklého množství. Ale denní nutná dávka pro osobu a den se naopak podstatně sníží a bude se pohybovat v intervalu 3 – 5 g/den pro 1 dospělou osobu.

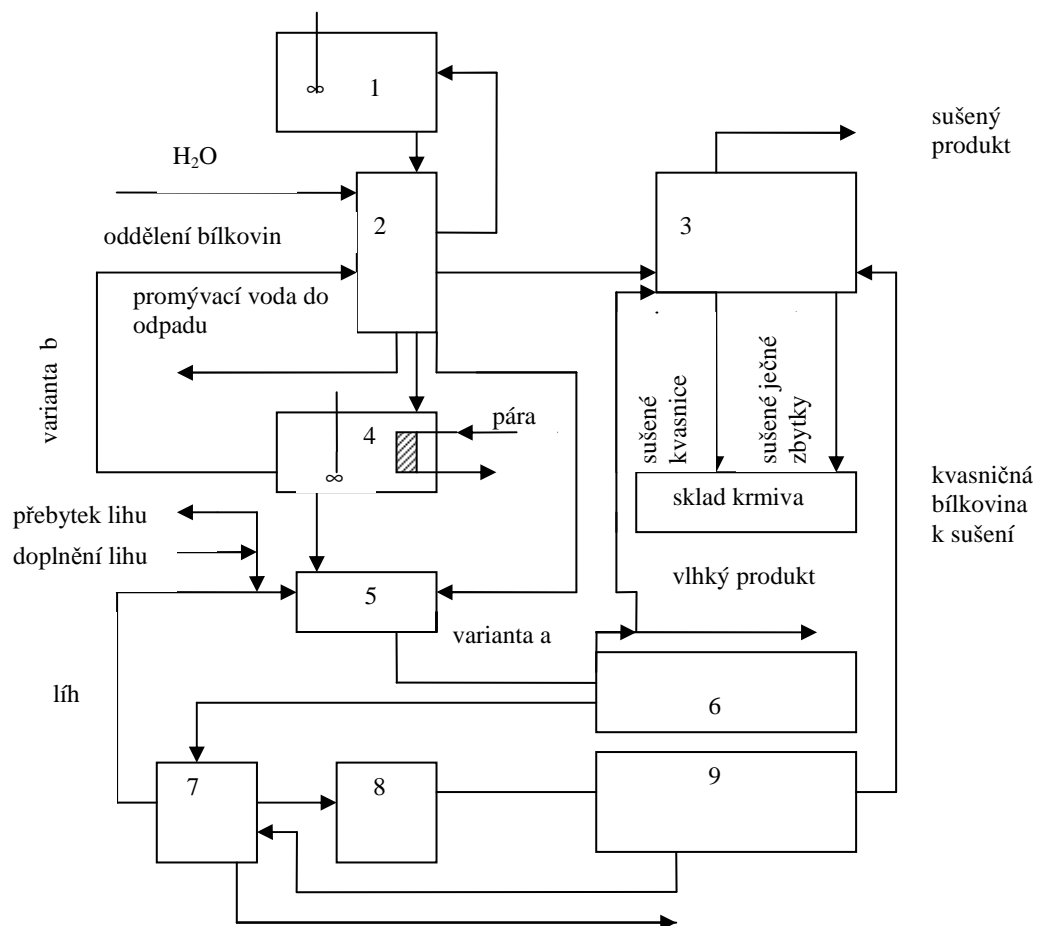
Při realizaci výroby je nutno si uvědomit, že podmínky extrakce β -glukanů a přítomnost arabinoxylanů jako lepivých, viskózních roztoků vyžaduje značná ředění a tím manipulaci se značnými objemy kapalin. Vyplývá to z tohoto příkladu:

Kdybychom zpracovali 100 kg námi používaného ječmene „BLANÍK“, dostali bychom asi 1200 nutných denních dávek pro 1 osobu našeho konečného produktu. Ale k jeho izolaci bychom manipulovali se 72000 l extrakčního roztoku, to znamená, že bychom pro zpracování tohoto množství ječmene najednou potřebovali extrakční nádobu 1 (viz schéma) o objemu nejméně 50 m³ a nádobu č. 4 o objemu dokonce 100 m³! Je tedy zřejmé, že výrobní postup je nutno organizovat jako periodicky kontinuální a vycházet z možností výrobce. V každém případě jde ale o výrobu velkokapacitní.

Také regenerace a vlastní výroba lihu z cukerných roztoků, které vznikly rozštěpením ječného škrobu enzymatickou cestou, je velkokapacitní. Při zpracování 100 kg ječmene najednou je v srážecí kapalině zhruba 50 m³ lihu, který se stále

regeneruje na destilační koloně. Protože alkoholová výtěžnost škrobu při průměrné kvalitě práce je 60 %, lze očekávat, že při zpracování 100 kg ječmene v naší použité kvalitě lze získat $60 \times 0,6 = 36$ l 100% etanolu, tj. 37,5 l 96% lihu. Z tohoto množství asi 50 % doplní technologické ztráty lihu při srážení β -glukanů a lze proto počítat jen s prodejem 15 – 18 l 96% lihu na 100 kg zpracovaného ječmene.

Obrázek č. 4: Výrobní schéma ječmenové biorafinerie.



1. Extrakce
2. Sítový filtr (nebo plachetkový)
3. Sušárna
4. Akumulační neutralizační nádrž, vyhřívána na 95 °C, s míchadlem
5. Periodicky pracující chlazená (+ 4 °C) nádoba na srážení procesní kapaliny se sráženými bílkovinami (varianta a) nebo bez bílkovin (varianta b)
6. Plachetkový filtr
7. Destilační kolona
8. Kvašení cukerného roztoku
9. Odstředivka

4.6. Degradace β -glukanu technologickými operacemi

Úvod

Molekulová hmotnost β -glukanů významně ovlivňuje jejich fyziologické účinky a to především z hlediska prevence nádorového onemocnění, samozřejmě kromě dalších faktorů např. stupně větvení (VELÍŠEK 1999). Z literatury je zřejmé, že běžné technologické operace v potravinářském průmyslu i při kuchyňském zpracování produktů z ječmene a ova i β -glukanových hub (hlívy ústříčné) jako pečení, jakékoliv kynutí těsta, pasteurizace, extruze vedou k degradaci molekulové hmotnosti přítomných β -glukanů. Jakýkoliv fermentační proces má z tohoto hlediska větší účinek, než pouhé působení vyšší teploty, např. při vaření či smažení. Degradace molekulové hmotnosti β -glukanů je tím větší, čím je surovina a obsahem β -glukanů jemněji mleta a čím doba případné fermentace zpracovávané suroviny je delší (AMAN et al. 2004).

Literární přehled

Degradace molekulové hmotnosti β -glukanů je téměř vždy spojena s jejich enzymatickými přeměnami (WESTERLUND et al. 1990), které jsou v potravinářském průmyslu i v domácí přípravě stravy prakticky všudypřítomností hydrolytických enzymů z přírodních surovin (SUNDBERG et al. 1994; ANDERSON et al. 2004; TROGH et al. 20004). Enzymatická hydrolýza je velmi snadná a může probíhat nejen účinkem typických hydroláz štěpících β -glukany, ale i bakteriemi mléčného kvašení (AMAN et al. 1990) a celulázami produkovanými *Trichoderma resei*, jejichž součástí je vždy také endo-1,4- β -glukanáza (AJITHKUMAR et al. 2006; ROUBROEKS et al. 2001). Aktivitu β -glukanázy lze potlačit kyselinou mléčnou v kombinaci se zvýšením teploty (RIMSTEN et al. 2002; HARALDSON et al. 2004), ale enzymatická aktivita směsné populace mikroorganismů podpořená vnějšími vlivy (vlhkostí, teplotou) je vzhledem k hydrolýze β -glukanů až neuvěřitelná. Byly např. zjištěny ztráty molekulové hmotnosti už během technologické operace izolace škrobu z ječmene (ANDERSSON A. A. M. et al 2001). Lze říci, že obecně polysacharidy jsou všestranně výhodné substráty pro nejrůznější enzymatické reakce (AMAN et al.

1999). Poslední výzkum však ukázal, že význam molekulové hmotnosti β -glukanů ve spojení s jejich fyziologickou účinností byl přeceňován a že i nízkomolekulární β -glukanové polymery jsou fyziologicky účinné (NOVÁK 2007; FRANK et al. 2004). Problematice změn molekulové hmotnosti β -glukanů v technologických potravinářských operacích se věnuje hlavně kolektiv autorů Per Amana (AMAN et al. 2004) ze švédské University zemědělských věd v Uppsale. Zjistili, že dochází k rozsáhlé degradaci molekulové hmotnosti β -glukanů při výrobě těstovin, lívancového těsta, polévek, při pečení smažení, vaření i dušení, v závislosti na velikosti zrna základní suroviny (hladká mouka je horší, než hrubá), na délce přípravy, na teplotě operace, na vlhkosti zpracovávané hmoty. Obecně vliv teploty je výrazně menší, než vliv dlouhodobého stání vlhkého zpracovávaného materiálu při nízké teplotě. Pečení, smažení, vaření a dušení nepůsobí tak velkou degradací molekulové hmotnosti β -glukanů, jako jakýkoliv kvasný proces, jakákoliv fermentace. Degradaci molekulové hmotnosti β -glukanů v ovsu i ječmeni nepůsobí fyzikální úpravy (mletí, výroba vloček, koncentrátů otrub) a dokonce ani extruze. Na druhé straně pasteurace jablečných šťáv, výroba jemného pečiva a jakékoliv operace s delší manipulací působily degradací β -glukanů.

Metodika

Bylo připraveno základní kynuté koláčové těsto pro výrobu kynutého koláče (30 g droždí, 200 ml mléka, 150 g cukru, 400 g ječné mouky, 60 g másla, 1 vejce, sůl a 50 g β -glukanového koncentráту z ječmenové biorafinerie). Těsto bylo kynuto 40 minut při teplotě 30 °C, pak použito k uložení při 5 °C.

Dále bylo připraveno základní nekynuté koláčové těsto (400 g ječné mouky, 150 g cukru, 120 g másla, 2 vejce, 250 ml mléka, 40 g kypřicího prášku do pečiva, sůl, 50 g β -glukanového koncentráту z ječmenové biorafinerie). Po prohnětení surovin bylo těsto uloženo při teplotě 5 °C.

Kynuté těsto (KT) i nekynuté těsto (NKT) bylo rozděleno do těchto variant:

1. Hned po výrobě sterilizované (S).
2. Nesterilizované (NS).
3. S původním obsahem vody (PV).
4. S přídatkem 10 % hm. vody (V+).

V těstě běžným extrakčním postupem pro obilné extrakty (RIMSTEN 2003) byly izolovány β -glukany a stanovena jejich molekulová hmotnost viskozimetrickou metodou, popsanou v předešlých částech mé disertační práce v těchto variantách:

- A) Ihned po úpravě vzorku (sterilizací vodou).
- B) Za jeden týden po úpravě vzorku.
- C) Za jeden měsíc po úpravě vzorku.

Výsledky

Výchozí molekulová hmotnost β -glukanů těsta: $1,58 \cdot 10^6$ g/mol.

Tabulka č. 7: **Molekulová hmotnost β -glukanů [$\cdot 10^6$ g/mol] variant pokusů s kynutým a nekynutým těstem sterilovaným a nesterilovaným, s vyšším a nižším obsahem vody v závislosti na době uložení při 5 °C.**

Doba	KT			NKT		
	S	NS - PV	NS - V+	S	NS - PV	NS - V+
A	1,58	1,44	1,4	1,56	1,5	1,53
B	1,6	1,21	1,09	1,58	1,42	1,33
C	1,55	1,05	0,9	1,56	1,35	1,25

Výsledky jsou průměrné hodnoty z $n = 5$ opakování, interval spolehlivosti průměru $\pm 0,05$ pro $\alpha = 0,95$ byl vypočítán z rozpětí R podle Deana a Dicksona (ECKSCHLAGER et al. 1980) a je stejný pro všechny varianty.

Diskuse

Z výsledků je zřejmé, že nejvíce podporuje destrukci molekulové hmotnosti kvasný proces, což zcela potvrzuje výsledky švédských badatelů (AMAN et al. 2004). Sterilace destrukci molekulové hmotnosti ihned po rychlém zpracování těst zcela zastavila. Překvapivým výsledkem je fakt, že další destrukci molekulové hmotnosti nesterilizovaných variant působí už pouhé zvýšení obsahu vody a to i při teplotě vedení pokusu, t.j. 5°C. To jen dokazuje vysokou labilitu molekulové hmotnosti β -glukanů a praktickou všudypřítomnost hydrolytických enzymů, účinných daleko od jejich teplotního optima. Bohužel, nedostatek peněz na analýzy

(běžně je cena jednoho stanovení 1000 Kč) mi neumožnila, abych sledovala podrobněji kinetiku destrukce molekulové hmotnosti β -glukanů v jednotlivých variantách, měla jsem k dispozici jen dva časové úseky (týden, měsíc) a z tohoto není zcela zřejmé, zda destrukce probíhá lineárně či má jinou funkční závislost.

Závěr

Destrukci molekulové hmotnosti β -glukanů ve variantách mého pokusu nejvíce působí kvasné procesy. Plně likviduje destrukci sterilizace. U nesterilizovaných, fermentovaných i nefermentovaných vzorků další destrukci molekulové hmotnosti působí při uložení za teploty 5 °C pouhé zvýšení množství vody ve zkoumaném těstě.

Poděkování

Děkuji VÚZ v Kroměříži, sladovně pivovarů NYMBURK a soukromé analytické firmě SKATEC za analytickou pomoc a režijní ceny analýz, pracovníkům SAV v Bratislavě a BIOVETĚ Žilina za poskytnutí analytických standardů a laboratořím VŠCHT Praha za srovnávací analýzy.

5. DISKUSE

Protože spektrum fyziologických účinků β -glukanů je široké a do nedávné doby bylo stále předmětem četných vědeckých polemik a střetu názorů, je nutno se tímto problémem alespoň popisem nových poznatků zabývat, protože rozhodujícím způsobem ovlivňuje význam a zaměření mé disertační práce.

Když jsem před léty se svými školiteli toto téma začínala, v světové literatuře panoval všeobecný názor, že fyziologický účinek β -glukanů v lidském organismu je jednoznačně příznivý, že β -glukany snižují hladiny krevního cukru a LDL cholesterolu. Dále že β -glukany hub a kvasinek se od obilných β -glukanů liší další významnou vlastností a to možností snižovat riziko nádorových onemocnění. Do praxe se dostaly léčivé preparáty z některých vyšších hub, které byly dokonce velmi úspěšně využity při léčbě některých forem rakoviny. Byl testován jejich účinek na nejrůznější onemocnění – na infekce, choroby z ozáření a na neoplastické bujení. β -glukany se staly téměř módní záležitostí, úspěchy v teorii vedly k záplavě různých potravních doplňků a alternativních léčiv, prosazovaných hlavně neoborníky. Po určité době toto nadšení pro β -glukany odpadlo a naopak řada odborníků β -glukanové preparáty z hub začala kritizovat – především pro jejich malou definovatelnost, nespecifický a příliš komplexní účinek.

Proto v té době začátek mé práce byl orientován výhradně na houbové β -glukany. Brzy však vědecká světová literatura přinesla řadu důležitých poznatků, které vysvětlily mechanismus jejich působení v lidském organismu a z nich vyplynulo, že mezi houbovými a obilnými β -glukany v jejich fyziologických účincích v podstatě není rozdíl. Protože však obsah těchto polysacharidů v plodnicích hub je velmi nízký, obiloviny (ječmen a oves) byly z ekonomického hlediska mnohem perspektivnější surovinou. Proto v průběhu mé disertační práce ve shodě s názorem mých školitelů jsem přesunula svůj zájem na obilné β -glukany.

Nové poznatky o fyziologickém působení β -glukanů v lidském organismu shrnul u nás Novák (NOVÁK 2007). β -glukany, obilné i houbové lze zařadit do skupiny fyziologicky účinných látek, které se označují jako modifikátory biologické odpovědi a označují se podle zkratk anglického názvu (biological response modifiers) BRMs. Tyto látky se podle účinku dělí na dvě skupiny – první zprostředkovávají komunikaci mezi buňkami imunitního systému a regulačními mechanismy, druhá skupina je tvořena imunomodulátory, které funkci imunitního

systému přímo ovlivňují (to je tzv. „imunopotenciace“, v případě kladného účinku, v případě záporného účinku je to „imunosuprese“). Imunomodulátorů je větší množství a dají se rozdělit do 3 tříd:

1. Intaktní mikroby (např. bacil Calmetteův), složky mikrobiálních buněk (např. endotoxin gramnegativních buněk mikroorganismů), polynukleotidy, β -glukany a některé další polysacharidy hub, obilnin i dalších rostlinných druhů.
2. Přirozené složky normálního imunitního systému (thymové hormony, lymfokiny, monokiny).
3. Syntetické látky (levamisol isoprinosin, ze známějších např. diethyldithiokarbamát - DDTC).

Bakteriologové znají už dávno, že některé složky mikroorganismů způsobují v těle vyšších organismů, především savců, prudké reakce, které jsou analogické stavům při injekci intaktními mikroby. První takto zkoumanou látkou byly endotoxiny gramnegativních bakterií, ke kterým patří *Escherichia coli* (běžný a za normálních okolností neškodný mikrob vyskytující se ve střevech člověka zcela běžně a proto nález *Escherichia coli* slouží v analytice pitné vody jako důkaz fekálního znečištění). Endotoxiny jsou lipopolysacharidy, t.j. komplexní sloučeniny, skládající se z lipidické složky s C12 a C14 mastnými kyselinami, která je navázána glykosidovými vazbami na jádrový polysacharid. Ten je spojen s výrazně imunogenním O-antigenem proměnlivého složení, tvořeným opakujícími se oligosacharidovými jednotkami. U člověka lipopolysacharidy vyvolávají zvýšenou fagocytózu, která může být pro hostitele sice výrazný ochranný efekt, ale na druhé straně toxické účinky, s horečkou, průjmy, mnohočetnými orgánovými selháními a ostatními projevy intoxikace. Vzpomeňme jen na nedávnou aféru se španělskými okurkami údajně kontaminovanými *Escherichia coli*.

Příčinou toxicity lipopolysacharidů je jejich lipidická část, polysacharidová složka je netoxická a má výrazné imunomodulační vlastnosti. Proto i samotné polysacharidy mohou v určitých podmínkách a při určitém složení fungovat jako imunomodulátory. Při této příležitosti se chci zmínit o léčivce *Echinacea purpurea*, která má výrazný antivirový, antibakteriální a antikancerogenní účinek a proto byla na mateřské katedře vyvinuta levná technologie jejího pěstování i extrakce. Dlouho

se uvažovalo o příčině léčivého účinku této rostliny (echinakosid, kyselina kávová, polyfenoly) a nakonec se ukázalo, že je to jeden z polysacharidů této rostliny.

Použití polysacharidů jako imunomodulátorů začalo ve 40. letech minulého století objevem Shearova polysacharidu izolovaného ze *Serrotia marcescens*, který působil nekrózu tumorů. Byly hledány další polysacharidy jako imunomodulátory a na přelomu šedesátých a sedmdesátých let byl objeven imunomodulační efekt β -glukanů. Vznikly dvě výzkumné školy: americká (Nicolas R. Di Luzio z Tulane University v New Orleans), která za zdroj polysacharidů zvolila běžné kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*. Japonská škola (Goro Chihara z Teikyo University v Kawasaki) vycházela ze staré asijské medicíny, která znala antikancerogenní účinek některých vyšších hub – shiitake, maitake, reishi.

Tak vznikla mylná představa, že antikancerogenní účinek β -glukanů je doménou výhradně β -glukanů hub.

I když tato mylná představa dnes neplatí, přece jen výzkum v tomto směru je ve jménu tradice zaměřen stále hlavně na houbové β -glukany. Přesunul se však od vyšších hub hlavně na askomycety, do kterých patří hlavně kvasinky a některé vláknité plísně. Z basidiomycet, kam patří většina makromycet (tedy jedlých či nejedlých hub) se pozornost obrací už jen na uměle pěstované houby.

Také názory na vztah struktury a biologické účinnosti prošly v nedávné době bouřlivým vývojem. Na začátku mé doktorské práce se ještě předpokládalo, že biologicky účinné β -glukany se skládají z hlavního řetězce, z β -D-glukopyranosových jednotek spojených vazbou (1 \rightarrow 3), na který je v náhodných místech navázáno vazbou (1 \rightarrow 6) po jedné β -D-glukopyranose. Molární stupeň větvení je u různých zdrojů různý. V nativním β -glukanu se skládají fibrily z částí, kde hlavní řetězce jsou stočeny do trojitě šroubovice. Tyto oblasti jsou kombinovány s jednoduchými či dvojitými vlákny z (1 \rightarrow 3)- β -D-glukopyranos. Tento trojnásobný helix, stabilizovaný postranními řetězci, je ale pravděpodobný jedině u β -glukanů s vysokou molekulovou hmotností. Obecně se tvrdilo, že antitumorová aktivita houbových β -glukanů se mohla projevit jedině tehdy, má-li daný β -glukan tento trojitý helix a molekulovou hmotnost nad 100 kDa (KOJIMA 1986). Ale to není možné, protože β -glukan jako konformer s třemi vodíkovými vazbami v poloze C-2 je labilní, vodíkové vazby lze snadno přerušit zvýšenou teplotou, alkalickým pH, řadou rozpouštědel. Proto by taková forma β -glukanu žádnou izolační techniku nevydržela. A proto nejnovější názory nepotvrzují vžitě

představy o nutnosti velké molekulové hmotnosti a větvení biologicky účinných β -glukanů – asi nejsou zcela nutnou podmínkou pro jejich biologický účinek. Dokonce se polemizuje o možnosti, že velikost vazebného místa na receptoru imunokompetentní buňky, např. makrofágu, odpovídá počtu jen 6-7 glukózových zbytků.

Z tohoto hlediska je nutno kriticky přistupovat i k náplni mé disertační práce, kde jsem se zaměřila na snahu izolačními technikami a technologiemi zpracování a výroby funkčních potravin zachovat původní molekulovou hmotnost β -glukanů. Ve světle nejnovějších poznatků – ovšem zatím nikoli obecně prokázaných – to není tak absolutně nutné. Výzkum, který je ale zcela mimo mé výzkumné možnosti, však pokračuje všude velmi intenzivně a snad v brzké době budou tyto nové teorie potvrzeny či vyvráceny. Problém se konečně začíná solidně řešit přípravou semisyntetických a syntetických sond pro exaktní imunologický výzkum. Nicméně ať už je výsledek dalšího výzkumu jakýkoliv, nelze přehlédnout, že převažující imunofarmakologicky pozitivní účinek β -glukanů může mít i nepříznivé vedlejší účinky. Všechny dostatečně purifikované polysacharidové imunomodulátory jsou charakteristické velmi nízkou toxicitou, β -glukany zvyšují rezistenci hostitele proti virovým, bakteriálním, fungálním a dokonce i parazitárním infekcím, mají protinádorový efekt a jsou prevencí kancerogeneze, mají radioprotektivní účinky, chrání proti genotoxickým účinkům některých protirakovinných léčiv (např. cyklofosfamidu, cisplatině), jsou schopny chránit před mykotoxiny, mohou být profylaxí a proti některým biologickým zbraním (např. s nákazou anthraxu). Modulují mukosální imunitu střevního traktu, v centrálním nervovém systému β -glukany aktivují mikrogliové buňky, které hrají významnou úlohu při ochraně před onemocněním Alzheimerovou nemocí nebo AIDS. Účinek β -glukanů se projevuje hlavně zvýšením fagocytární a proliferativní aktivity profesionálních fagocytů, mezi které patří neutrofilní granulocyty, monocyty, makrofágy a dendritické buňky. Proto je účinek β -glukanů na organismus tak mnohotvárný. Účinek aktivovaných makrofágů však nesměřuje jen proti aktivátoru, ale také proti jakémukoliv přítomnému antigenu, mikroorganismu nebo nádorové buňce. Protože ale savci nemají enzym β -glukanázu, makrofágy jsou vlastně jediným nástrojem likvidace β -glukanů v lidském těle. Proto β -glukan je příčinou vzniku zánětlivých reakcí. Protože je tedy v těle savců špatně odbouratelný, působení noxy přetrvává, zánětlivá reakce může přejít na patologický zánět s těžkým tkáňovým poškozením,

s poruchami imunoregulace a rozvoj autoimunitního procesu. Může se rozvinout šok a fatální multiorgánové selhání. Případ se vyskytl při zkouškách β -glukanu zymosanu. β -glukan je dokonce považován za příčinu onemocnění „syndrom toxického organického prachu“, které se projevuje zánětem plic, chronickou bronchitidou, rhinitidou, drážděním očí a krku. Onemocnění může být vyvoláno vdechováním organických zemědělských, průmyslových i domácích prachů. Byl popsán také letální efekt, vyvolaný interakcí β -glukanu s nesteroidními protizánětlivými léčivy.

Protože každý preparát β -glukanu je nutně heterogenní, je zřejmé, že výzkum léčiv půjde spíše než cestou sledování účinku jednotlivých β -glukanů z různých zdrojů bezpečnější cestou a tou je příprava syntetických sond, t.j. navázání krátkých oligomerů glukózy s β -(1 \rightarrow 3) a β -(1 \rightarrow 6) vazbami na polymerní nosič s definovanou velikostí a strukturou.

Z výše uvedených skutečností bylo by možno snadno se domnívat, že má snaha spolu se snahou svých školitelů vyrobit relativně levně koncentrát β -glukanů z hlívy ústřičné, jejíž β -glukany pod společným názvem „pleuran“ mají prokázány kancerostatický účinek (MIZUNO 1996; WASSER et al. 1999; BORCHERS et al. 1999; KIDD 2000), se již minula dobou a je poněkud zastaralá, protože poznatky o specifičnosti houbových β -glukanů v této problematice už neplatí a proto už z ekonomického hlediska jsou obilní β -glukany výhodnější proto, že jejich koncentrace v surovině je podstatně vyšší. Přesto jsem přesvědčena, že tato má práce (1 a 2 cíl mé disertační práce, kapitoly 4.1. a 4.2. experimentální části) nebyla vykonána nadarmo. Způsob koncentrace β -glukanů z procesních kapalin kombinovaným postupem sorpce a flokulace přirozeným a jedlým sorbentem, kterým byl termicky modifikovaný bramborový škrob v přítomnosti sráženého CaCO_3 s nezastupitelným inhibitorem mazování (KODET, BABOR 1991). Považuji za významnou novinku to, že jsem vyzkoušela jako inhibitor karboxymetylcelulózu AKUCCELL AF 2985, která je původně určena jako zahušťovadlo v potravinářství do omáček, polévek a zmrzlin. Tato látka neporušila „jedlý“ charakter β -glukanového koncentrátu a ve svém způsobu aplikace s termicky modifikovaným škrobem a vápníkem (ve formě CaCO_3 , ale je možný i přídavek octanu vápenatého), dokonce byla účinnější, než známý flokulant doporučený i pro čištění, kvartérní derivát kationického aminoetheru škrobu. V literatuře jsem ani po prověření stavu odborníky ve Státním úřadu pro

průmyslové vlastnictví v Praze nenašla odkaz na tento způsob izolace a proto spolu s mými školiteli jsme jej podali jako chráněný průmyslový vzor a možné licenční právo jsme věnovali Jihočeské univerzitě. Proces sorpce je založen na jediné myšlence, která patří ve svém prvenství Ing. Kodetovi (KODET, BABOR 1991), že nativní škroby a jejich nesubstituované modifikace (to jsou termické modifikace, oxidované škroby a odbourané škroby) mají celkem velmi jednoduchý sorpční mechanismus a to adsorbci hydroxylových skupin D-glukózových jednotek na záporně nabitých částicích. Jsou s největší pravděpodobností vázány vodíkovými můstky s hydroxylovými skupinami hydratačního obalu částic suspenze. Velký význam tu hraje vázaná kyselina fosforečná a to je charakteristická právě pro bramborový škrob. Ten nelze jiným škrobem nahradit. V přítomnosti Ca^{2+} či suspenze CaCl_2 dochází vlivem H_3PO_4 k aktivaci řetězení v systému a sorpční i flokulační účinnost rapidně vzrůstá. Je tedy otázka, jak lze dál tento poznatek využít? V další části mé práce jsem už pracovala s obilními β -glukany ječmene a ovsu a celý náš řešitelský kolektiv v úkolu MSM 600 766 5806 celé Zemědělské fakulty JČU v Českých Budějovicích, který je koordinován prof. Ing. Janem Frelichem CSc., dospěl na katedře aplikovaných rostlinných biotechnologií k patentovanému návrhu tzv. „biorafinerie ječmene“ (viz 5. cíl mé disertační práce a kapitolu 4.5. experimentální části), ve které se přítomné β -glukany precipitují z procesní kapaliny etanolem (viz bod 8 pracovního postupu). Jiné, v literatuře popisované systémy izolace β -glukanů používají k tomu účelu mnohem dražší n – propanol, jiné isopropanol. To ovšem předpokládá, že zpracování suroviny, ječmene či ovsu, je velkokapacitní, spojené s kvasnou výrobou alkoholu a také samozřejmě s velkou destilační kolonou, protože spotřeba alkoholů je obrovská, přes 50 % objemu procesní kapaliny. Je pravda, že převážná většina alkoholů se pak vrací do výroby zpět, ale je nutno destilovat a tak spotřeba energie může celý proces biorafinerie ječmene dosti nepříjemně zdražit. Přímo se nabízí myšlenka využít kombinovaný proces sorpce a flokulace, který jsem prověřila ve své experimentální části 4.1., i v této biorafinerii ječmene místo uvedeného způsobu precipitace β -glukanů alkoholem. Rozhodně by to byl způsob velmi podstatně levnější. Bohužel, prověřit už jsem ho nemohla, zabránil mi v tom už nedostatek času a především finančních prostředků na výzkum, protože možnost čerpání z grantu MSM 600 766 5806 byla už prakticky ukončena.

Závěrem této části diskuse prosím laskavého čtenáře, aby snad nechápal má slova v diskusi jako moji snahu přisvojit si úspěchy v tomto výzkumu. Pracovala jsem ve výzkumném kolektivu katedry, jsem za to mým školitelům vděčna, ale sama jsem ve vědecké práci začátečníkem a téma mé práce, vybrané potřebou zmíněného grantu, bylo opravdu velmi obtížné. Navíc světový výzkum, hnaný jednak potřebou prevence proti hlavním civilizačním chorobám (cévním onemocněním, cukrovce a nádorovém bujení) a také vidinou obrovských zisků farmaceutických firem, za několik málo let přinesl tolik novinek, že měnil původní představy. Proto své nové poznatky pokládám za kolektivní dílo a je na členech tohoto výzkumného kolektivu, aby určili podíl mého příspěvku na celkovém výsledku.

Při plnění cílů práce 2 a 3 (experimentální část 4.2. a 4.3.) jsem narazila na problém obtížného dělení β -glukanové frakce a frakce arabinoxylanů. Je to problém nejen pro mě, ale i pro renomované specialisty (ANDERSSON, AMAN 2005; ROUBROEKS et al. 2000). Protože arabinoxylany a β -glukany ve svých vlastnostech fyzikálních a chemických leží velice blízko, zvláště velmi blízké jsou viskostatické vlastnosti a rheologické vlastnosti různých suspenzí látek s roztoky těchto polysacharidů, zastavili jsme v průběhu výzkumu práce k dělení těchto dvou skupin a výrobu potravinových doplňků jsme založili na předpokladu, že vysoká viskozita roztoků látek obou skupin bude plnit funkci rozpustné vlákniny ve střevním traktu člověka zhruba stejně. Tento sice nadmíru odvážný předpoklad však byl záhy výsledky světového výzkumu jednoznačně potvrzen a skupina arabinoxylanů se začíná dostávat do středu zájmu – podobně jako kdysi β -glukany (THEANDER, AMAN 1978, 1979; BENGTSSON, AMAN 1990; BENGTSSON, AMAN, ANDERSSON 1992; BENGTSSON, ANDERSSON, WESTERLUND, AMAN 1992; WESTERLUND et al. 1993; DERVILLY-PINEL et al. 2001). Arabinoxylany jsou sledovány i po enzymatických hydrolýzách (NILSSON et al. 1999).

Čtvrtý cíl mé disertační práce (kapitola 4. 4. experimentální části) řešila otázku levné metody k sledování změn molekulové hmotnosti β -glukanů viskozimetrickou metodou. I když v kapitole 4. 4. jsem kritizovala tuto metodu z hlediska značné pracnosti a nesprávnosti (výsledky jsou obecně nižší, než u srovnávací chromatografické metody) musím přiznat, že reprodukovatelnost této metody byla velmi dobrá a snad moji velkou kritičnost v kap. 4. 4. působil stesk nad skutečností,

že vybavení mateřské vysoké školy je proti výzkumným pracovištím v celém světě tak ubohé. Dnes se mi zdá, že nízké výsledky této viskozimetrické metody byly působeny spíše nízkou hodnotou vypočítané molekulové hmotnosti monomeru β -glukanu, prostě špatným vzorcem. Použila jsem vzorec, v literatuře považovaný za obecně platný, ale poslední úvahy Nováka (NOVÁK 2007) – viz začátek této diskuse – mne vedou k přesvědčení, že monomer mohl mít drobné změny a proto jeho molekulová hmotnost byla nižší, než ve skutečnosti. Pak celková molekulová hmotnost polymeru by byla pravděpodobně blízká hodnotám určeným chromatograficky. V práci popisují pracovní postup až snad příliš lapidárně. Ale vycházela jsem z faktu, že v běžné laboratoři, slušně vybavené, je moderní chromatografie se všemi svými variantami běžnější, než viskozimetrie s viskozimetrem dle Ubellohde. Postup jsem vyzkoušela, nepřinesla jsem tím sice nic nového, ale metoda mi umožnila splnění cílů mé práce bodu 6 (experimentální část práce kapitola 4. 6.), totiž sledovat degradaci molekulové hmotnosti β -glukanů při technologických operacích. Tato kapitola přinesla proti řadě výsledků z výzkumného pracoviště známých badatelů Amana, Rimstena a Anderssona ještě jednu snad nepatrnou novinku – že molekulovou hmotnost β -glukanů nesnižují jen jakékoliv fermentační procesy a v menší míře tepelné úpravy suroviny (jak zjistili tito autoři), ale už pouhé udržování suroviny s β -glukany s vyšším obsahem vody v nesterilním prostředí. Pro technologa by bylo výhodné, kdyby považoval existenci hydrolytických enzymů, štěpících β -glukany, za všudypřítomnou a snažil se jakékoliv manipulace se surovinou buď tepelně ošetřit nebo alespoň podstatně urychlit. Mé výsledky samozřejmě plně potvrzují výsledky uvedených autorů a jsou nové v tom, že pro potravinářské a kuchyňské úpravy suroviny s β -glukany platí podobné poznatky, ke kterým dospěli Andersson A. A. M., Andersson R. a Aman (ANDERSSON et al. 2001), že k hydrolyze β -glukanů ječmene stačí jen voda a vyšší teplota při izolaci škrobu z ječmene.

Ve světle nových poznatků, tlumočených zde na začátku diskuse, je zřejmé, že původní obavy ve spojitosti se štěpením β -glukanů na menší polymerní celky, jsou už překonanou minulostí. Přesto se domnívám, že má práce na této kapitole nebyla zbytečná, stejně jako není zbytečná obrovská práce skandinávské výzkumné školy Amana P., která se problematikou destrukce molekulové hmotnosti polymerních β -glukanů dlouhá léta zabývala.

Experimentální část 4.5. (cíl práce 5) je komplexní technologické dílo celého výzkumného kolektivu katedry, se kterým jsem na problémech spolupracovala. Výsledky této části jsou právně ochráněny jako patent a užité vzory, byly předány do majetku Jihočeské univerzity. Jednotlivé prvky tohoto ojedinělého projektu nejsou žádnými novinkami základního výzkumu. Jejich novost je v technologické aplikaci, v skloubení jednotlivých technologických operací. Je to typický aplikovaný výzkum, na který se v posledních létech přední organizátoři vědecké práce v ČR dívají trochu přes prsty. Je to škoda. Neměli bychom zapomínat, že právě aplikovaný výzkum přináší rychlý a bezprostřední zisk společnosti, zatímco základní výzkum prostředky spíše spotřebovává. To dobře chápou Němci, od kterých se rádi učíme, bohužel s výjimkou této skutečnosti.

6. ZÁVĚR

V disertační práci jsem pracovala s houbovými i obilními β -glukany z toho důvodu, že při zahájení mé doktorské práce světová literatura jednoznačně zastávala názor, že rozdíl mezi oběma skupinami β -glukanů (vazby (1 \rightarrow 3) a (1 \rightarrow 4)) je v tom, že houbové β -glukany na rozdíl od β -glukanů obilních mají kancerostatické a obecně antikancerogenní účinky. Protože v ČR jedinou houbou, která má alespoň odpovídající obsah β -glukanů pro případnou průmyslovou výrobu je hlíva ústříčná (*Pleurotus ostreatus*), zabývala jsem se β -glukanem pleuranem a snažila jsem se najít takový technologický postup, který by umožnil koncentrovat pleuran z velmi zředěných roztoků procesní kapaliny. To se mi podařilo kombinací sorbce a flokulace termicky modifikovaným bramborovým škrobem v přítomnosti CaCO_3 nebo Ca^{2+} - iontů, je to vědecká novinka mé práce, nikde v literatuře jsem analogický postup nenašla. Ukázalo se však, že i tento postup sice výsledný produkt zlevní, ale koncentrace pleuranu v plodnicích houby byla velmi nízká a nebylo možno předpokládat, že i při použití mého postupu by byl výsledný produkt levný. Proto jsem se svými školiteli obrátila pozornost na odpad – substrát po pěstování hlívy ústříčné, prorostlý myceliem houby. Izolovat z něj pleuran se nám podařilo, ale nedařilo se nám rozdělit směs pleuranu a velkého množství arabinoxylanů, protože obě skupiny látek mají velmi blízké chemické a fyzikální vlastnosti. Proto jsme navrhli užité vzory, v nichž jsme předpokládali, že β -glukany a arabinoxylany ve směsi jsou možné, protože arabinoxylany budou přinejmenším alespoň neškodné – v lepším případě budou účinek β -glukanů podporovat. V pozdějších létech světová literatura náš názor jednoznačně potvrdila.

Literatura však přinesla také radikální změnu na tehdy obecně přijímanou teorii, že fyziologicky kladný účinek β -glukanů je závislý na molekulové hmotnosti tohoto polymeru. Já jsem věnovala ve shodě se světovou literaturou velké úsilí právě sledování molekulové hmotnosti β -glukanů v změnách, které jejich molekulové stavbě přinášejí technologické a kuchyňské operace. Nepracovala jsem už s houbovými β -glukany, ale s těmito polysacharidy ovsa a ječmene, protože obilniny jsou podstatně bohatším zdrojem β -glukanů, než hlíva ústříčná a protože nový výzkum ve světě přinesl důkazy, že mezi houbovými a obilními β -glukany v jejich protinádorových účincích jsou vlastně jen nepodstatné rozdíly. Navrhla jsem a propracovala sice pracnou, ale investičně zcela nenáročnou metodu na

stanovení molekulové hmotnosti β -glukanů, která je uskutečnitelná i v chudě vybavených laboratořích. To je podle mého názoru druhý vědecky nový výsledek mé disertační práce.

Další vývoj ukázal, že problematika β -glukanů byla ve své době poněkud módní záležitostí, ve které farmaceutické firmy tušily zdroj obrovských zisků. Proto výzkum ve světě byl dobře financován a šel kupředu přímo šíleným tempem. A tak přišlo rozčarování – byly objeveny závažné záporné vlastnosti β -glukanů, schopnost podporovat zánětlivé procesy a vyvolat dokonce letální autoalergické reakce. Světový vědecký zájem se začíná přesouvat jinam – na arabinoxylany, na celkovou dietní vlákninu a na žito – hlavně na jeho lignany. Jsou to látky, patřící do skupiny fytoestrogenů, podobně jako isoflavony, stilbeny a kumestany. Žito lignany sice obsahuje, ale lněné semeno jich má asi 8000 x více (KALAC 2003).

V další části mé práce jsem spolu se svými školiteli dospěla k názoru, že jakákoliv izolace β -glukanů v samostatném technologickém postupu bude v podmínkách ČR vždy drahá a dobrý preparát bude také drahý – a tedy málo schopný cenově soutěžit se zahraniční konkurencí. Úplná změna však nastává, jestliže výroba β -glukanu je zařazena do systému bezodpadového komplexního zpracování suroviny na několik finálních, na světovém trhu žádaných výrobků. Takovým technologiím se podle amerického vzoru říká „biorafinerie“ podle mého názoru to není název právě vhodný, bohužel v literatuře se vžil.

Mé mateřské pracoviště vypracovalo biorafinerii ovsa s 22 finálními produkty a nyní předalo k právní ochraně biorafinerii ječmene, na které jsem spolupracovala. Přináší řadu novinek, na některých z nich mám určitý podíl. Nejsou to novinky z kategorie základního výzkumu, ale novinky technologické organizace, typicky aplikovaný výzkum, bohužel v ČR dnes naprosto nedoceňovaný.

7. LITERATURA

1. Ajithkumar A., Andersson R., Aman P., 2005: Content and molecular weight of extractable beta-glucan in American and Swedish oat samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 4: 1205-1209.
2. Ajithkumar A., Andersson R., Christerson T., Aman P., 2005: Amylose and beta-glucan content of new waxy barleys. *Starch-Starke*, 57, 6: 235-239.
3. Ajithkumar A., Andersson R., Siika-aho M., Tenkanen M., Aman P., 2006: Isolation of cellotriosyl blocks from barley beta-glucan with endo-1,4-beta-glucanase from *Trichoderma reesei*. *Carbohydrate polymers*, 64, 2: 233-238.
4. Aman P., Andersson A. A. M., 2008: Oats full of soluble fibre. *Agro Food Industry Hi-Tech*, 19, 2: 25-27.
5. Aman P., Andersson A. A. M., Rakha A., Andersson R., 2010: Rye, a healthy cereal full of dietary fiber. *Cereal Foods World*, 55, 5: 231-234.
6. Aman P., Andersson R., Frederiksson H., 2000: Grain polysaccharides, versatile substrates for enzymes. 2nd Symposium on Enzymes in Grain Processing, ESEGP-2, 207: 9-19.
7. Aman P., Nilsson M., Andersson R., 1997: Positive health effects of rye. *Cereal Foods World*, 42, 8: 684-688.
8. Aman P., Pettersson D., Graham H., 1990: Chemical and Nutritional-Evaluation of Airtight storage of High-Moisture Barley and High-Mositure Barley Treated with Lactobacilli or Lactobacilli and Yeast. *Animal Feed Science and Technology*, 29, 3-4: 223-235.
9. Aman P., Rimsten L., Andersson R., 2004: Molecular weight distribution of β -glucan in oat-based foods . *Cereal Chemistry*, 81, 3: 356-360.
10. Analytica – EBC, Section 3 Barley, Metod 3. 10. 2., 1997: High Molecular Weight β -glucan Kontent of Barley. Fluorimetric Metod, 7.
11. Andersson A. A. M., Andersson R., Aman P., 2001: Starch and by-products from laboratory-scale barley starch isolation procedure. *Cereal Chemistry*, 78, 5: 507-513.
12. Andersson A. A. M., Armo E., Grangeon E., Fredriksson H., Andersson R., Aman P., 2004: Molecular weight and structure units of (1 \rightarrow 3,1 \rightarrow 4)-beta-glucans in dough and bread made from hull-less barley milling fractions. *Journal of cereal science*, 40, 3: 195-204.

13. Andersson A. A. M., Courtin C. M., Delcour J. A., Fredriksson H., Schofield J. D., Trogh I., Tsiami A. A., Aman P., 2003: Milling performance of north European hull-less barleys and characterization of resultant millstreams. *Cereal Chemistry*, 80, 6: 667-673.
14. Andersson A. A. M., Lampi A. M., Nystrom L., Piironen V., Li L., Ward J. L., Gebruers K., Courtin C. M., Delcour J. A., Boros D., Fras A., Dynkowska W., Rakszegi M., Bedo Z., Shewry P. R., Aman P., 2008: Phytochemical and Dietary Fiber Components in Barley Varieties in the Healthgrain Diversity Screen. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 21: 9767-9776.
15. Andersson A. A. M., Ruegg N., Aman P., 2008: Molecular weight distribution of water-extractable beta-glucan in rye crisp bread. *Journal of Cereal Science*, 47, 3: 399-406.
16. Andersson R., Aman P., 2005: Effects of processing on cereal arabinoxylan and mixed-linkage beta-glucan. *Abstracts of Papers of The American Chemical Society*, 229: 310-310.
17. Andersson R., Fransson G., Tietjen M., Aman P., 2009: Content and Molecular-Weight Distribution of Dietary Fiber Components in Whole-Grain Rye Flour and Bread. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 5: 2004-2008.
18. Augustin J., 1998: Glucans as modulating polysaccharides: their characteristic and isolation from microbiological sources. *Biologia*, 53, 3: 277-282.
19. Autio K., Malkki Y., Virtanen T., 1992: Effects of processing on the microstructure of oat (*avena-sativa*) bran concentrate and the physicochemical properties of isolated beta-glucans. *Food Structure*, 11, 1: 47-54.
20. Autio K., Myllmaki O., Suortti T., Saastamoinen M., Poutanen K., 1992: Physical properties of β -glucan isolated from Finnish oat varieties. *Food Hydrocolloids*, 5, 513.
21. Autio K., Myllmaki O., Malkki Y., 1987: Flow properties of solutions of oat β -glucan. *Journal of Food Science*, 52, 1364.
22. Baird J. K., Petitt D. J., 1991: Biogums used in food and made by fermentation. *Biotechnology and Food ingredients*, 223-263.
23. Beer M. U., Arrigoni E., Amado R., 1996: Extraction of oat gum from oat bran: Effects of process on yield, molecular weight distribution, viscosity and (1 \rightarrow 3)(1 \rightarrow 4)-beta-D-glucan content of the gum. *Cereal Chemistry*, 73, 1: 58-62.

24. Bengtsson S., Aman P., 1990: Isolation and Chemical Characterization of Water-Soluble Arabinoxylans in Rye Grain. *Carbohydrate Polymers*, 12, 3: 267-277.
25. Bengtsson S., Aman P., Andersson R. E., 1992: Structural Studies on Water-Soluble Arabinoxylans in Rye Grain Using Enzymatic-Hydrolysis. *Carbohydrate Polymers*, 17, 4: 277-284.
26. Bengtsson S., Andersson R., Westerlund E., Aman P., 1992: Content, Structure and Viscosity of Soluble Arabinoxylans in Rye Grain from Several Countries. *Journal of The Science of Food and Agriculture*, 58, 3: 331-337.
27. Bhatta R. S., 1999: Beta-glucan and flour yield of hull-less barley. *Cereal Chemistry*, 76, 2: 314-315.
28. Bhatta R. S., 1995: Laboratory and pilot-plant extraction and purification of beta-glucans from hull-less barley and oat brans. *Jornal of Cereal Science*, 22, 2: 163-170.
29. Bhatta R. S., 1993: Extraction and enrichment of (1-3),(1-4)-beta-D-glucan from barley and oat brans. *Cereal Chemistry*, 70, 1: 73-77.
30. Bhatta R. S., Macgregor A. W., Rossnagel B. G., 1991: Total and acid-soluble beta-glucan content of hulless barley and its relationship to acid-extract viscosity. *Cereal Chemistry*, 68, 3: 221-227.
31. Bhatta R. S., Rossnagel B.G., 1998: Coparison of pearled and unpearled Canadian and Japanese barleys. *Cereal Chemistry*, 75, 1: 15-21.
32. Borchers A.T., Stern J.S., Hackman R.M., Keen C.L., Gerschwin M.E., 1999: Mushrooms, tumors and imunity. *Proc Soc Exp Biol Med*, 221, 281-293.
33. Boyaci I. H., Seker V., Mutlu M., 2002: Determination of beta-glucan kontent of cereals with an amperometric glukose electrode. *European Food Research and Technology*, 215, 6: 538-541.
34. Brdička R., 1952: *Základy fyzikální chemie*. Přírodovědecké nakladatelství, Praha, 703.
35. Brennan C. S., Cleary L. J., 2005: The potential use of cereal (1→3,1 →4)-β-Dglucans as functional food ingredients. *Jornal of Cereal Science*, 42, 1: 1-13.
36. Burkus Z., Temelli F., 1998: Effect of extraction conditions on yield, composition, and viscosity stability of barley beta-glucan gum. *Cereal Chemistry*, 75, 6: 805-809.

37. Burkus Z., Temelli F., 1997: Extraction and functional properties of barley beta-glucan as affected by temperature and pH. *Journal of Food Science*, 62, 6: 1194.
38. Carr J. M., 1990: Enzymatic determination of beta-glucan in cereal-based food-products. *Cereal Chemistry*, 67, 3: 226-229.
39. Cave N. A., Wood P. J., Burrows V. D. 1992: Estimation of an acceptable beta-glucan level for broiler chick diets. *Can. J. Anim. Sci.*, 72, 691-694.
40. Dawkins N. L., Gager J., Cornillon J. P., 2001: Comparative studies on the physicochemical properties and hydration behavior of oat gum and oatrim in meat-based patties. *Journal of Food Science*, 66, 9: 1276-1282.
41. Dawkins N. L., Nnanna I. A., 1995: Studies on oat gum ((1→3)(1→4)-beta-D-glucan)-composition, molecular-weight estimation and rheological properties. *Food Hydrocolloids*, 9, 1: 1-7.
42. Dawkins N. L., Nnanna I. A., 1993: Oat gum and β -glucan extraction from oat bran and rolled oats-temperature and pH effects. *Journal of Food Science*, 58, 3: 562-566.
43. Deng Ch., Yang X. L., Gu X. M., Wang Y., Zhon J. Y., Xu H. B., 2000: A-beta-D-glucan from the sclerotia of *Pleurotus tuberregium* (Fr.) Sing. *Carbohydrate research*, 328, 4: 629-633.
44. Dervilly-Pinel G., Rimsten L., Saulnier L., Andersson R., Aman P., 2001: Water-extractable arabinoxylan from pearled flours of wheat, barley, rye and triticale. Evidence for the presence of ferulic acid dimers and their involment in gel formation. *Journal of Cereal Science*, 34, 2: 207-214.
45. Dritz S. S., 1995: Influence of dietary β -glucan on growth performance, nonspecific immunity, and resistance to *Streptococcus suis* infection in weanling pigs. *J. Anim. Sci.*, 73, 3341-3350.
46. Dubois M., Giles K. A., Hamilton J. K., Rebers P. A., Smith F., 1956: Colorimetric method or determination of sugar and related substances. *Anal. Chemistry*, 28, 350.
47. Eckschlager K., Horsák I., Kodejš Z., 1980: Vyhodnocování analytických výsledků a metod. SNTL Praha, ALFA Bratislava, 04-610-80, 223.
48. Ehrenbergerová J., Vaculová K., Zimolka J., 1997: Grain quality of hull-less spring barley from different cropping systems. *Rostlinná výroba*, 43, 12: 585-592.

49. Faraj A., Vasanthan T., Hoover R., 2006: The influence of alpha-amylase-hydrolysed barley starch fractions on the viscosity of low and high purity barley beta-glucan concentrates. *Food Chemistry*, 96, 1: 56-65.
50. Frank J., Sundberg B., Kamal-Eldin A., Vessby B., Aman P., 2004: Yeast-leavened oat breads with high or low molecular weight beta-glucan do not differ in their effects on blood concentrations of lipids, insulin, or glucose in humans. *Journal of Nutrition*, 134, 6: 1384-1388.
51. Guttierrez A., Prieto A., Martinez A. T., 1996: Structural characterization of extracellular polysaccharides produced by fungi from the genus *Pleurotus*. *Carbohydrate research*, 281, 1: 143-154.
52. Hallmans G., Zhang J. X., Lundin E., Landstrom M., Aman P., Adlercreutz H., Harkonen H., Knudsen K. E. B., 1997: Influence of rye bran on the formation of bile acids and bioavailability of lignans. *Cereal Foods World*, 42, 8: 696-701.
53. Hallmans G., Zhang J. X., Lundin E., Stattin P., Johansson I., Hulten K., Winkvist A., Lenner P., Aman P., Adlercreutz H., 2003: Rye, lignans and human health. *Proceedings of the Nutrition Society*, 62, 1: 193-199.
54. Haraldsson A. K., Rimsten L., Alminger M. L., Andersson R., Andlid T., Aman P., Sandberg A. S., 2004: Phytate content is reduced and beta-glucanase activity suppressed in malted barley steeped with lactic acid at high temperature. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84, 7: 653-662.
55. Haraldsson A. K., Rimsten L., Alminger M. L., Andersson R., Aman P., Sandberg A. S., 2005: Digestion of barley malt porridges in a gastrointestinal model: Iron dialysability, iron uptake by Caco-2 cells and degradation of beta-glucan. *Journal of Cereal Science*, 42, 2: 243-254.
56. Henri R. J., 1988: The carbohydrates of barley grains- a review. *Journal of The Institute of brewing*, 94, 2: 71-78.
57. Hubík K., Tichý F., 1996: Vliv ekologických a pěstitelských faktorů na obsah beta-glukanů v ovsu. *Rostlinná výroba*, 42,1: 29-33.
58. Cheung P. C. K., Lee M. Y., 2000: Fractination and characterization of mushroom dietary fiber as potential nutraceuticals from sclerotia of *Pleurotus tuberregium* (Fries) Singer. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 8: 3148-3151.

59. Inglett G. E., Newmann R. K., 1994: Oat beta-glucan amyloextrins: Preliminary preparations and biological properties. *Pl. Fds. Hum. Nutr.*, 45, 53-61.
60. Jorgensen K. G., 1988: Quantification of high molecular weight beta-D-glucan using calcofluor komplex formation and flow injection analysis. I. Analytical principle and its standardization. *Carlsberg Res. Commun.*, 53, 277-285.
61. Kalač P., 2003: *Funkční potraviny*. DONA, Č. Budějovice, ISBN 80-7322-029-06, 130.
62. Kalač P., Míka V., 1997: *Přirozené škodlivé látky v rostlinných krmivech*. ÚZPI Praha, ISBN 80-85120-96-8, 317.
63. Karkalas J., 1985: An improved enzymatic method for determination of native and modified starch. *J. Sci. Food Agric.*, 36, 1019.
64. Kidd P. M. 2000: The use of mushroom glucans and proteoglycans in cancer treatment. *Altern. Med. Rev.* 5: 4.
65. Kodet J., Babor K., 1991: *Modifikované škroby*. SNTL Praha, 04-801-91, 326.
66. Kojima T., Tabata K., Itoh W., Yanaki T., 1986: Molecular weight dependence of the antitumor activity of schizophyllan. *Agricultural Biological Chemistry*, 50, 231–232.
67. Lazaridou A., Biliaderis C. G., 2007: Molecular aspects of cereal β -glucan functionality: Physical properties, technological applications and physiological effects. *Journal of Cereal Science*, 46, 101-118.
68. Lund E. K., Gee J. M., Brown J. C., Wood P. J., Johnson I. T., 1989: Effect of oat gum on the physical properties of gastrointestinal contents and the uptake of D-galactose and cholesterol by rat small intestine. *British J. Nutr.*, 62, 91.
69. Manzi P., Pizzoferrato L., 2000: Beta-glucans in edible mushrooms. *Food Chemistry*, 68, 315-318.
70. MC Cleary B., Glenie-Holmes M. G., 1985: Enzymatic quantification of (1 \rightarrow 3) (1 \rightarrow 4) beta-glucan in barely and malt. *Journal of the Institute of Brewing*, 91, 285-295.
71. Mizuno T., 1996: A development of antitumour polysaccharides from mushroom fungi. *Food Ingredients Journal (Japan)*, 167, 69-85.
72. Newmann R. K., Newmann C. W., Graham H., 1989: The hypocholesterolemic function of barley β -glucans. *Cereal Foods World*, 34, 883-886.

73. Nilsson M., Aman P., Harkonene H., Hallmans G., Knudsen K. E. B., Mazur W., Adlercreutz H., 1997: Content of nutrients and lignans in roller milled fractions of rye. *Journal of The Science of Food and Agriculture*, 73, 2: 143-148.
74. Nilsson M., Andersson R., Aman P., 1999: Arabinoxylan fractionation on DEAE-cellulose chromatography influenced by protease pre-treatment. *Carbohydrate Polymers*, 39, 4: 321-326.
75. Nnanna I. A., Dawkins N. L., 1996: Adsorption-isotherm and effect of gum blends on viscosity and microstructure of oat gum (beta-D-glucan). *Journal of Food Science*, 61, 1: 121-126.
76. Nnanna I. A., Gupta S. V., 1996: Purification and partial characterization of oat bran globulin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 11: 3494-3499.
77. Novák M., 2007: β -glukany, historie a současnost. *Chemické listy*, 101, 872-880.
78. Pettersson D., Aman P., Knudsen K. E. B., Lundin E., Zhang J. X., Hallmans G., Harkonen H., Adlercreutz H., 1996: Intake of rye bread by ileostomists increases ileal excretion of fiber polysaccharide components and organic acids but does not increase plasma or urine lignans and isoflavonoids. *Journal of nutrition*, 126, 12: 3143-3143.
79. Preece I. A., Hobkirk R., 1954: Non-starch polysaccharide of cereal grains. V. Some hemicellulose fractions. *J. Inst. Brew. London*, 60, 490.
80. Preece I. A., Mackenzie K. G., 1952: Non-starchy polysaccharide of cereal grains. III. Higher molecular weight gums of common cereals. *J. Inst. Brew. London*, 59, 385.
81. Prugar J., 2008: Kvalita rostlinných produktů na prahu 3. tisíciletí. Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, komise jakosti rostlinných produktů ČAZV, Praha, 327.
82. Rakha A. Aman P., Andersson R., 2010: Characterisation of dietary fibre components in rye products. *Food Chemistry*, 119, 859-867.
83. Rakszegi M., Bedo Z., Ward J. L., 2010: The HEALTHGRAIN Wheat Diversity screen: Effects of Genotype and Environment on Phytochemicals and Dietary Fiber Components. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 17: 9291-9298.

84. Rimsten L., Haraldsson A. K., Andersson R., Alminger M., Sandberg A. S., Aman P., 2002: Effects of malting on beta-glukanase and phytase activity in barley grain. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 82, 8: 904-912.
85. Rimsten L., Stenberg T., Andersson R., Andersson A., Aman P., 2003: Determination of beta-glucan molecular weight using SEC with calcoflour detection in cereal extracts. *Cereal Chemistry*, 80, 4: 485-490.
86. Roubroeks J. P., Andersson R., Aman P., 2000: Structural features of (1→3),(1→4)-beta-D-glucan and arabinoxylan fraction isolated from rye bran. *Carbohydrate Polymers*, 42, 1: 3-11.
87. Roubroeks J. P., Andersson R., Mastromauro D. I., Christensen B. E., Aman P., 2001: Molecular weight, structure and shape of oat (1→3),(1→4)-beta-D-glucan fractions obtained by enzymatic degradation with (1→4)-beta-D-glucan 4-glucanohydrolase from *Trichoderma reesei*. *Carbohydrate Polymers*, 46, 3: 275-285.
88. Roubroeks J. P., Mastromauro D. I., Andersson R., Christensen B. E., Aman P., 2000: Molecular weight, structure, and shape of oat (1→3),(1→4)-beta-D-glucan fractions obtained by enzymatic degradation with lichenase. *Biomacromolecules*, 1, 4: 584-591.
89. Saastamoinen M., Plaami S., Kumpulainen J., 1992: β -Glucan and Phytic Acid Content of Oats Cultivated in Finland. *Acta Agric. Scand. Sect. B, Soil and Plant Sci.*, 42, 6-11.
90. Silovská Š., 2007: Houbové β -(1→3)-D-glukany a možnosti využití jejich fyziologických účinků při výrobě funkčních potravin. Písemný materiál k SDZ, ZF JČU v Českých Budějovicích, 27.
91. Skalar methods. Analysis., 1992: β -glucan. *Catnr. issue 0126000/MH/99208841*, 349-202.
92. Shewry P. R., Piironen V., Lampi A. M., Edelmann M., Kariluoto S., Nurmi T., Fernandez-Orozco R., Andersson A. A. M., Aman P., Fras A., Boros D., Gebruers K., Dornez E., Courtin C. M., Delcour J. A., Ravel C., Charmet G., Rakszegi M., Bedo Z., Ward J. L., 2010: Effect of Genotype and Environment on the Content and Composition of Phytochemicals and Dietary Fiber Components in Rye in the Healthgrain Diversity Screen. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 17: 9372-9383.
93. Stratil P., 1993: ABC zdravé výživy, I, vl. náklad, Brno, 345.

94. Sundberg B., Abrahamsson L., Aman P., 1994: Quality of Rolled Barley Flakes as Affected by Batch of Grain and Processing Technique. *Plant Foods for Human Nutrition*, 45, 2: 145-154.
95. Symons L. J., Brennan C. S., 2004: The effect of barley beta-blucan fiber fraction on starch gelatinization and pasting characteristics. *Journal of Food Science*, 69, 4: 257-261.
96. Thammakiti S., Suphantharika M., Phaesuwan T., 2004: Preparation of spent brewer's yeast beta-glucans for potential applications in the food industry. *International Journal of Food Science and Technology*, 39, 1: 21-29.
97. Theander O., Aman P., 1979: Studies on Dietary-Fibers. 1. Analysis and Chemical Characterization of Water-Soluble and Water-Insoluble Dietary-Fibers.
98. Theander O., Aman P., 1978: Chemical composition of some swedish cereal straws. *Swedish Journal of Agricultural Research*, 8, 4: 189-194.
99. Theander O., Aman P., Westerlund E., Graham H., 1994: Enzymatic Chemical-Analysis of Dietary Fiber. *Journal of Aoac International*, 77, 3: 703-709.
100. Theander O., Aman P., Westerlund E., Andersson R., Petersson D., 1995: Total dietary fiber determined as neutral sugar residues, uronic acid residues, and Klason Lignin (The Uppsala method): Collaborative study. *Journal of Aoac International*, 78, 4: 1030-1044.
101. Tejinder S., 2003: Preparation and characterization of films using barley and oat beta-glucan extracts. *Cereal Chemistry*, 80, 6: 728-731.
102. Tejinder S., Bhupinder K., Harinder K., 2000: Flow behavior and functional properties of barley and oat water-soluble beta-D-glucan rich extractions. *International Journal of Food Properties*, 3, 2: 259-274.
103. Tosh S. M., Wood P. J., Wang Q., Weiss J., 2004: Structural characteristics and rheological properties of partially hydrolyzed oat β -glucan: the effects of molecular weight and hydrolysis Metod. *Carbohydrate Polymers*, 55, 425-436.
104. Tosh S. M., Wood P. J., Wang Q., 2002: Gelation characteristics of acid-hydrolyzed oat beta-blucan solutions solubilized at a range of temperatures. *Food Hydrocolloids*, 17, 523-527.
105. Trogh I., Courtin C. M., Andersson A. A. M., Aman P., Sorensen J. F., Delcour J. A., 2004: The combined use of hull-less barley flour and xylanase as a strategy for wheat/hull-less barley flour breads with increased arabinoxylan

- and (1→3,1→4)-beta-D-glucans levels. *Journal of Cereal Science*, 40, 3: 257-267.
106. Vasanthan T., Bhatta R. S., 1995: Starch purification after pin milling and air classification of Waxy, normal, and high amylose barleys. *Cereal Chemistry*, 72, 4: 379-384.
107. Velíšek J., 1999: *Chemie potravin 1.*, OSSIS Tábor, ISBN 80-902391-3-7, 352.
108. Větvička V., Modrianský M., 2000: Nový imunitu posilující přípravek, který obsahuje beta-glukan. *Lékárna*, 2, 3.
109. Volikakis P., Biliaderis C. G., Vamakas C., Zerfiridias C. K., 2004: Effects of a commercial oat-beta-glucan concentrate on the chemical, physicochemical and sensory attributes of a low-fat white brined cheese product. *Food Research International*, 37, 83-94.
110. Wasser S. P., Weis A. L., 1999: Therapeutic effect of substance occurring in higher Basidiomycetes mushrooms. *Crit Rev Immunol*, 19, 1: 65-69.
111. Welch R. W., Lloyd J. D., 1989: Kernel (→3) (1→4) Beta D-glucan content of oat genotypes. *J. Cereal Sci*, 9, 35.
112. Westerlund E., Andersson R., Aman P., 1993: Isolation and Chemical Characterization of Water-Soluble Mixed-Linked Beta-glucans and Arabinoxylans in Oat Milling Fractions. *Carbohydrate Polymers*, 20, 2: 115-123.
113. Westerlund E., Andersson R., Aman P., Theander O., 1990: Effects of Baking on Water-Soluble Nonstarch Polysaccharides in White Bread Fractions. *Journal of Cereal Science*, 12, 1: 33-42.
114. Whyte J. L., 1992: Oat bran lowers plasma cholesterol levels in mildly hypercholesterolemic men. *J. Amer. Diet. Assoc.*, 92, 4: 446-449.
115. Wood P. J., 1977: Determination of beta-glucan in oats and barley. *Cereal Chemistry*, 54, 524.
116. Wood P. J., 1989: Physiological-effects of beta-D-glucan rich fractions from oats, 34, 878.
117. Wood P. J., 1986: Oat β-glucan: structure, location, and properties. In *Oats: Chemistry and Technology*. *Cereal Chemistry*, 121.

118. Wood P. J., 1984: Physicochemical properties and technological and nutritional significance of cereal β -glucan. *Cereal Polysaccharides in Technology and Nutrition. Cereal Chemistry*, 35-78.
119. Wood P. J., Braaten J. T., Frezer W. S., Riededel D., Poste L. M., 1990: Comparison of viscous properties of oat and guar gum, and effects of these and oat bran on glycemic index. *Food Chemistry*, 38, 753.
120. Wood P. J., Siddique I. R., Paton D., 1978: Extraction of high viscosity gum from oats. *Cereal Chemistry*, 61, 73.
121. Wood P. J., Weisz J., 1984: Use of calcofluor in analysis of beta-D-glucan. *Cereal Chemistry*, 61, 73.
122. Wood P. J., Weisz J., Fedec P., Burrows V. D., 1989: Large scale preparation and properties of oat fraction enriched in (1-3) (1-4)- β -D-glucan. *Cereal Chemistry*, 66, 97.
123. Wood P. J., Weisz J., Mahn W., 1991: Molecular characterization of cereal β -glucans. Size-exclusion chromatography for comparison of molecular weight. *Cereal Chemistry*, 68, 530.
124. Zygmunt L. C., Paisley S. D., 1993: Enzymatic Method for determination of (1 \rightarrow 3) (1 \rightarrow 4) beta-D-glucans in grains and cereals collaborative. *Journal of ADAC International*, 76, 5: 1069-1082.

8. POUŽITÉ SYMBOLY A ZKRATKY

α	- alfa
β	- beta
η	- éta
φ	- ří
AIDS	- Acquired Immune Deficiency Syndrome
BMI	- body
BRMs	- biological response modifiers
BŠ	- bramborový škrob
CMC	- Carboxyl Methyl Cellulose
DDTC	- diethyl dithiokarbamát
FIA	- flow injection analysis
HA	- pleuran
HDL	- lipoprotein s vysokou hustotou
KAŠ	- kvartérní derivát aminoetheru škrobu
KT	- kynuté těsto
LDH	- lipoprotein s nízkou hustotou
M	- Most
NKT	- nekynuté těsto
NSP	- non – strach polysacharides
PV	- původní obsah vody
S	- Soběslav
S	- sterilizované
Š	- Štěpánovice
V+	- přidaná voda

9. PŘÍLOHY

9.1. Seznam publikovaných prací

Silovská Š., Švecová M., Vydra J., Klimeš F., Kolář L.: Objektivní metoda k upřesnění senzoričného hodnocení textury rostlinných produktů. Sborník JU ZF v Č. Budějovicích, 2003 (1), s. 23-27

Silovská Š., Kolář L., Šindelářová M.: Pleuran z hlívy ústříčné (*Pleorotus ostreatus*) a možnosti jeho koncentrace pro výrobu funkčních potravin. Sborník JU ZF v Č. Budějovicích, 2004 (1), s. 45-49

Kolář L., Kužel S., Hanušová A., Gergel J., Ledvina R., Šindelářová M., Silovská Š., Švindl P.: The use of Spectroquant Merk BOD photometric test to evaluate the stability of organic matters in soil. *Plant, Soil and Environment*, 2005 (1), s. 46-50

Silovská Š., Vydra J., Štindl P., Hanušová A., Kužel S., Kolář L.: Řízení a kontrola jakosti zemědělských, potravinářských a ostatních produktů z biomasy oblasti bezlesí horských a podhorských oblastí. Interní grant, Zemědělská fakulta, JU, 2005.

Štindl P., Silovská Š., Kolář L., Kužel S.: Stanovení rozložitelnosti organické hmoty při výrobě bioplynu anaerobní digescí. In *Využití fytohmoty pro energetické účely*, Ekotrend, České Budějovice, 1. září 2005, Ed. Součková H. et al. České Budějovice: Zemědělská fakulta, JU, 2005. ISBN 80-7040-833-2.

Kolář L., Klimeš F., Silovská Š.: Problematika kontroly jakosti biomasy pro energetické účely v závislosti na energetických technologiích. Přednáška na česko-slovenské poradě pícninářských kateder VŠ-ZF JU v ČB, 2005.

Štindl P., Silovská Š., Kubíčková A., Kolář L.: Chemical composition of biomass and hygiene aspects of use of natural sources of bioenergetics. In *Agroregion 2006*, 24.8.-25.8.2006, České Budějovice: Zemědělská fakulta, JU, 2006, p.131-136.

Kubíčková A., Štindl P., Silovská Š., Kolář L., Kužel S.: Energetic woody species in comparison with energetic culm crops and influence of fertilization on biomass quality from the point of view of energy technologies. In *agroregion 2006*, 24.8.-25.8.2006, České Budějovice: Zemědělská fakulta, JU, 2006, p.65-69.

Silovská Š., Štindl P., Hanušová A., Šimonová A., Kolář L.: Výstavba zkušební jednotky pro hodnocení anaerobní biologické rozložitelnosti organických látek

kalem z anaerobní stabilizace podle mezinárodní normy EN ISO 11734. Interní grant, Zemědělská fakulta, JU, 2007.

Kužel S., Kolář L., Tříška J., Cígler P., Vrcholová N., Peterka J., Maroušek J., Silovská Š., Vydra J., Hrubý M.: Technologie pěstování a zpracování *Echinacea purpurea* na extrakt s požadovanými prvky jakosti a podklady pro jeho realizaci. Vědecká monografie. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta, 116s., ISBN 978-80-7394-103-1, 2008.

Velíšek J., Stará A., Li Z.H., Silovská Š., Turek, J.: Comparison of the effects of four anaesthetics on biochemical blood profile and oxidative stress biomarkers of rainbow trout. *Aquaculture* 310: 369-375, 2011. (IF 2009= 1,925)

9.2. Separáty publikovaných prací