

**BETA-GLUKÁNY, VÝZNAMNÉ POLYSACHARIDY HLIVY USTRICOVITEJ
(*PLEUROTUS OSTREATUS*)**

**BETA-GLUCANS: IMPORTANT POLYSACCHARIDES OF *PLEUROTUS
OSTREATUS***

Eva Szabová, Dana Urminská, Anežka Poláková

ABSTRACT

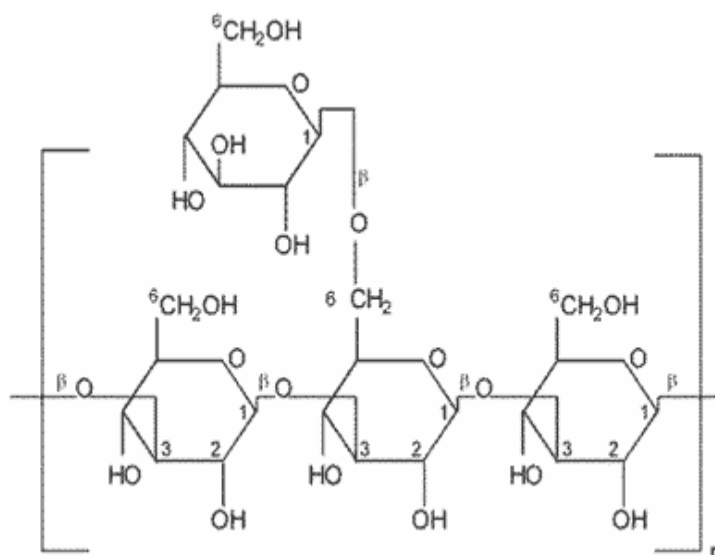
This study was based on two objectives. At first, fruiting bodies of *Pleurotus ostreatus*, an edible mushroom of high nutritional value, were produced by semi-solid fermentation. Wheat straw was used as a lignocellulosis by-product. The other aim was to determine the content of biologically active substance beta-1,3-D-glucan, which is called „pleuran“, in lyophilized fruiting bodies. (1,3)- β -glucans are polysaccharides distributed especially in algae, fungi and yeast, but also in higher plants. They serve a variety of biological functions. They form the major structural components of cell walls, act as storage carbohydrates and also have a protective role. β -glucans thus have medicinal implications too – potent antitumour properties of polysaccharide fractions extracted from certain strains of mushrooms were described in various studies and assigned to 1,3/1,6- β -D-glucan. This polysaccharide substantially enhances the function of the immune system by activating macrophages, belonging to primary immune defence system.

Key words: *Pleurotus ostreatus*, substrate, cultivation, lyophilization, beta-glucan

ÚVOD

Na zemskom povrchu sa denne tvorí obrovské množstvo organických látok. Z nich prevažujúci podiel tvoria vysokomolekulárne látky celulózového a lignínového charakteru, ktoré človek nie je schopný využiť ako potravu. V procesoch deštrukcie a pri využívaní týchto látok vystupujú huby ako vhodné organizmy, pretože mnohé z nich majú enzymatické systémy s vysokou schopnosťou dané látky rozkladať. Do tejto skupiny húb zaraďujeme aj hlivu ustricovitú (*Pleurotus ostreatus*).

Technologický pokrok extrakčných techník umožnil serióznejšiu izoláciu v hubách prítomných polysacharidov, glukánov. Beta-1,3-D-glukány sú rozšírené hlavne v riasach, vláknitých hubách a kvasinkách, ale aj vo vyšších rastlinách. Majú rôzne biologické funkcie. Sú dôležitými štruktúrnymi zložkami bunkových stien, pôsobia ako zásobné polysacharidy a zohrávajú tiež ochrannú úlohu. Huby rodu *Pleurotus* obsahujú vo svojich plodniciach významné množstvo beta-glukánov, ktoré aktivujú bunky pohlcujúce a ničiace infekčné organizmy i nádorové bunky. Beta-glukán izolovaný z *Pleurotus ostreatus*, nazývaný pleuran, má rozvetvenú štruktúru, ktorej jediným štruktúrnym komponentom je glukóza, v hlavnom reťazci viazaná 1,3-glykozidovými väzbami. Pleuran patrí k beta-1,3-D-glukánom obsahujúcim postranné reťazce viazané 1,6 väzbami (Obr. 1) (**Chovancová a Šturdík, 2005**). Beta-glukány rodu *Pleurotus* sa vyznačujú významnými imunomodulačnými, antioxidantnými, protizápalovými a analgetickými vlastnosťami (**Bobek, Galbavý, 2001; Smiderle et al., 2008**). Tieto účinné látky stimulujú odpoveď imunitného systému tým, že aktivujú nešpecifické bunky daného systému, tzv. makrofágy, zvyšujú ich účinok, čím dochádza k zničeniu cudzorodých látok i organizmov alebo poškodených buniek vlastného tkaniva a dochádza k stimulácii produkcie tzv. cytokínov, t.j. bielkovín, ktoré sprostredkovávajú a regulujú aktivitu ďalších buniek imunitného systému. Vďaka týmto vlastnostiam sa glukán stáva lokálnym a systémovým doplnkom pri protinádorovej liečbe (**Browder et al., 1990**). V centrálnom nervovom systéme beta-glukány aktivujú mikrogliové bunky, ktoré hrajú významnú úlohu pri ochrane pred ochorením ako je napr. Alzheimerova choroba alebo AIDS (**Novák, 2007**).



Obrázok 1 Základný molekulárny vzorec hubového beta-1,3/1,6-D-glukánu (www.natures.sk)

Na rozdiel od živočíšnych produktov hľiva neobsahuje cholesterol, naopak, znižuje hladinu celkového cholesterolu aj jeho LDL frakcie v krvi. Preto je dôležitou súčasťou diét určených na zníženie cholesterolu a na prevenciu chorôb srdcovo-cievneho systému (**Macová, 1999; Regula, Siwulski, 2007**).

Polysacharidy jedlých húb a tiež produkty ich čiastočnej hydrolýzy pôsobia ako prebiotiká, ktoré sú definované ako nestráviteľné zložky potravy pôsobiace blahodárne na hostiteľa selektívnou stimuláciou rastu a aktivity črevných probiotických baktérií (**Synytsya et al., 2009; Su et al., 2007**) Taktiež cereálne β -glukány, a hlavne ich oligomérené fragmenty, sa využívajú ako prebiotiká. Stimuláciu rastu probiotických baktérií *Bifidobacterium* sp. a *Lactobacillus* sp. v gastrointestinálnom trakte vyvolávajú aj hydrolyzáty ovsenného β -glukánu (**Kontula et al., 1998**).

Okrem stimulácie rastu probiotických baktérií spôsobujú β -glukány taktiež zvýšenú odolnosť určitých kmeňov voči žlčovým kyselinám, s ktorými sa probiotiká dostávajú do kontaktu pri prechode tenkým črevom a sú vo väčšine prípadov značne inhibované. Pri kultivácii probiotických kultúr so žlčovými kyselinami a β -glukánmi sa ochranný vplyv polysacharidov prejavil zachovaním schopnosti rastu baktérií a vyššou koncentráciou biomasy oproti kontrole bez β -glukánov (**Erban, Komárková, Čopíková, 2006**).

V poslednom čase sa vo svete venuje stále väčšia pozornosť priemyselnej aplikácii β -D-glukánov, prítomných v hľive, pri vývoji a výrobe tzv. funkčných potravín, napr. ako doplnok rozpustnej vlákniny vo forme hydrokoloidných koncentrátov pri výrobe kukuričných tortíl, pudíngov, granulových tyčínok, nízkotučných syrov typu Čedar, prípadne jogurtov s prídavkami müsli. Najmä jogurty sú konzistenčne priam ideálnym médiom pre aplikáciu glukánov vo forme hydrogélův a je ich možné odporučiť ako inovované kyslomliečne výrobky do mliekarenskej výroby (**Hozová et al., 2004; Havrlentová, Gajdošová, Kraic, 2006**).

Počas riešenej úlohy sme mali stanovené dva ciele. Prvým bolo uskutočnenie polosuhej kultivácie hľivy ustricovitej (*Pleurotus ostreatus*), jedlej huby s vysokou nutričnou hodnotou, za účelom získania plodníc, jej pestovaním na lignocelulózovom druhotnom substráte - pšeničnej slame. Ďalším cieľom bolo stanoviť v lyofilizovaných plodniciach danej huby obsah biologicky aktívnej látky, beta-1,3-D-glukánu, ktorý sa nazýva „pleuran“.

MATERIÁL A METODIKA

Získanie produkčného kmeňa

Čistá kultúra hlivy ustricovitej sa získala zo zaočkovaného substrátu, pšeničnej slamy, a zo zakúpených plodníc danej jedlej huby. Viacnásobným preočkovávaním a kultiváciou počas 7-10 dní v biologickom termostate pri 25 °C sa získal produkčný kmeň, ktorý sa uchovával na Petriho miskách so zemiakovo-glukózovým agarom v chladiarni pri teplote 7 °C.

Príprava sadiva

Pšeničné zrná sa po premytí a po približne 6-hodinovom máčaní v destilovanej vode vysterilizovali v parnom sterilizátore pri 121 °C a vychladnuté zaočkovali získaným produkčným kmeňom hlivy ustricovitej. Kultivácia prebiehala v biologickom termostate po dobu 10-14 dní pri teplote 25 °C. Získané sadivo sa uchovávalo v chladiarni pri 7 °C.

Príprava substrátu

Na polosuchú kultiváciu hlivy ustricovitej sa použila pšeničná slama ako nutrične menej hodnotný rastlinný substrát, ktorý bol získaný z Inštitútu vzdelávania, výskumu a poradenstva v Kolíňanoch.

Čistá a suchá slama sa musela vhodne fyzikálne upraviť (posekať), pretože hliwa je aeróbnym organizmusom, ktorý pre svoj rast potrebuje kyslík a preto použitý substrát musí byť vzdušný. Optimálne pripravený substrát z pšeničnej slamy má obsahovať kúsky, ktorých dĺžka sa pohybuje v rozmedzí od 1-2 cm. Takto pripravený rastlinný substrát prijme do seba približne 70% vody a poskytne hlive dobré prostredie pre rozmnožovanie sa.

Preparácia substrátu

Dobré prevlhčenie substrátu je rozhodujúce pre výsledok pestovania. Ku 0,8 kg pšeničnej slamy sa prilialo približne 4-5 dm³ vriacej vody a nechala sa preparovať asi 5-6 hodín. Preparovaním horúcou vodou sa substrát aj čiastočne vysterilizoval, aby ho hliwa mohla rýchlo kolonizovať a získala na ňom prevahu.

Kultivácia hlivy ustricovitej v plastových vreciach

Preparovaný substrát sa v sterilnom prostredí zaočkoval sadivom a dobre natlačil do perforovaných igelitových vriec s odstrihnutými spodnými rohmi, aby mohla vytekať prebytočná voda. Otvormi na vreciach môže unikať vytvorený oxid uhličitý. Vrecia sa uložili do tmavej, chladnej miestnosti s teplotou približne 15-20 °C a nechali prerastať asi 3 týždne. Dostatočné prerastenie substrátu mycéliom sa prejavilo zbelením a stmelením obsahu vreca. Vrecia s prerasteným substrátom sa na noc uložili do chladiarne, v ktorej bolo približne 7 °C, pretože schladenie substrátu podporuje tvorbu plodníc. Na prerastených vreciach sa narezali otvory a preniesli sa do svetlej miestnosti s vhodnými podmienkami pre fruktifikáciu. Plodnice sa vytvorili asi za 1-2 týždne pri teplote 20-25 °C a pri zabezpečenom pravidelnom vlhčení a vetraní miestnosti, aby sa odstránil vznikajúci CO₂.

Lyofilizácia plodníc hlivy ustricovitej

Plodnice hlivy ustricovitej sa po zmrazení na -18 °C vysušili lyofilizáciou a zomleli na prášok. V takto pripravených vzorkách sa enzymaticky stanovoval obsah beta-glukánov.

Enzymatické stanovenie β-glukánov

Obsah β-glukánov bol stanovený enzymaticky metódou Mushroom and yeast Beta-glucan Assay Procedure K-YBGL 04/2008 (Megazyme, Írsko).

Kým niektoré β-glukány sú rozpustné v horúcej vode alebo v horúcom KOH, tieto rozpúšťadlá nie sú účinné, čo sa týka rozpustnosti β-glukánov z kvasiniek alebo vláknitých

húb. Analýzy týchto glukánov vyžadujú najprv ich čiastočnú kyslú hydrolyzu koncentrovanou HCl za účelom odstránenia gél-tvoriacich vlastností a kovalentných väzieb s inými polysacharidmi alebo bielkovinami. Hydrolyza na D-glukózy je ukončená inkubáciou so zmesou vysoko purifikovaných enzýmov, exo-1,3- β -glukanázy a β -glukozidázy.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Pri intenzívnom spôsobe pestovania sa ako substrát najčastejšie využíva slama. Touto hmotou podhubie rýchlo prerastá a celý pestovateľský cyklus je preto podstatne kratší ako pri pestovaní na dreve. Intenzívne pestovanie však vyžaduje špeciálne kultivačné priestory. Technológia je tiež trochu zložitejšia, vyžaduje si tepelné preparovanie substrátu a svetlú vetranú miestnosť s teplotou okolo 15-20 °C. Rodivosť je však veľmi skorá, intenzívnejšia, aj keď krátkodobá (**Šašek, Jablonský, Baier, 2001; Jablonský, 1997**).

Pri pestovaní intenzívnym spôsobom sú v substráte často prítomné zárodky ďalších druhov húb, ktoré sú schopné rásť na substráte rovnako rýchlo ako hľiva. Preto sú potrebné opatrenia, ktoré umožňujú rýchly rast podhubia hľivy a obmedzia vývoj konkurenčných húb. Preparovaním sa substrát čiastočne vysterilizuje, ale ak je substrát príliš mokry, osídľujú ho baktérie. Substrát nemá byť ani príliš suchý, pretože to vyhovuje rastu zelených vláknitých húb. Je vhodné ak sa po pasterizácii v substráte namnožia niektoré baktérie rodu *Pseudomonas*, *Bacillus* a streptomycéty. Produkty týchto mikroorganizmov potláčajú rast zelených húb a sú využívané podhubím hľivy (**Lepšová, 2001**).

Kuniak a Augustín (1990) objavili v hľive ustricovitej glukán ako jednu z najúčinnějších imunostimulačných látok. Podľa latinského názvu domáceho zdroja liečivej huby, hľivy ustricovitej, bol tento beta-1,3-glukán nazvaný pleuran.

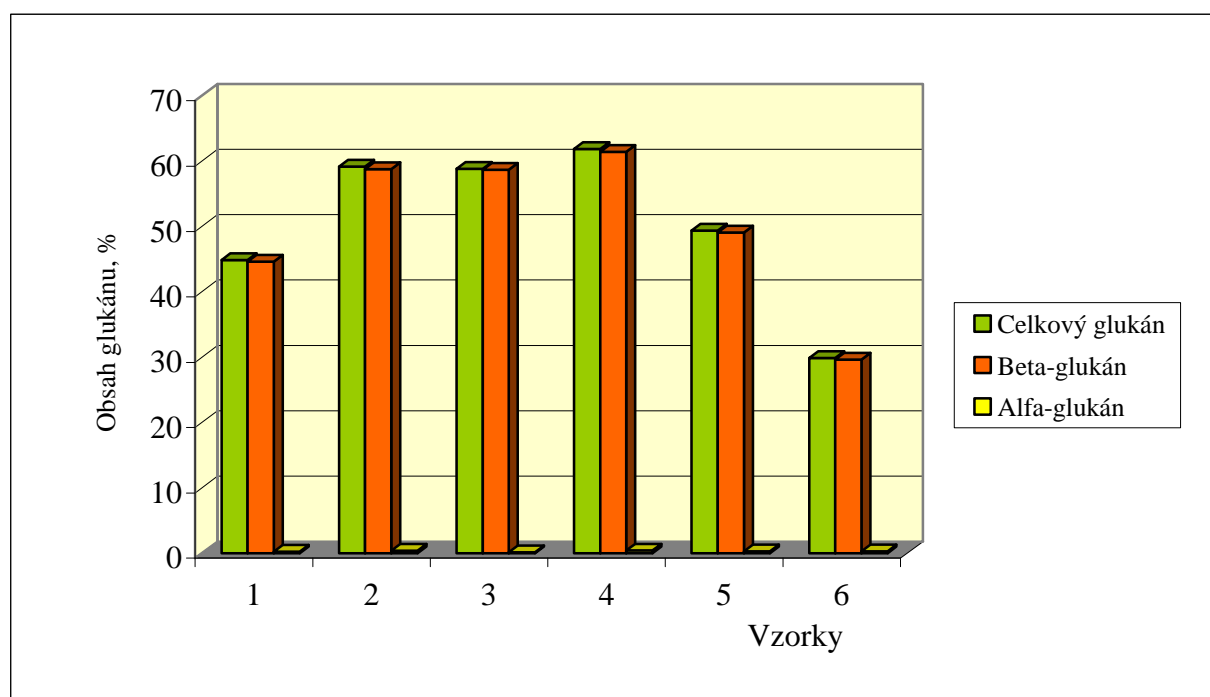
V zlyofilizovaných plodniciach a stonkách hľivy ustricovitej sa na našom pracovisku stanovil obsah celkového, alfa- a beta-glukánu (Tab. 1). Rozdiely v obsahu jednotlivých glukánov u daných vzoriek boli pravdepodobne spôsobené pestovaním na rôznych druhotných substrátoch.

Na základe enzymatického stanovenia β -glukánu sa zistilo, že obsah daného polysacharidu je vyšší v stonkách (58,79 %) než v plodniciach (44,61 %) nami vypestovanej hľivy ustricovitej. Predpokladá sa, že vyššia koncentrácia glukánu v stonkách súvisí s vyšším obsahom ich sušiny v porovnaní s plodnicami hľivy. K rovnakému záveru, vzhľadom k obsahu glukánu v plodniciach a stonkách hľivy, použitím tej istej enzymatickej metódy, dospeli aj **Míčková et al. (2006)**. V ďalších vzorkách hľivy ustricovitej, zakúpených a získanej z prírody, sa lyofilizovali plodnice spolu so stonkami, z dôvodu malého množstva stoniek. Aj autori **Sekretár et al. (2003)** zistili, že obsah pleuranu v sušine plodníc hľivy ustricovitej sa pohybuje v rozmedzí 60–65 %. Obsah alfa-glukánu vo vláknitých hubách je veľmi nízky, čo okrem nás potvrdili aj ďalší autori v štúdiách zaoberajúcich sa štruktúrou a obsahom glukánov v jednotlivých jedľách hubách (**Wasser, 2002; Synytsya et al., 2008**).

Tabuľka 1 Obsah celkového, α - a β -glukánu v suchej hmote jedlej huby, hlivy ustricovitej

Hliva ustricovitá	Obsah glukánu v suchej hmote hlivy ustricovitej		
	Celkový glukán, %	α -glukán, %	β -glukán, %
Vypestované plodnice -KBB	44,83	0,22	44,61
Vypestované stonky plodníc - KBB	59,17	0,38	58,79
plodnice + stonky hlivy - príroda	58,81	0,11	58,70
plodnice + stonky hlivy – kúpená	61,84	0,41	61,43
plodnice + stonky hlivy - súkromník	49,33	0,28	49,05
plodnice + stonky hlivy – Maďarsko	29,89	0,26	29,63

Vysvetlivky: KBB – Katedra biochémie a biotechnológie, FBP, SPU v Nitre



Obrázok 1 Obsah glukánu v suchej hmote hlivy ustricovitej

Vysvetlivky: 1 – vypestované plodnice hlivy (KBB, FBP, SPU v Nitre)
 2 – vypestované stonky plodníc hlivy (KBB, FBP, SPU v Nitre)
 3 – plodnice + stonky hlivy ustricovitej - príroda
 4 – plodnice + stonky hlivy ustricovitej - kúpená
 5 – plodnice + stonky hlivy ustricovitej - súkromník
 6 – plodnice + stonky hlivy ustricovitej - Maďarsko

K zaujímavým výsledkom z hľadiska využitia hlivy ustricovitej dospel **Lelley a Schies (1995)**. Sledovali hlivu ako zdroj beta-1,3-glukánov, pričom zistili, že táto drevokazná huba je výhodnou surovinou na jeho izoláciu a možno z nej získať až 50 %-ný výťažok beta-1,3-glukánu, čo je asi 5x viac ako z pekárskeho droždia.

Na základe výsledkov **Bobeka et al. (1991)** sa zistilo, že 2 % obsah hlivy ustricovitej v diéte veľmi efektívne a dlhodobo brzdí nárast hladiny cholesterolu a triacylglyceridov v krvnom sére i v pečeni, čím výrazne znižuje vznik aterosklerózy.

ZÁVER

Kultiváciou hlivy ustricovitej v plastových vreciach na pšeničnej slame a následnou fruktifikáciou prerasteného substrátu sa získali plodnice danej jedlej huby. V zlyofilizovanej hlive sa stanovil vysoký obsah polysacharidov, β -glukánov, ktoré sa v súčasnosti intenzívne skúmajú pre svoje významné protinádorové, imunomodulačné, antioxidačné, protizápalové a analgetické vlastnosti.

LITERATÚRA

- BOBEK, P., GINTER, E., JURKOVIČOVÁ, M., 1991. Cholesterol lowering effect of the mushrooms *Pleurotus ostreatus* in heredity hypercholesterolemic rats. In *Annals of Nutrition and Metabolism*, vol. 35, 1991, p. 191 - 195.
- BOBEK, P., GALBAVÝ, S., 2001. Effect of pleuran (β -glucan from *Pleurotus ostreatus*) on the antioxidant status of the organism and on dimethylhydrazine-induced precancerous lesions in rat colon. In *British Journal of Biomedical Sciences*, vol. 58, 2001, p. 164-168.
- BROWDER, W., WILLIAMS, D., PRETUS, H., 1990. Beneficial effect of enhanced macrophage function in the trauma patient. In *Annals of Surgery*, vol. 1, 1990, p. 605 - 613.
- ERBAN, E., KOMÁRKOVÁ, E., ČOPIKOVÁ J., 2006. β -glukany jako probiotikum – simulace růstu probiotických bakterií. In *Chemické listy*, roč. 100, 2006. s. 841.
- HAVRENTOVÁ, M., GAJDOŠOVÁ, A., KRAIC, J., 2006. Štúdium variability obsahu β -D-glukánu v zrnách obilnín a pseudoobilnín. In *Chemické listy*, roč. 100, 2006. s. 842.
- HOZOVÁ, B., 2004. Zvýšenie bioaktivity jogurtov pomocou prídavku beta-D-glukánov izolovaných z húb. In *Mliekarstvo – Bulletin pre internú potrebu výrobcov a spracovateľov mlieka*, roč. 35, 2004, č. 3, s. 35 - 37. ISSN 1210-3144.
- CHOVANCOVÁ, A., ŠTURDÍK, E., 2005. Vplyv beta-glukánov na imunitný systém človeka. In *Nová Biotechnologica*, roč. 5, 2005, č. 1, s. 105 - 109.
- JABLONSKÝ, I., 1997. Pěstování hub ve velkém i malém. Praha : Brázda, 1997, 176 s. ISBN 80 - 20902 - 64 - 6.
- KONTULA, P., JASKARI, J., NOLLET, L., DE SMET, I., VON WRIGHT, A., POUTANEN, K., 1998. The colonization of a simulator of the human intestinal microbial ecosystem by a probiotic strain fed on a fermented oat bran product: Effects on the gastrointestinal microbiota. In *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 50, 1998, p. 246-252.
- KUNIAK, Ľ., AUGUSTÍN, J., 1990. Spôsob prípravy malto oligosacharidov. In *Zborník III. Celoštátnej konferencie pestovateľov hliv*. Bratislava : 1990, s. 18 - 20.
- LELLEY, J., SCHIES, U., 1995. Advantages of the semianaerobic process for *Pleurotus* substrate production. Fungi as food in Africa. Proceeding of a symposium held during the Fifth international mycological congress, Vancouver, Canada, 1994. In *African Journal of Mycology and Biotechnology*. vol.1, 1995, no. 12, p. 226 – 289.
- LEPŠOVÁ, A., 2001. Zázračná houba? Hlíva ustričná. Brno : Víkend, 2001, 64 s. ISBN 80 – 72221 -81 – 7.
- MACOVÁ, E., 1999. Hliva ustricovitá. In *Liečivé rastliny*, roč. 36, 1999, č. 3, s. 88 – 89.
- MÍČKOVÁ, K., SYNYTSYA, A., ČOPIKOVÁ, J., ČERNÁ, J., MARYŠKA, M., COIMBRA, M.A., SPĚVÁČEK, J., 2006. Charakterizace struktury polysacharidů izolovaných z *Pleurotus* sp. a *Agaricus blazei*. In *Chemické listy*, roč. 100, 2006. s. 846.
- NOVÁK, M., 2007. Beta-glukany, historie a současnost. In *Chemické listy*, roč. 101, 2007, s. 872 - 880.

- REGULA, J., SIWULSKI, M., 2007. Dried Shiitake (*Lentinula edodes*) and oyster (*Pleurotus ostreatus*) mushrooms as a good source of nutrient. In *Acta Scientiarum Polonorum, Technology Alimentarum*, vol. 6, 2007, no. 4, p. 135-142.
- SEKRETÁR, S., KUNIAK, Ľ., SCHMIDT, Š., ŠTEFÁNIKOVÁ, Z., 2003. Hliva ustricovitá – významný zdroj imunomodulačného β -(1 \rightarrow 3)-D-glukánu. In *Životné podmienky a zdravie, Zborník vedeckých prác*, 2003, s. 148-149.
- SMIDERLE, F.R., OLSEN, L.M., CARBONERO, E.R., BAGGIO, C.H., FREITAS, C.S., MARCON, R., 2008. Anti-inflammatory and analgasic properties in a rodent model of a (1 \rightarrow 3),(1 \rightarrow 6)-linked β -glucan isolated from *Pleurotus pulmonarius*. In *European Journal of Pharmacology*, vol. 597, 2008, p. 86-91.
- SU, P., HENRIKSSON, A., MITCHELL, H., 2007. Selected prebiotics support the growth of probiotic monocultures in vitro. In *Anaerobe*, vol. 13, 2007, p. 134-139.
- SYNYTSYA, A., MÍČKOVÁ, K., SYNYTSYA, A., JABLONSKÝ, I., SPĚVÁČEK, J., ERBAN, V., KOVARÍKOVÁ, E., – ČOPÍKOVÁ, J., 2009. Glucans from fruit bodies of cultivated mushrooms *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus eryngii*: Structure and potential prebiotic activity. In *Carbohydrate polymers*, vol. 76, 2009, p. 548-556.
- SYNYTSYA, A., MÍČKOVÁ, K., JABLONSKÝ, I., SLUKOVÁ, M., ČOPÍKOVÁ, J., 2008. Mushrooms of Genus *Pleurotus* as a Source of Dietary Fibres and Glucans for Food Supplements. In *Czech Journal of Food Science*, vol. 26, 2008, no. 6, p. 441-446.
- ŠAŠEK, V., JABLONSKÝ, I., BAIER, J., 2001. Pěstujeme houby. Grada, 2001, 108 s. ISBN 80-24701-47-2.
- WASSER, S.P., 2002. Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. In *Application of Microbiological Biotechnology*, vol. 60, 2002, p. 258-274.
- <http://www.natures.sk/old/SK/beta-glukan.htm>

Kontaktná adresa:

Ing. Eva Szabová, PhD., Katedra biochémie a biotechnológie, Fakulta biotechnológie a potravinárstva, SPU v Nitre, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra

Eva.Szabova@uniag.sk

Doc. RNDr. Dana Urminská, CSc., Katedra biochémie a biotechnológie, Fakulta biotechnológie a potravinárstva, SPU v Nitre, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra

Dana.Urminska@uniag.sk

Ing. Anežka Poláková, Katedra biochémie a biotechnológie, Fakulta biotechnológie a potravinárstva, SPU v Nitre, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra

Anezka.Polakova@uniag.sk