

2022

ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů



Fortifikace substrátů vybraných léčivých druhů hub selenem a zinkem

CERTIFIKOVANÁ METODIKA

Ivan Jablonský a kol.

© Autorský kolektiv

Ing. Ivan Jablonský CSc. (ČZU v Praze)

Doc. Ing. Pavel Klouček Ph.D. (ČZU v Praze)

Ing. Lukáš Praus Ph.D. (ČZU v Praze)

Doc. Ing. Martin Koudela Ph.D. (ČZU v Praze)

Bc. Miroslav Jozífek (ČZU v Praze)

Ing. Zdeněk Sváta (Terezia Company, Praha)

Oponenti:

Ing. Michaela Budňáková

RNDr. Vladimír Erban, CSc.

Vydáno *vlastním nákladem katedry zahradnictví Fakulty agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů – Česká zemědělská univerzita v Praze v roce 2022.*

Anotace

Metodika se zaměřuje na využití poznatků domácího i zahraničního výzkumu při obohacování substrátů seleničitanem sodným a síranem zinečnatým pro pěstování některých druhů hlív a lesklokorek a různých kmenů korálovce ježatého. Substráty (obohacené piliny, případně pšeničná sláma) pro zmíněné druhy a kmeny léčivých hub byly obohacovány 2, 6 a 8 mg Se (Na_2SeO_3) a 10, 20 a na 1 kg substrátu a 10 mg, 20 mg a 40 mg Zn (ZnSO_4). Se zvyšující se dávkou seleničitanu sodného se zvyšoval úměrně i obsah selenu v plodnicích. Selen se neakumuloval v plodnicích stejnoměrně, a tak zjištěné obsahy selenu v kloboucích byla vyšší než ve třeních. Navzdory vyšším dávkám Zn do substrátu v porovnání se selenem byl příjem Zn do plodnic nižší. Nízké obsahy Zn v plodnicích po fortifikaci zinkem byly zjištěny především v plodnicích rodu *Ganoderma*.

Aby se dosáhlo při vývoji kapslí s obohacenou hlívou jako doplňku stravy 37% RHP (referenční hodnota příjmu) bylo použito hlívy pěstované na substrátu doplněném 18mg Se na 1 kg substrátu

Summary

The methodology focuses on the application of findings from domestic and foreign studies on the enrichment of substrates with sodium selenite and zinc sulfate for the cultivation of certain species of *Pleurotus* and *Ganoderma* and various strains of the *Hericium*. Substrates (enriched sawdust or wheat straw) for the mentioned species and strains of medicinal mushroom species were enriched with 2, 6 and 18 mg Se (Na_2SeO_3) and 10, 20 and 40 mg Zn (ZnSO_4) per 1 kg of substrate. As the dose of Se in substrates increased, the content of selenium in the fruiting bodies of *Pleurotus* and *Ganoderma* also increased proportionally. Selenium did not accumulate uniformly in the fruiting bodies, the selenium content in the caps was higher than in the stipes. In the case of zinc, despite higher application dose as compared to Se, zinc uptake by fruiting bodies was lower. Low Zn contents in fortified fruiting bodies were found especially in *Ganoderma*.

In order to achieve 37% RHP (reference intake value) during the development of capsules with enriched mushrooms as a dietary supplement, mushrooms grown on a substrate supplemented with 18 mg Se per 1 kg of substrate were used

Dedikace

Tato metodika je výsledkem řešení výzkumného projektu Národní agentury zemědělského výzkumu č. QK1910209 *Výzkum a vývoj produkce léčivých hub v ČR a jejich inovativní aplikace ve funkčních potravinách*. Projekt je řešen v letech 2019 – 2023.

Oponentní posudky vypracovali:

Ing. Michaela Budňáková
RNDr. Vladimír Erban CSc.

Vydala:

Česká zemědělská univerzita v Praze 2022

ISBN:

Obsah

1	Úvod.....	5
2	Cíl metodiky.....	5
3	Selen, jeho význam, formy a zdroje.....	5
3.1	Význam selenu	5
3.2	Formy selenu	6
3.3	Zdroje selenu	6
3.4	Toxicita selenu.....	7
3.5	Výživová doporučení pro příjem selenu.....	8
4	Zinek	8
4.1	Zinek – význam, zdroje a funkce.....	8
4.2	Toxicita zinku	9
4.3	Nedostatek zinku	9
4.4	Výživová doporučení pro příjem zinku	9
5	Pokusy s fortifikací houbových substrátů selenem a zinkem	9
6	Vlastní obsah metodiky.....	11
6.1	Materiál a metoda	11
6.1.1	Substráty a jejich složení	11
6.2	Pěstební postupy	12
6.2.1	Hlíva ústříčná.....	12
6.2.2	Lesklokorky a šiitake (<i>Ganoderma</i> sp. a <i>Lentinula edodes</i>)	17
6.2.3	Korálovec ježatý (<i>Hericium erinaceus</i>).....	21
7	Příprava a analýza vzorků hub pro stanovení obsahu selenu a zinku	25
7.1	Příprava vzorků plodnic.....	25
7.2	Postup stanovení Se a Zn.....	25
8	Příprava doplňků stravy z plodnic <i>Pleurotus ostreatus</i>	26
9	Popis uplatnění certifikované metodiky.....	27
10	Srovnání novosti postupů	27
11	Ekonomické aspekty	27
12	Závěry.....	29
13	Literatura	30
14	Seznam publikací, které předcházely metodice	33

1 Úvod

Selen (Se) a zinek (Zn) patří mezi stopové prvky mající nezastupitelnou roli v metabolismu lidského organismu. Je proto žádoucí zajištění jejich pravidelného adekvátního příjmu. Ze získaných výsledků epidemiologických studií je zřejmé, že populace ČR má nedostatek Se a Zn a na základě nízkého příjmu hrozí části populace i níže uvedené zdravotní důsledky. Toto nebezpečí se prohlubuje zejména v případě Se jednak u skupin lidí se sníženým příjmem potravy (senioři), jednak při potřebě zvýšeného množství tohoto esenciálního stopového prvku, ať již u těhotných a kojících žen, u dětí, či sportovců a těžce pracujících. Tyto skupiny se zvýšenou potřebou by měly používat doplňky stravy do doby, než se zvednou hladiny selenu v našem potravním řetězci (Kvíčala 2003). Jedním ze způsobů, jak přirozeně tyto mikroprvky tělu dodávat je příjem ze stravy. Pěstované houby mají vysoké kulinářské, dietetické a léčivé vlastnosti. Jejich podhoubí se vyznačuje schopnostmi účinné absorpce některých mikroprvků z růstového substrátu a nabízí se proto jako vhodný subjekt pro aplikaci některých stopových prvků.

2 Cíl metodiky

Cílem této metodiky je seznámit potenciální pěstitele hub i širokou veřejnost s nejnovějšími poznatky a trendy a s možnostmi konzumace buď čerstvých hub obohacených selenem a zinkem, případně je upozornit na možnosti přípravy doplňků stravy z plodnic hub obohacených mikroprvky. Byl sledován příjem selenu a zinku myceliem některých léčivých hub ze substrátů o různém složení. Substráty studovaných hub byly obohacovány porovnatelnými dávkami Se (ve formě Na_2SeO_3) a Zn (ve formě ZnSO_4). Významným cílem bylo zvolit takový přírůstek Se do substrátu, který by umožnil v substrátu, která by umožnila vypěstovat plodnice hlívy s žádoucím obsahem Se. Upravené plodnice ve formě doplňků byly testovány v klinických zkouškách.

Metodika vychází se ze současných zahraničních i vlastních výsledků výzkumu a z vývoje nových produktů z léčivých hub.

V maloparcelkových pokusech byly substráty pro houby: hlívu ústřičnou (*Pleurotus ostreatus*), lesklokorku (*Ganoderma* sp) a korálovec ježatý (*Hericium erinaceus*) obohacovány různými dávkami seleničitanu sodného a síranu zinečnatého. Následně byl sledován obsah Se a Zn v různých částech plodnic u vybraných kmenů zmíněných hub.

3 Selen, jeho význam, formy a zdroje

3.1 Význam selenu

Selen je pro lidský organismus nepostradatelný esenciální prvek (Antonyak et al. 2018). Přispívá ke správné funkci imunitního systému a snížení výskytu kardiovaskulárních onemocnění (Hu et al. 2021b). Kromě snížení oxidačního stresu se selen podílí na ochraně DNA před poškozením a stárnutím buněk (Izydorczyk et al. 2021). Studie prokázaly, že vyšší příjem selenu v potravě vykazuje příznivé účinky proti stárnutí (Shu et al. 2020). Dalším zdravotním benefitem selenu je prevence karcinogenity (Turło et al. 2010). Mimo jiné bylo prokázáno, že selen inhibuje progresi HIV k AIDS (Turło et al. 2010; Hu et al. 2021b).

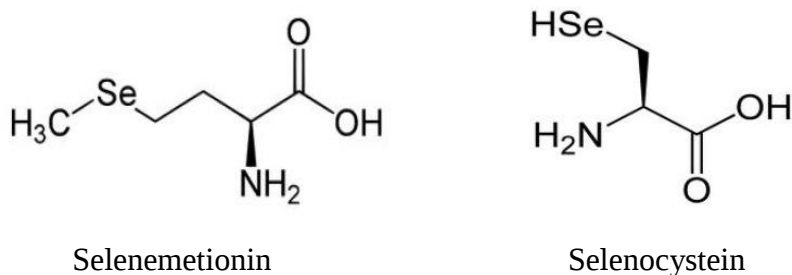
Organické formy selenu (zejména selenoaminokyseliny) jsou v porovnání s anorganickými formami považovány za bezpečnější a biologicky dostupnější z běžné stravy

(Solovyev et al. 2018). Houby jsou přirozeným zdrojem selenu, který není pouze mikronutrientem, ale také složkou antioxidačních enzymů a proteinů (Gašeka et al. 2015b).

3.2 Formy selenu

Významná biologická funkce selenu je spojována se selenoproteiny (Zhou et al. 2018), které ve své molekule obsahují aminokyselinu selenocystein, často označovanou jako 21. aminokyselinu genetického kódu (Antonyak et al. 2018). Role selenoproteinů nebyla doposud plně objasněna. Byla zaznamenána jejich antioxidační aktivita a ochrana buněk před poškozením oxidativním stresem (Gašeka et al. 2015b). Selenoproteiny také regulují hladinu hormonů štítné žlázy, jejich aktivaci a inaktivaci (Gač et al. 2021). U lidí bylo popsáno celkem 25 selenoproteinů (Antonyak et al. 2018; Zhou et al. 2018). Selen je součástí důležitých derivátů aminokyselin, včetně selenomethioninu, selenocysteinu, methylselenocysteinu a selenocystathionu. Selen ve formě selenocysteinu je přítomen v aktivním centru glutathionperoxidázy. Mimo jiné má pozitivní účinky na plodnost žen i mužů (Gač et al. 2021).

Rostliny přijímají Se především ve formě anorganických aniontů, selenanů (SeVI) a seleničitanů (SeIV), které jsou biotransformovány na organické formy, zejm. selenomethionin a deriváty selenocysteinu, z nichž některé vstupují do syntézy bílkovin.



Obr. 1 Selenomethionin a selenocystein jako hlavní organická forma selenu (Mehdi et al. 2013)

3.3 Zdroje selenu

Množství selenu v rostlinných a živočišných produktech závisí na místě, ve kterém rostliny rostly a zvířata žila. Je určováno množstvím selenu v půdě v dané oblasti, typem půdy, agroklimatickými podmínkami a typem plodiny v zeměpisné oblasti (Navarro-Alarcon & Cabrera-Vique 2008).

Selen je obsažen v potravinách rostlinného původu, kam patří obiloviny, a z nich především celozrnné výrobky (Shu et al. 2020). K dalším významným rostlinným zdrojům patří zeleniny z čeledi brukvovitých (brokolice, květák, kapusta) a z čeledi bobovitých (hrách, cizrna) (Gač et al. 2021) a také živočišné produkty, jako je maso, mořské a sladkovodní ryby (Shu et al. 2020). Bohatým zdrojem selenu je také mořská sůl, kvasnice, a houby. V produktech živočišného původu se vyskytuje také selenocystein.

Velmi vysoký obsah selenu lze nalézt v některých rostlinách (hyperakumulátory), např. *Astragalus bisulcatus* a u několika zástupců čeledi Brassicaceae. Takovéto rostliny se nazývají selenomilné rostliny (Finley 2005). Značný obsah selenu je i v houbách, který je obvykle vyšší

než u většiny zeleniny, ale je vysoce variabilní (Solovyev et al. 2018.). Obsah selenu v nejvíce konzumovaných jedlých houbách se pohybuje od <1 do 20 µg Se/ g sušiny.

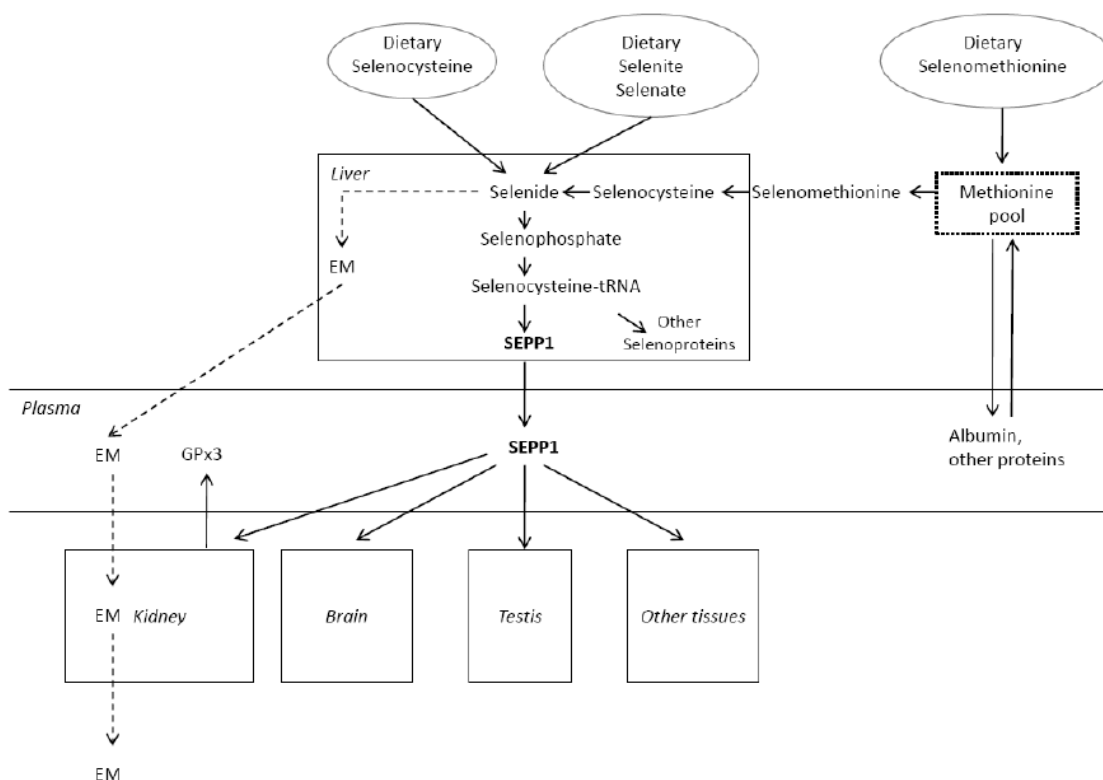
3.4 Toxicita selenu

Doporučený bezpečný maximální denní příjem selenu je 400 µg/den. Nepříznivý vliv přebytku selenu byl pozorován u hodnot okolo 1 500 µg/den a chronická selenóza při trvalém příjmu nad 2 000 µg/den (Kvíčala 2003).

Toxického množství v příjmu selenu nelze dosáhnout při obvyklé konzumaci potravin, ale může k němu dojít při nekontrolované suplementaci (Simonova & Pfannhauser 2008).

Studie ukazuje, že při denních dávkách do 2310 µg selenu u pozorovaných 12 lidí byly objeveny nevolnosti, změny nehtů, únava nebo podrážděnost, u poloviny z nich vypadávání vlasů, u tří ztráta nehtů. Někteří uvedli výskyt průjmů, bolesti v podbřišku, česnekový dech. Akutní toxický účinek lze u dospělých očekávat po dávce 3500 µg (to odpovídá 50 µg/kg tělesné hmotnosti) (Simonova & Pfannhauser 2008).

Organický a anorganický selen je obvykle dobře absorbován přes střevní membránu (70 – 95 %). Protože selen a síra mají velmi podobné vlastnosti, mohou být určité specíe selenu absorbovány stejnými cestami jako jejich sírné analogy. V důsledku toho může nastat konkurence při absorpci mezi sloučeninami síry a selenu, pokud jsou obě přítomny v potravinách v hojném množství (Finley 2006).



Obr. 2 Metabolismus selenu (EFSA 2014), EM, vylučovací metabolity; GPx3, glutathionperoxidáza 3; SEPP1, selenoprotein P.

3.5 Výživová doporučení pro příjem selenu

Legislativní limity doporučeného příjmu selenu jsou regulovány nařízením Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1169/2011 o poskytování informací o potravinách spotřebitelům, které stanoví, že bezpečná denní dávka selenu pro dospělé je až 200 µg/den, zatímco tolerovatelná dávka je až 400 µg/den (Gąsecka et al. 2015b). Nadměrný příjem selenu může vést k alopecii, dermatitidě a zvýšenému riziku vzniku diabetu II. typu (Hu et al. 2020).

Selenoprotein P je protein, který je u lidí kódován genem SEPP1. Je to transportní protein, který zajišťuje přísun selenu do tkání a hraje ústřední roli v metabolismu selenu. Koncentrace selenoproteinu P v plasmě reaguje na širokou škálu příjmu různých forem selenu. Selenoprotein P je nejinformativnějším biomarkerem funkce selenu na základě jeho role v transportu a metabolismu selenu. Vyrovnání plazmatické koncentrace selenoproteinu P je spojeno s plněním požadavku na selen, což lze použít jako kritérium pro stanovení dietních referenčních hodnot pro tento prvek (EFSA 2014).

4 Zinek

4.1 Zinek – význam, zdroje a funkce

Zn je stopový prvek se silnými imunoregulačními a antivirovými vlastnostmi (Jothimani et al. 2020). Jeho potenciál spočívá ve schopnosti tlumit hromadění volných radikálů a chránit tak lidský organismus před oxidativním stresem (Santos et al. 2020). Je nezbytný pro růst, reprodukční zdraví, imunitu a vývoj nervové soustavy a kognitivních funkcí. Za fyziologických podmínek je zinek nezbytný pro buněčný růst a zrání imunitních buněk, zejména při vývoji a aktivaci T-lymfocytů (Jothimani et al. 2020). Zinek se přímo a nepřímo podílí na syntéze a metabolismu živých organismů a rostlin. Zinek je základní složkou enzymů a působí jako funkční, strukturální a / nebo regulační kofaktor pro velké množství enzymů (Yashona et al. 2018). Skutečnost, že více než 300 enzymů je závislých na přítomnosti tohoto prvku jej činí nepostradatelným pro řadu buněčných funkcí a orgánových systémů (Rosenkranz et al. 2011). Zinek se podílí se na regulaci exprese řady genů a na procesech syntézy a štěpení bílkovin, sacharidů, tuků a nukleových kyselin. Dále se podílí na procesech růstu, dělení a diferenciaci buněk, je nezbytný pro normální růst vlasů, nehtů a kůže, stejně jako při hojení ran (Presnyakova et al. 2019).

Příjem zinku je založen na množství a biologické dostupnosti zinku ve stravě. Nejmenší vstřebatelnost zinku je z anorganických forem (např. oxid zinečnatý). Další formy zinku jsou chelátové (zinek navázaný na dvě aminokyseliny) a organické (zinek navázaný na organickou kyselinu). Nejlépe vstřebatelnou formou zinku je chelátová forma. Zinek má největší schopnost akumulace v rostlinách. Tento stopový prvek má vysokou afinitu k biologicky aktivním sloučeninám rostlinných tkání. Obsah zinku v rostlinách závisí na půdních vlastnostech, odrůdě a typu rostlin. Po celém světě jsou luštěniny a obiloviny hlavním zdrojem zinku (Maret & Sandstead 2006).

Velké množství zinku také bylo zjištěno v houbách, vyklíčených pšeničných zrnech a otrubách. Obsah Zn v některých semenech, kvasnicích, česneku a vejcích dosahuje až 8 až 20 mg/kg. Vyšší obsahy Zn se vyskytují v ovesné mouce, kuřecím a králičím masu, ořechách, zeleném čaji (Salnikova 2016).

4.2 Toxicita zinku

Zinek má nízkou toxicitu, ale při konzumaci velkých dávek (asi 1 g) lze pozorovat akutní příznaky, jako je nevolnost, zvracení, průjem, horečka a letargie. Když příjem zinku překročí fyziologické potřeby v rozumně malém množství, lze homeostázi udržovat zvýšeným endogenním vylučováním stolicí a močí. Pokud však nadměrný příjem zinku pokračuje po delší dobu, může dojít ke zhoršení absorpce dalších stopových prvků, zejména mědi a železa. Například příjem doplňků stravy poskytujících 50 mg zinku denně po dobu šesti týdnů způsobil změny v erytrocytové superoxid dismutáze měď-zinek, což je indikátor stavu mědi (Brown et al. 2001).

4.3 Nedostatek zinku

Nedostatek zinku v těle nastává, když je příjem tohoto prvku 1 mg / den nebo méně (Skalny & Rudakov 2004). Jedním z prvních projevů nedostatku zinku je potlačení buněčně zprostředkované imunity. Pacienti mohou vykazovat špatné hojení ran, vlasy mohou být snadno vytrhávány a je patrná alopecie; (ztráta vlasů) černé vlasy mohou být změněny na červenohnědé. Účinky na nervový systém mohou zahrnovat ataxii, dezorientaci a zhoršený neuropsychologický výkon. Po dlouhodobém trvalém nedostatku zinku mohou být rozpoznány další projevy. Patří mezi ně cirhóza jater, sexuální dysfunkce, anémie a malformace plodu (Maret & Sandstead 2006). Dlouhotrvající nedostatek zinku způsobuje dysfunkci imunitního systému, sterilitu u mužů, neurosenzorické poruchy a snížení tělesné hmotnosti (Jothimani et al. 2020). Mírný nedostatek zinku se projevuje sníženou rychlostí růstu a narušením obranyschopnosti organismu (Prasad 2020).

4.4 Výživová doporučení pro příjem zinku

Zinek má v lidském těle několik metabolických rolí. Stejně jako u železa, střevní absorpce zinku z rostlinných produktů není tak vysoká jako ze živočišných produktů. Vegetariáni proto mohou potřebovat až o 50 % více zinku ve stravě než nevegetariáni (Russell et al. 2001).

Legislativní limity doporučeného příjmu zinku jsou regulovány nařízením Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1169/2011 o poskytování informací o potravinách spotřebitelům, které stanoví, že denní referenční hodnota příjmu (Reference Daily Intake) zinku u dospělých osob je 7 až 16 mg (Haase et al. 2020).

5 Pokusy s fortifikací houbových substrátů selenem a zinkem

Mnoho studií ukázalo, že aplikace exogenního selenu může ovlivnit obsah a biologickou dostupnost selenu v jedlých houbách (Velez et al. 2019; Zhou et al. 2018). Solov'ev et al. (2018) potvrzuje, že řada druhů hub akumuluje selen, který je exogenně začleněn do růstového média během kultivace, a navíc jsou houby schopné přeměňovat anorganickou formu selenu na organickou (Chen et al. 202; Hu et al. 2019; Niedzielski et al. 2015; Rzymiski et al. 2016; Turło et al. 2010). Bhatia et al. (2013) dodává, že kultivace saprotrfních hub na substrátech bohatých na selen může být účinným prostředkem k produkci selenem obohacených potravin.

V Brazílii testovali schopnost hlívy ústříčné (*Pleurotus ostreatus*) absorbovat selen při pěstování na kávových slupkách obohacených různými dávkami seleničitanu sodného. Bylo prokázáno, že nejvyšší úroveň absorpce Se byla získána přidáním 51 mg/kg seleničitanu

sodného. Tyto výsledky ukazují velký potenciál kávových slupek při produkci hub obohacených Se a ukazují schopnost těchto hub absorbovat a zvyšovat obsah Se (Silva et al. 2012).

Byl studován vliv různých koncentrací zinku na jeho bioakumulaci a výtěžnost biomasy v myceliu i v plodnicích *Pleurotus ostreatus* cv. *florida* kultivovaných na tekutém médiu. Výsledky ukázaly, že schopnost bioakumulace Zn v myceliu *P. florida* byla mnohem vyšší než v plodnicích (Poursaeid et al. 2015).

Pleurotus ostreatus cv. *florida*, jedlý druh hlívy ústříčné, byl pěstován na pšeničné slámě ze seleniferního pásu Pandžábu (Indie) a byl studován její potenciál mobilizovat a akumulovat selen z pěstebního substrátu. Obsah selenu v biologicky obohacených houbách byl 800krát vyšší ve srovnání s kontrolními vzorky pěstovanými na pšeničné slámě z oblastí, které nejsou bohaté na selen. Tato studie prokazuje možnosti výroby jedlých hub obohacených selenem za použití biologických vedlejších produktů bohatých na selen jako pěstebních substrátů. Navrhovaný přístup lze použít k vyhodnocení toho, zda lze rostlinné odpadní materiály sklizené z oblastí s vysokým obsahem selenu použít k výrobě jedlých hub obohacených selenem na základě na základě celkového obsahu Se v houbách, zastoupení jednotlivých chemických forem Se a jejich biologické dostupnosti. (Bhatia et al. 2013).

Polští vědci Zięba et al. (2020) provedli studii o obohacování mycelia a plodnic selenem a zinkem *Pleurotus eryngii* za účelem sledování jejich biologické aktivity. V této studii byla zkoumána schopnost mycelia z kultur *in vitro* a plodnic *P. eryngii* účinně akumulovat zinek a selen. Byl také stanoven vliv obohacení Se a Zn na produktivitu, chemické složení a obsah biologických prvků v *P. eryngii*. Pro zvýšení obsahu Se a Zn v plodnicích a myceliu *P. eryngii* byly substráty doplněny seleničitanem sodným v koncentraci 50 mg/l, síranem zinečnatým a hydroaspartátem zinečnatým v koncentraci 87,2 a 100,0 mg/l. Byla prokázána schopnost *P. eryngii* akumulovat zinek a selen z kultivačního média. Stupeň akumulace zinku závisel na typu použité soli. Tato studie také ukázala, že kultivace mycelia *P. eryngii* v *in vitro* kultuře s vyšším obsahem iontů zinku může vést k získání materiálů s vyšší antioxidační schopností. Výsledky této studie lze použít k vývoji složení růstového média, které zajišťuje produkci biomasy s požadovaným složením prvků (Zięba et al. 2020).

Výsledky ukazují, že mezi zkoumanými zdroji Se se nejpriznivějším ukázal seleničitan sodný, zatímco selenan sodný byl nejméně příznivým zdrojem pro absorpci Se myceliem u většiny studovaných kmenů (Stajic et al. 2005). Potvrdilo se to i při kultivaci několika kmenů hlívy máčkové (*Pleurotus eryngii*), kdy byl selen použit ve formách seleničitanu sodného (Na_2SeO_3), selenanu sodného (Na_2SeO_4) a oxidu seleničitého (SeO_2) v následujících koncentracích: 0,3 mg/l, 0,7 mg/l, 1 mg/l a 1,3 mg/l. (Gąsecka et al 2015a)

Beelman & Royse (2005) obohacovali 2 varianty pilinových substrátů houby trsnatce lupenitého (*Grifola frondosa*) přidáním různých koncentrací seleničitanu sodného. Obsah selenu se zvýšil v plodnicích úměrně k množství seleničitanu přidaného k substrátu.

Houba má schopnost absorbovat, akumulovat a transformovat anorganické Se na organické sloučeniny. Koncentrace a chemické formy Se používané k obohacení však mohou ovlivnit růst mycelia a produkci hub. Cílem studie Silva et al. (2019) bylo analyzovat možnosti mycelia *Pleurotus ostreatus* absorbovat, akumulovat a tolerovat rostoucí koncentrace různých chemických forem Se. Disk agaru s myceliem byl obohacen Se ve formě seleničitanu sodného,

selenanu sodného nebo selenomethioninu (SeMet). Největší inhibice růstu mycelia a produkce biomasy byla pozorována při nejvyšší koncentraci Se. Nejvyšší akumulace Se v myceliu byla pozorována v kultivačním médiu se seleničitanem sodným. Suplementace Se ve formě seleničitanu sodného byla tedy doporučena k obohacení hub *P. ostreatus* než selenan sodný a SeMet. Také Hu et al. (2021a) hodnotili účinky seleničitanu, selenanu a nanočástic selenu na růst a vývoj *Hypsizygus marmoreus* (líhovec moučný) a analyzovali jejich příjem a biotransformace v této jedlé houbě. Výsledky ukázaly, že výnos plodnic nebyl koncentracemi (0,5 – 40,0 µg/l) anorganických forem selenu ovlivněn. Mycelium citlivěji reagovalo na seleničitan než na selenan a nanočástice selenu (Hu et al. 2021a).

6 Vlastní obsah metodiky

6.1 Materiál a metoda

Pěstování hub na substrátech obohacených selenem a zinkem probíhalo v letech 2019-2022 a to tak, že pokusy byly každý rok soustředěny na pěstování jedné ze sledovaných hub.

6.1.1 Substráty a jejich složení

Pro pěstování následujících druhů hub

1. hlíva ústříčná (*Pleurotus ostreatus*)
2. lesklokorka (*Ganoderma spp*)
3. houževnatec jedlý (*Lentinula edodes*)
4. korálovec ježatý (*Hericium erinaceus*)

bylo použito stejného postupu přípravy substrátu a rozdíly byly pouze v jeho složení.

K přípravě substrátu pro hlívu bylo použito slaměných pelet, které byly namočené vodou v poměru 1 díl pelet s 2 díly vody bez dalších přísad. Substráty pro ostatní druhy hub tvořily piliny z listnatého dřeva s přísadou 20 % pšeničných otrub obohacené stejným poměrem vody jako u substrátu hlívy (1 díl suché hmoty:2 díly vody). V některých pokusech byly ověřovány substráty o jiném složení jako *Miscanthus* nebo *Miscanthus* s pilinami listnatého dřeva.

Připravený substrát byl plněn do standardních polypropylenových sáčků s dýchacím filtrem firmy SacO2 po 2000 g případně 2500 g a následně propařen při 90°C po dobu 24 hodin. Teplotní ošetření probíhalo v propařovací komoře, kterou tvořila tepelně izolovaná skříň o obsahu 3 m³ vybavená policemi. Samostatný vyvíječ zajistil regulovanou dodávku páry. Substrát byl po zchlazení zaočkován 5 – 7 % zrnité sadby příslušné houby, která byla připravena na vysterilizovaných pšeničných zrnech.



Graf 1 Příklad standardního průběhu teplot během teplotního ošetření substrátu pro pěstované houby

Selen ve formě seleničitanu sodného byl do substrátu přidáván ve formě roztoku tak, aby vedle neobohacené kontroly bylo dosaženo zvýšení obsahu Se o 2, 6, 18 mg na 1 kg substrátu.

V případě obohacování zinkem činily přídavky zinku (ve formě síranu zinečnatého) 10, 20, 40 mg na 1 kg substrátu.

6.2 Pěstební postupy

Podhoubí všech sledovaných hub prorůstalo substráty podle druhu 21-30 dnů v teplotě 24°C.

6.2.1 Hlíva ústříčná

Pro porovnání vlivu selenu na jeho obsah v plodnicích byly vybrány různé kmeny hlívy.

Tab. 1 Studované kmeny hlív

Druh	Kmen označení KZ	Původní označení
<i>Pleurotus ostreatus</i>		2019
<i>Pleurotus ostreatus</i>		5930
<i>Pleurotus ostreatus</i>	KZ 54	Sylvan Spopo
<i>Pleurotus ostreatus</i>	KZ 57	Amycel F 2013
<i>Pleurotus ostreatus</i>	KZ 52	Sylvan HK35
<i>Pleurotus citrinopileatus</i>	KZ 58	5114

Substráty pro hlívu ústříčnou

Pro porovnání vlivu selenu v substrátech o různém složení na jeho následný obsah v plodnicích byly zvoleny následující varianty substrátů obohacené seleničitanem sodným:

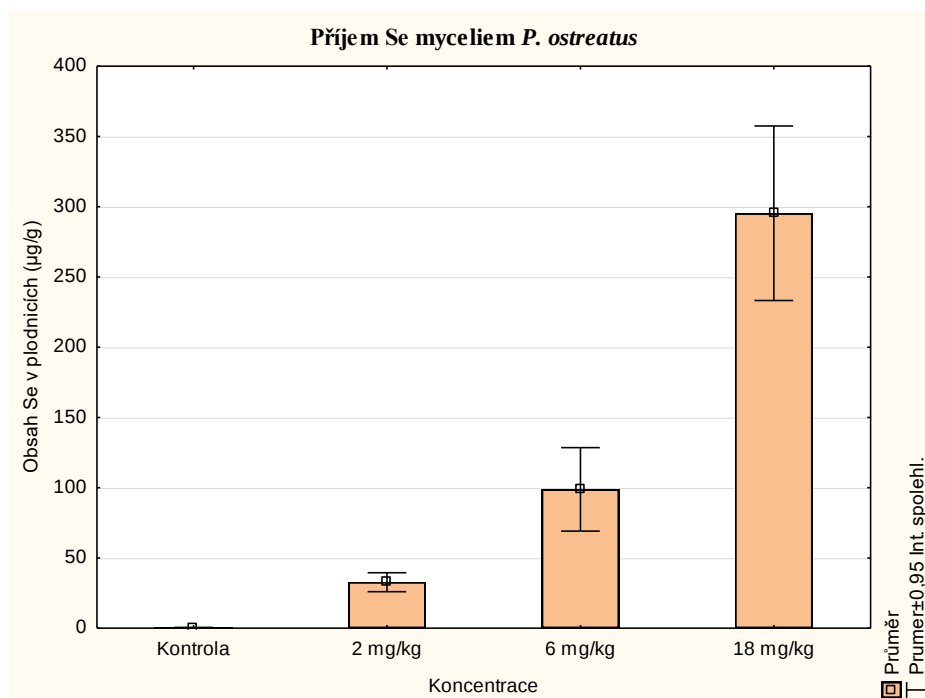
1. Sláma *Miscanthus* s přidavkem 20 % pšeničných otrub a 6 mg Se na 1 kg substrátu
2. Směs slámy *Miscanthus* a listnatých pilin v poměru 1:1 s 20% pšeničných otrub s přidavkem 6 mg seleničitanu sodného na 1 kg substrátu

Byl hodnocen obsah selenu v plodnicích hlívy a substrátech se zvyšujícími dávkami selenu a rozdíl v hromadění selenu v kloboucích a třeních.

6.2.1.1 Obsah selenu v plodnicích hlívy při různých obsazích selenu v substrátu

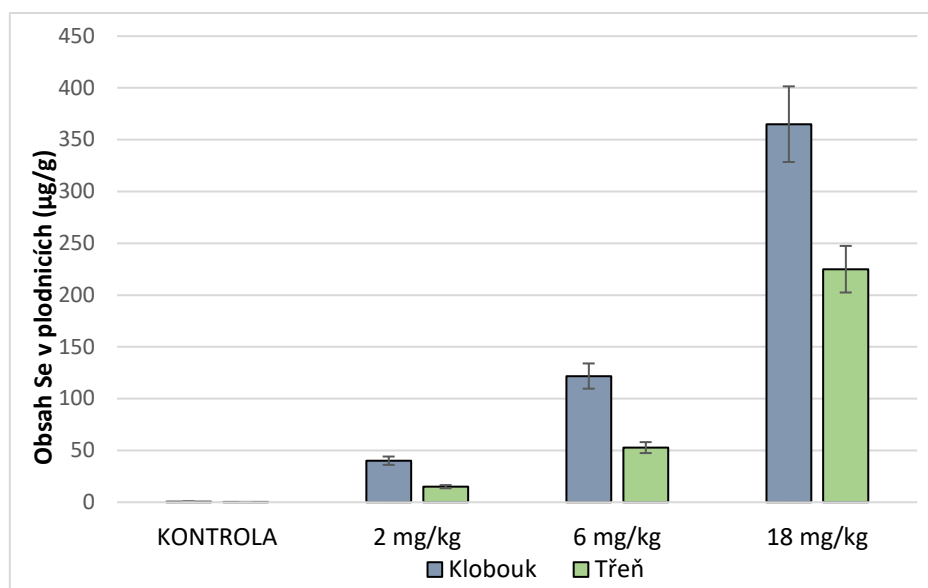
V tomto pokusu byl hodnocen přídavek seleničitanu sodného v postupně se zvyšujících dávkách v porovnání s neobohaceným substrátem kontrolní skupiny vzorků.

Výsledky ukazují, že příjem Se hlívou ústříčnou z fortifikovaného substrátu je statisticky průkazný ($p < 0,05$). Graf 2 znázorňuje, že se zvyšujícím obsahem Se v substrátu roste i obsah Se v plodnicích hlívy. Nejvyšší příjem selenu byl dosažen při nejvyšším přidavku (18 mg/kg) seleničitanu sodného v substrátu.



Graf 2 Obsah selenu v plodnicích hlívy při různých aplikačních dávkách Se do substrátu

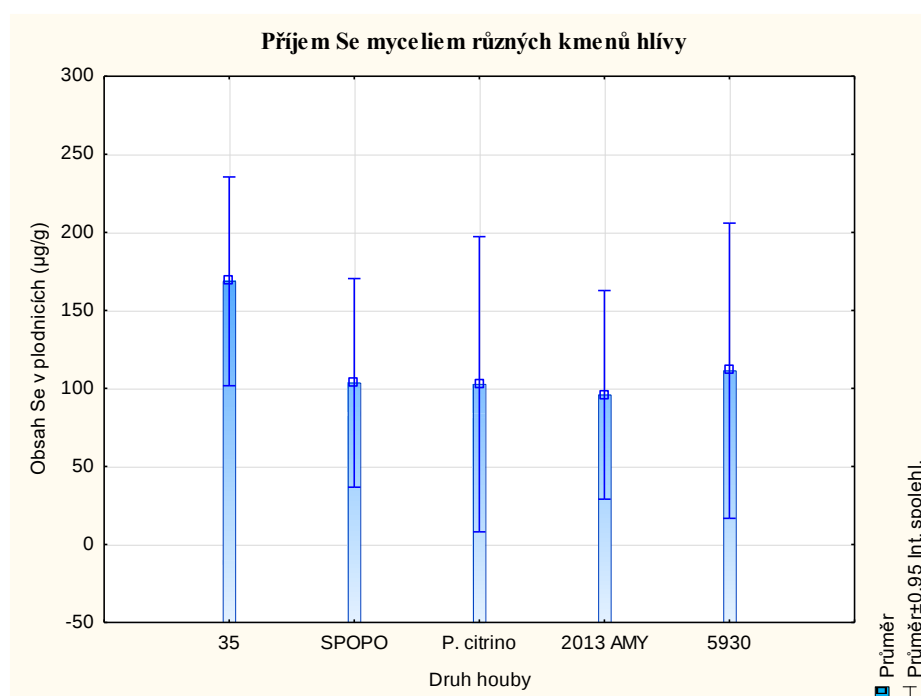
Současně byl porovnáván obsah selenu mezi klobouky a třeni hub. Bylo zjištěno, že rozdíl v obsahu selenu ve vzorků klobouků a třenů hub je statisticky významný ($p < 0,05$). Třeně hub měly mnohem nižší obsah selenu. Ale podle grafu 3 je patrné, že při zvýšeném obsahu Se v substrátu se snižuje rozdíl v obsahu selenu mezi klobouky a třeni.



Graf 3 Obsah selenu v třeních a kloboucích plodnicí hlívy při různých koncentracích seleničitanu sodného v substrátu

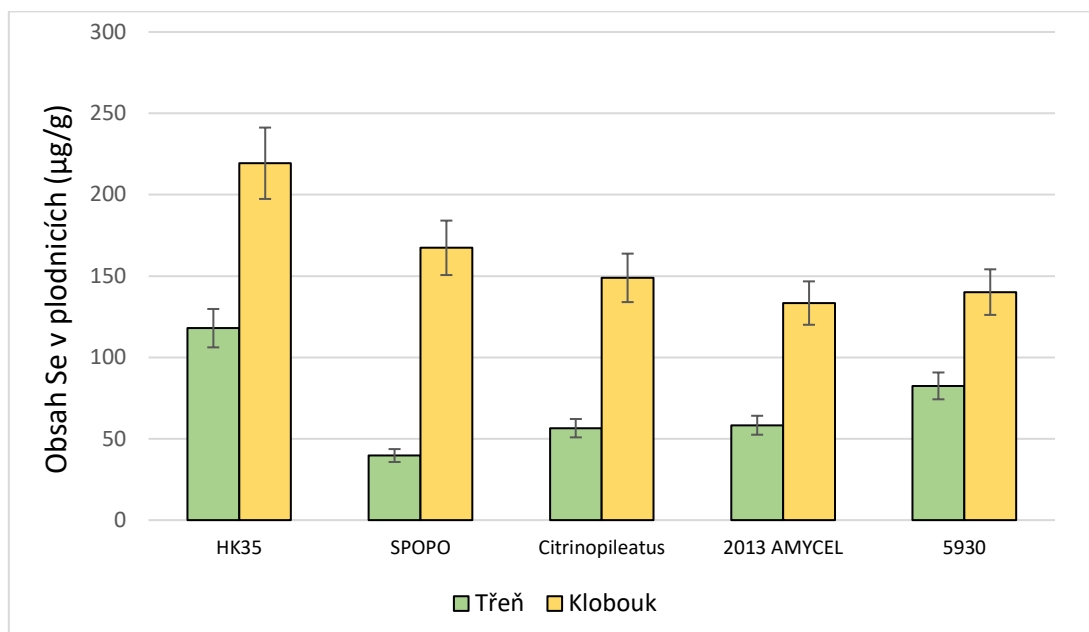
6.2.1.2 Obsahu selenu v plodnicích různých kmenů hlívy

Tento pokus porovnával vliv přidavku selenu na hladině 6 mg/kg do substrátů s různými kmeny hlívy. Výsledky ukazují, že nebyly zjištěny statisticky průkazné rozdíly ($p > 0,05$) mezi příjmem selenu různými kmeny hlívy. Nicméně, z grafu 4 lze vyvodit, že nejvyšší příjem selenu měl kmen HK35. K prokázání průkaznosti je zapotřebí více opakování.



Graf 4 Průměrné hodnoty obsahu selenu v plodnicích různých kmenů hlívy

Současně byl hodnocen obsah selenu v kloboucích a třeních hub. Graf 5 znázorňuje, že nejvyšší příjem selenu byl u kmenu hlívy HK35, a to jak v kloboucích, tak v třeních. Bude proto vhodné se při selenizaci substrátu se na kmen HK 35 zaměřit.

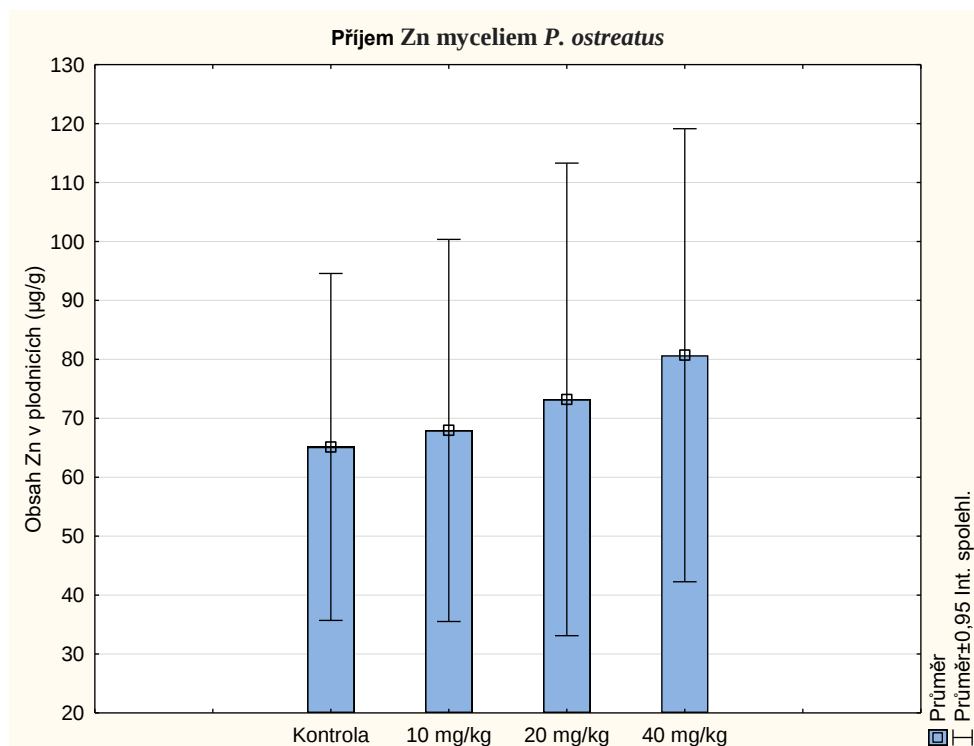


Graf 5 Obsah selenu v třeních a kloboucích různých kmenů hlívy

6.2.1.3 Stanovení obsahu zinku v plodnicích hlívy při různých přídavicích síranu zinečnatého v substrátu

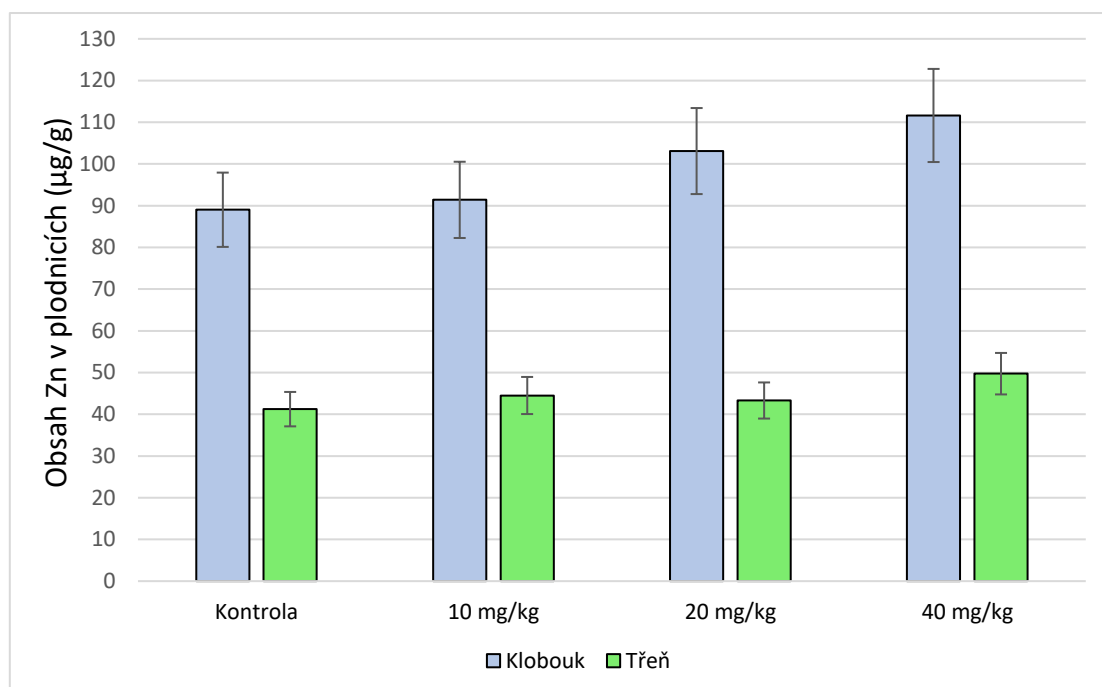
Byl hodnocen vliv zvyšujícího se přídavku Zn do substrátu v porovnání s neobohaceným substrátem kontrolní skupiny vzorků. Bylo zjištěno, že se zvyšujícím se obsahem Zn v substrátu se zvyšuje obsah zinku v plodnicích hlívy. Z grafu č. 6 je zřejmé, že rozdíly v obsahu zinku v plodnicích nejsou statisticky významné ($p > 0,05$), protože vzorky měly velmi široký interval spolehlivosti.

Rozdíl v obsahu zinku mezi kontrolními vzorky a vzorky sklizenými ze substrátů s nejvyšším přídavkem zinku je v průměru 15,6 µg/g. Z toho lze vyvodit, že hlíva má nízkou schopnost akumulovat zinek ve svých plodnicích.



Graf 6 Obsah zinku v plodnicích hlívy při různých přídavicích síranu zinečnatého v substrátu

Ukázalo se ale, že rozdíl v obsahu zinku v kloboucích a třeních hub je statisticky významný ($p < 0,05$). Průměry vzorků se liší, což znázorňuje graf 7. Výsledky ukazují, že na rozdíl od klobouků, při zvýšení obsahu zinku v substrátech, obsah zinku v třeních zůstává téměř ve stejných hodnotách.



Graf 7 Obsah zinku v třeních a kloboucích plodnicí hlívy při různých přídavicích síranu zinečnatého v substrátu

6.2.2 Lesklokorky a šiitake (*Ganoderma* sp. a *Lentinula edodes*)

Tab. 2 Studované druhy lesklokorek a šiitake

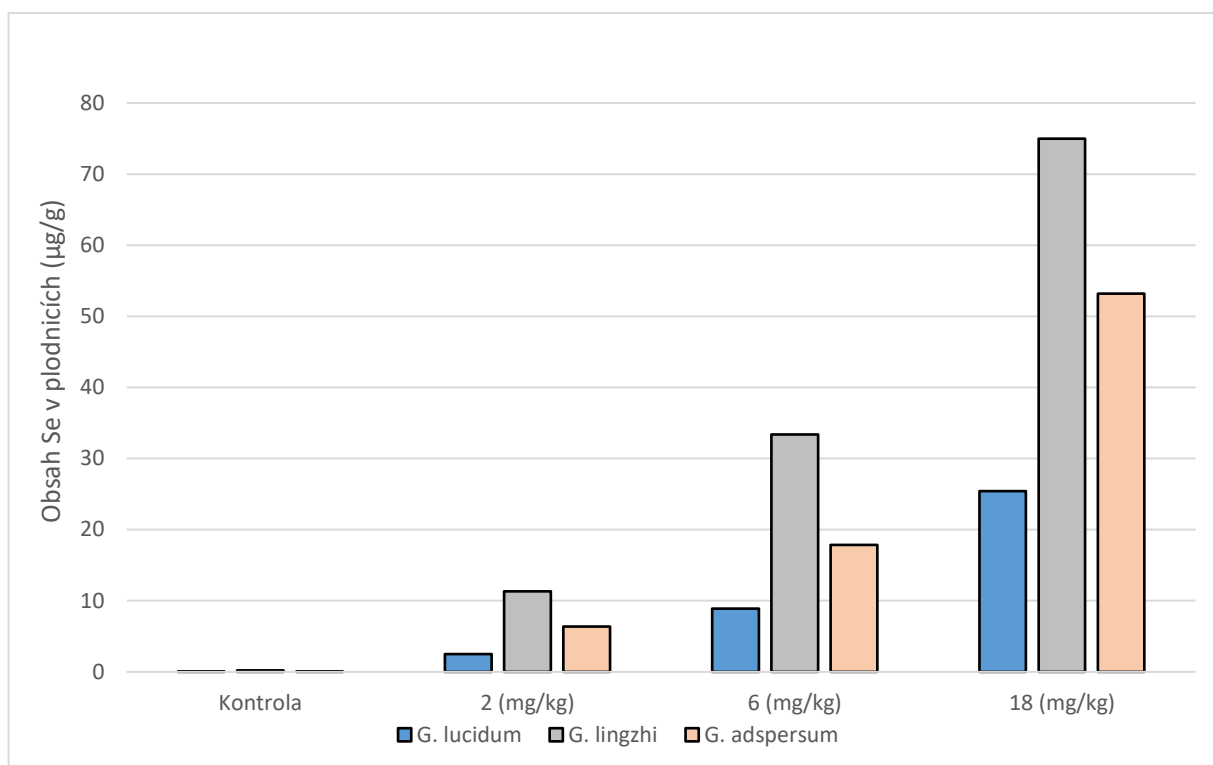
Druh	Kmen označení KZ	Původní označení
<i>Ganoderma adspersum</i> – lesklokorka tmavá	KZ 83	Mendelu Brno
<i>Ganoderma lingzhi</i>	KZ 79	Kmen původem z Asie, získaný od M. Rajtara, druh charakterizovaný vysokým obsahem léčivých látek
<i>Ganoderma lucidum</i> lesklokorka lesklá	KZ 73	Kmen pocházející z Thajska
<i>Lentinula edodes</i> šiitake	KZ 24	Kmen asijského původu

Použité substráty

- Piliny listnatých stromů – základní surovina pro přípravu substrátů bohatá na celulózu a hemicelulózu
- Pšeničné otruby (20 %) – podpora růstu hub, obsahují především části slupek
- *Miscanthus* – energetická plodina používaná pro vysoký obsah ligninu
- Kukuřičná vřetena – lignocelulózní materiál vhodný pro pěstování hub

6.2.2.1 Vliv obohacování substrátů kultur hub rodu *Ganoderma* selenem na jeho obsah v plodnicích

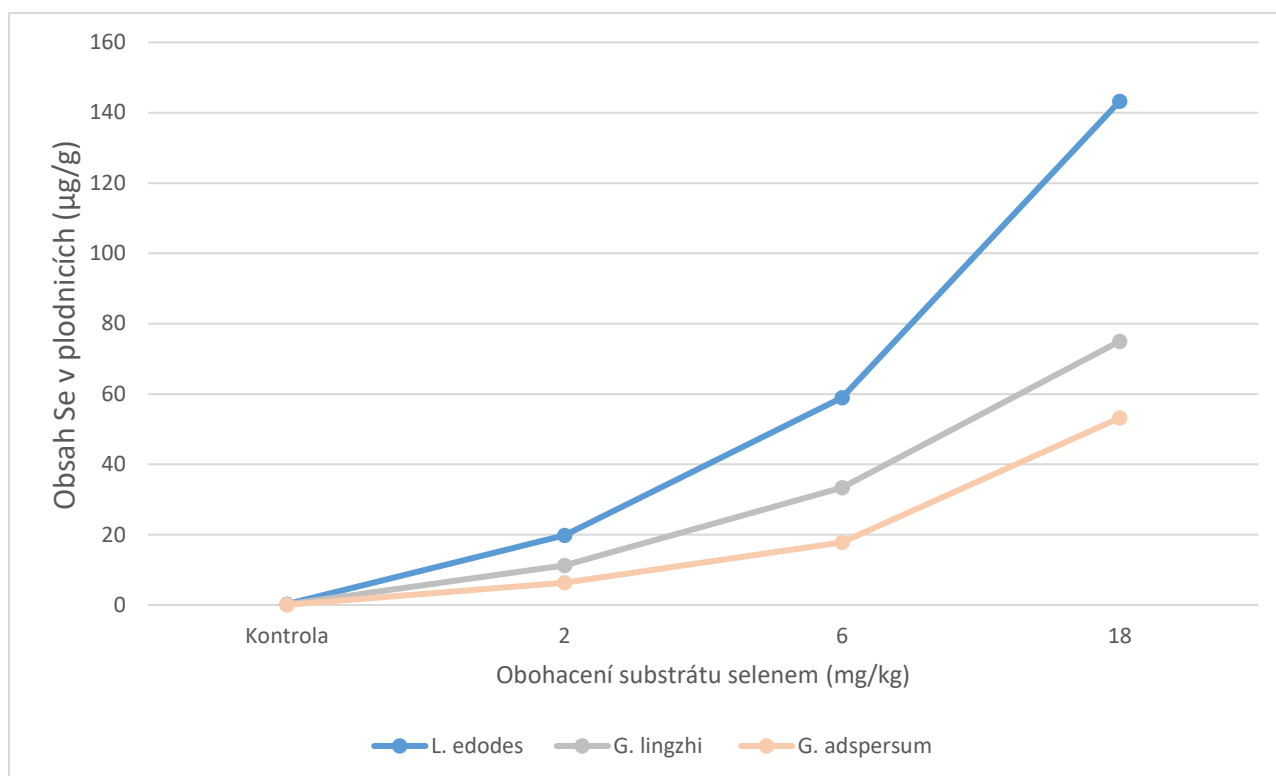
Graf 8 vyjadřuje příjem selenu plodnicemi *G. lucidum*, *G. lingzhi*, *G. adspersum*. Substrát složený z pilin listnatých stromů obohacený otrubami byl obohacen postupně zvyšujícími se dávkami seleničitanu sodného. Je patrné, že na zvyšující přídavek selenu do substrátu pozitivně reagují všechny druhy, ale v intenzitě příjmu selenu se výrazně jednotlivé druhy liší. Zejména se to projevilo v obsahu selenu v plodnicích *G. lingzhi*. Souvisí to se skutečností, že tento druh patří svými vlastnostmi mezi léčebně nejvýznamnější druhy lesklokorek.



Graf 8 Obsah selenu v plodnicích různých druhů lesklokorek (*Ganoderma*)

6.2.2.2 Porovnání příjmu selenu plodnicemi hub *G. adspersum*, *G. lingzhi* a *Lentinula edodes*

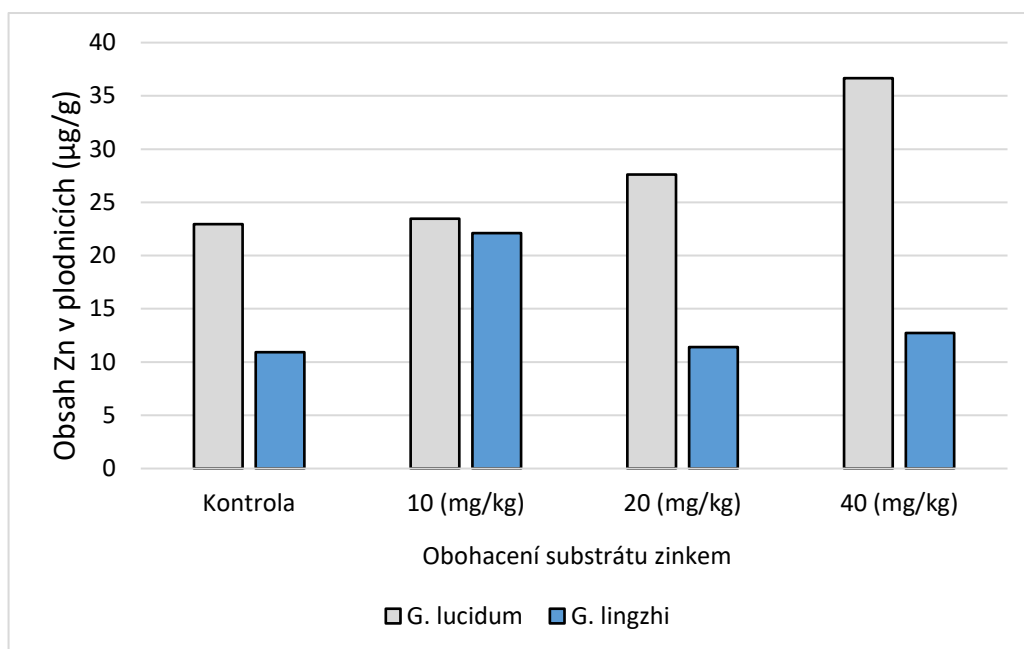
V grafu 9 jsou porovnávány dva kmeny lesklokorek (*G. adspersum*, *G. lingzhi*) s další léčivou houbou šiitake (*Lentinula edodes*). Nejvyšší příjem selenu ze substrátu vykazala houba šiitake, která ve všech zkoumaných variantách akumulovala nejvíce selenu v plodnicích.



Graf 9 Příjem selenu plodnicemi hub *G. adspersum*, *G. lingzhi* a *L. edodes*

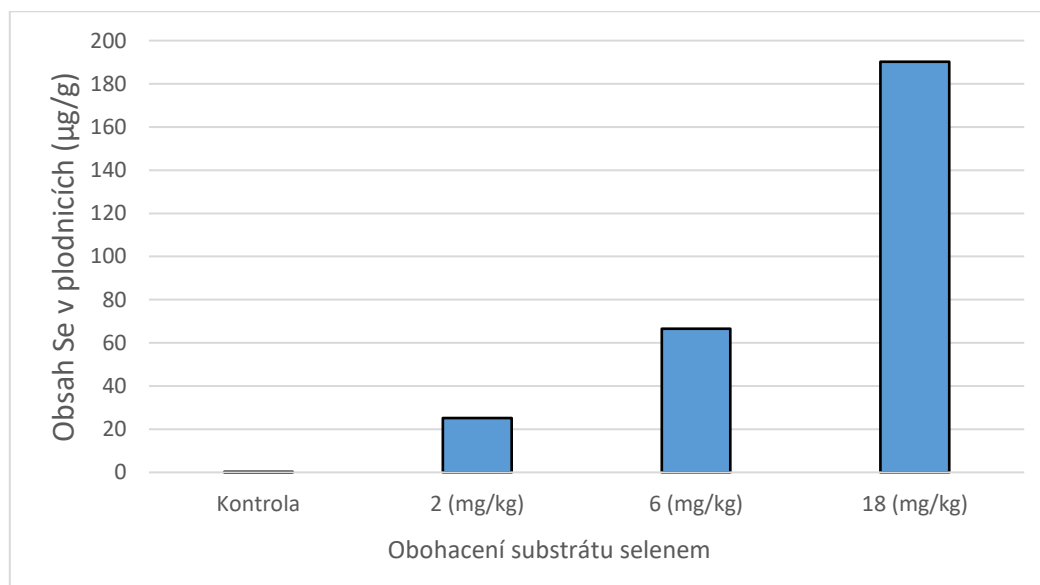
6.2.2.3 Vliv síranu zinečnatého (ZnSO_4) na obsah Zn v plodnicích lesklokorek

Graf 10 porovnává obsah zinku v plodnicích *G. lucidum* a *G. lingzhi*. Pro tento pokus byla jako hlavní složka substrátu použita kukuřičná vřetena. Oproti kontrolní neobohacované variantě substrátu se obsah zinku v plodnicích u *G. lucidum* mírně zvyšoval. Naproti tomu u *G. lingzhi* docházelo pouze ke kolísání obsahu tak, že efekt přidavku na zvýšení obsahu Zn nebylo u tohoto druhu možno prokázat.



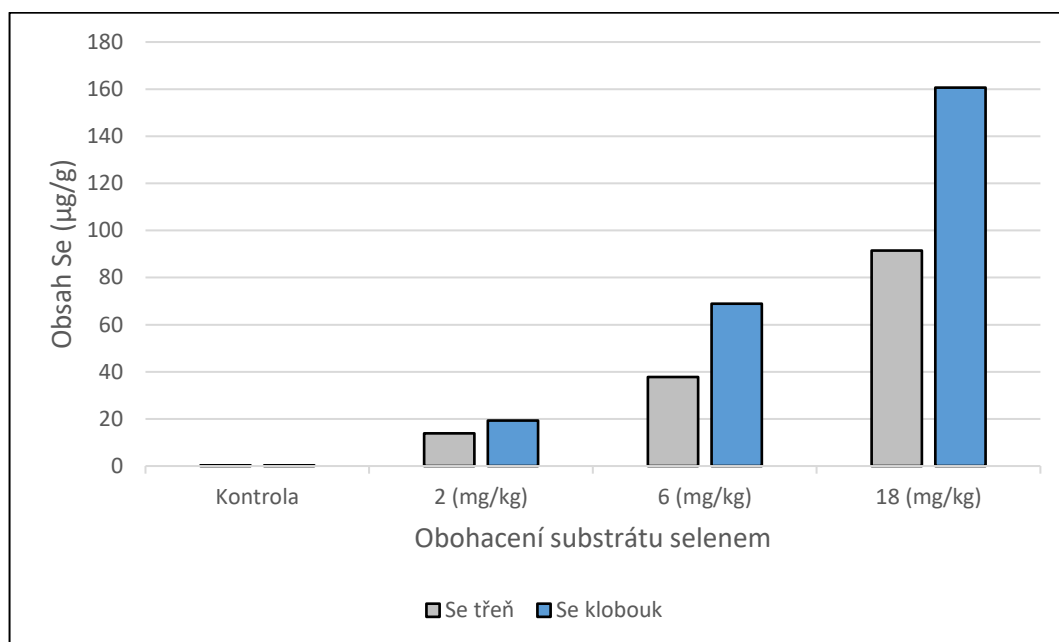
Graf 10 Obsah zinku v plodnicích hub rodu *Ganoderma* po obohacení substrátu

Graf 11 hodnotí příjem selenu plodnicemi šitake. V porovnání s lesklokorkami absorbovala šitake téměř dvojnásobné množství selenu u *G. lingzhi* a až trojnásobné množství u *G. adspersum* ve všech zkoumaných variantách.



Graf 11 Obsah selenu v celých plodnicích *L. edodes* pěstovaných v substrátech s různými přídávky Se

Z grafu 12 vyplývá, že třeně houby šiitake absorbovaly méně selenu než klobouky.



Graf 12 Obsah selenu ve třeních a kloboucích *L. edodes*

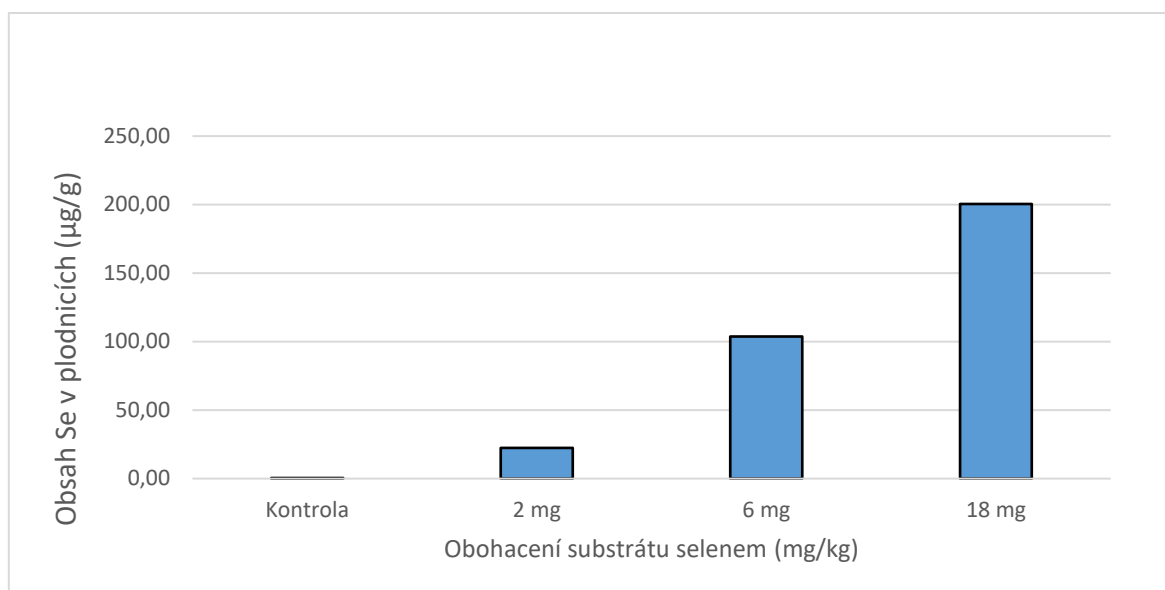
6.2.3 Korálovec ježatý (*Hericium erinaceus*)

Byl hodnocen obsah selenu a zinku v plodnicích následujících kmenů korálovce:

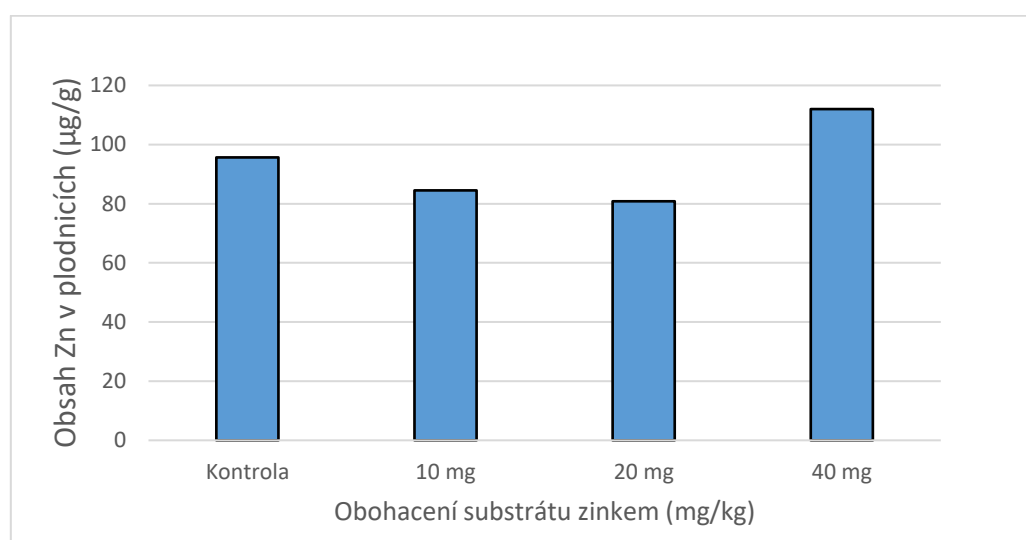
Tab. 3 Porovnávání kmeny korálovce ježatého (*Hericium erinaceus*)

Kmen označení KZ	Původní označení
KZ 91	Vlastní izolát - Brno
KZ 92	Vlastní izolát - Dobříš
KZ 111	Mycelia Belgie- M2514
KZ 120	Rajtar - Vietnam

Zatímco příjem selenu do plodnic korálovce vzrůstal přímo úměrně se zvyšujícím se obsahem Se v substrátu (Graf 13), což probíhalo podobně jako u ostatních druhů hub, tak v důsledku obohacení substrátů síranem zinečnatým se při nižších dávkách 10 a 20 mg Zn/kg substrátu se efekt přidavku Zn v plodnicích neprojevil. Pouze při dávce 40 mg se obsah Zn v plodnicích mírně zvýšil (Graf 14).



Graf 13 Obsah selenu v plodnicích korálovce při různých dávkách obohacení substrátu Na_2SeO_3

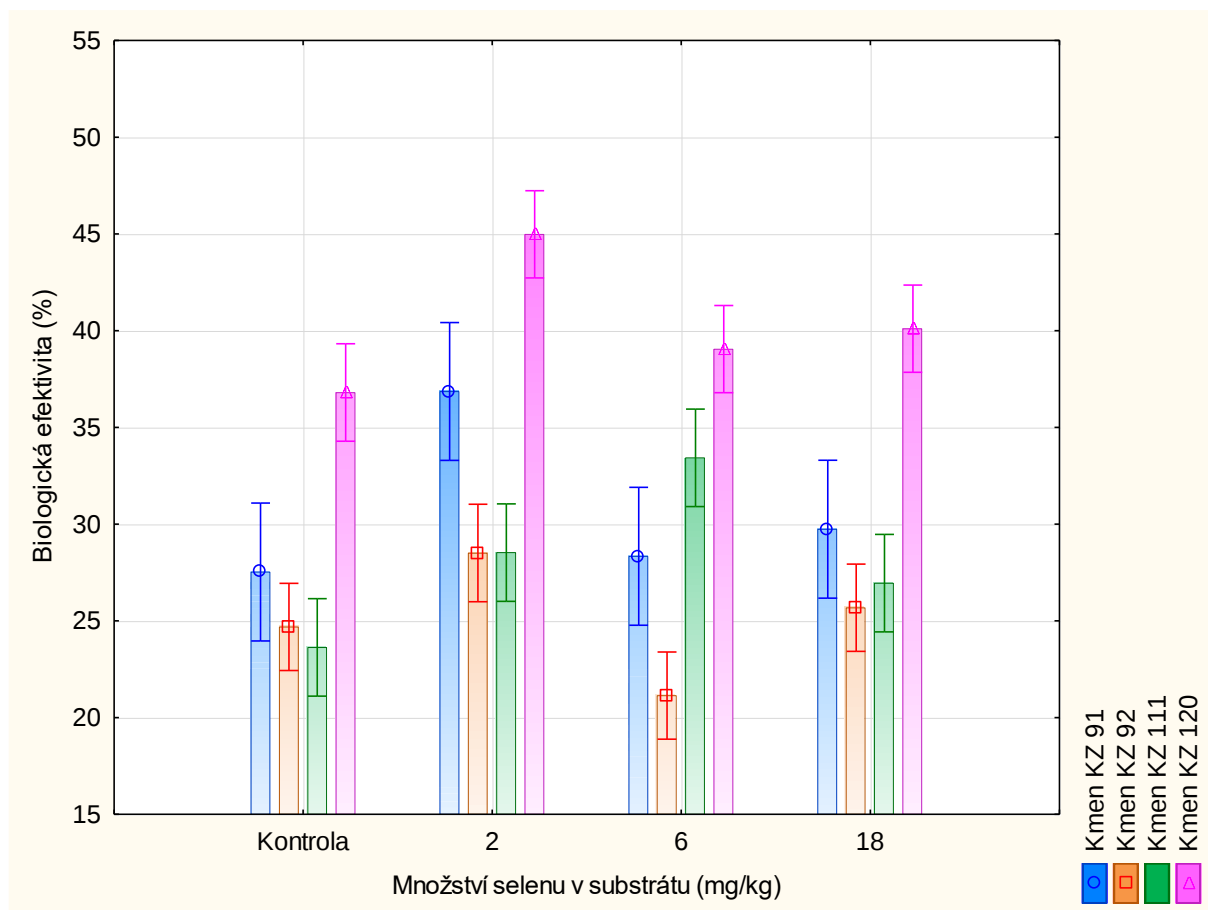


Graf 14 Obsah zinku v plodnicích korálovce při různých dávkách obohacení substrátu síranem zinečnatým ZnSO_4

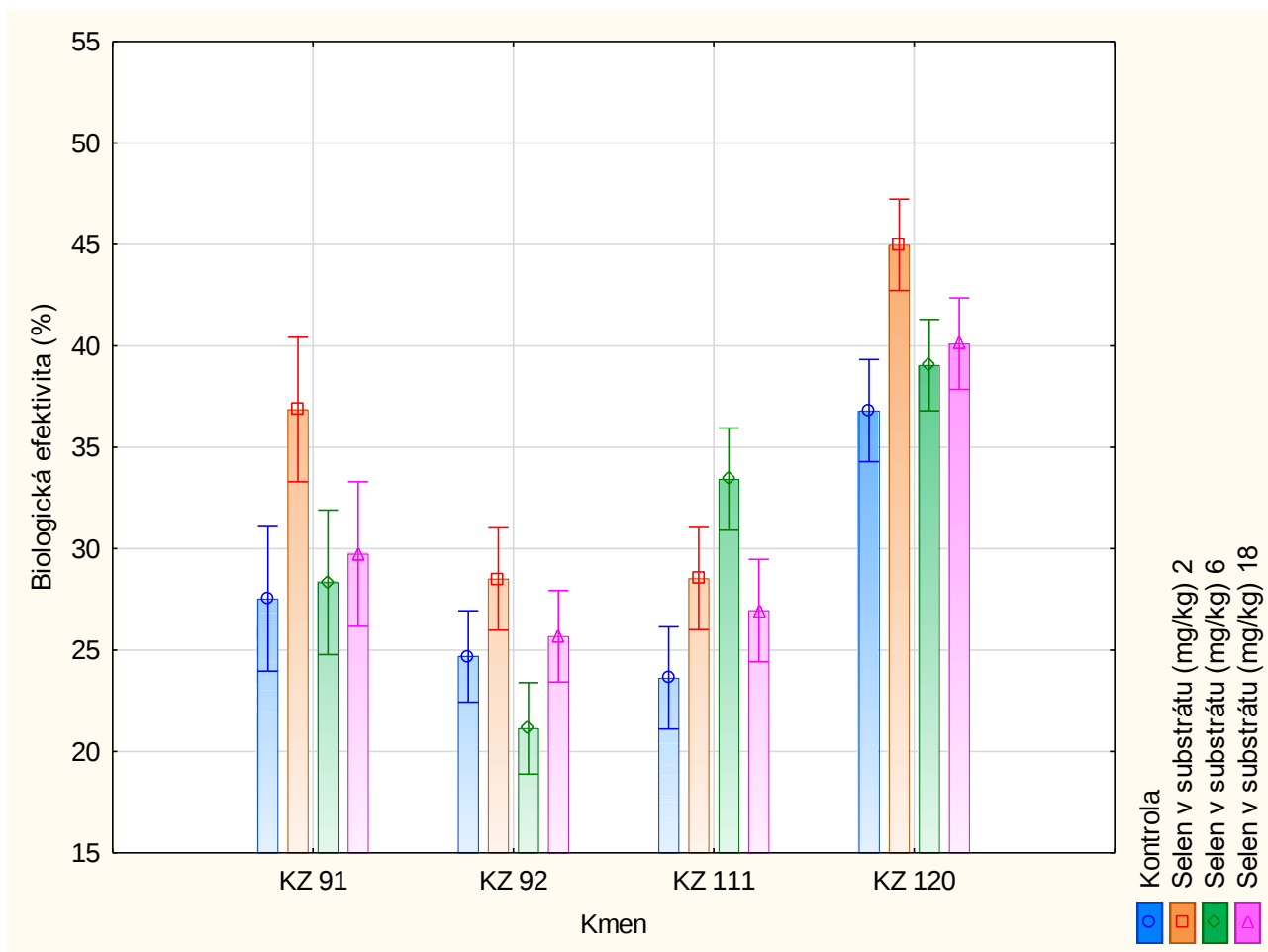
6.2.3.1 Vliv selenu na výnos plodnic různých kmenů korálovce

Vliv dávky Se do substrátu (0, 2, 6, 18 mg/kg) na výnos korálovce byl zkoumán u čtyřech kmenů, z nichž dva byly kultivary a dva izoláty z přírody (divoké). Ukázalo se, že výnos plodnic přepočítaný na biologickou efektivitu (výnos plodnic na sušinu substrátu) se vlivem obohacení seleničitanem sodným nesnižoval a u nejnižší dávky 2 mg Se byl dokonce u všech kmenů vyšší. Nejvyšší výnos na všech fortifikačních hladinách byl dosažen shodně u kmene KZ 120

(viz Grafy 15, 16).



Graf 15 Vliv zvýšených dávek selenu na výnos plodnic u 4 kmenů korálovce ježatého

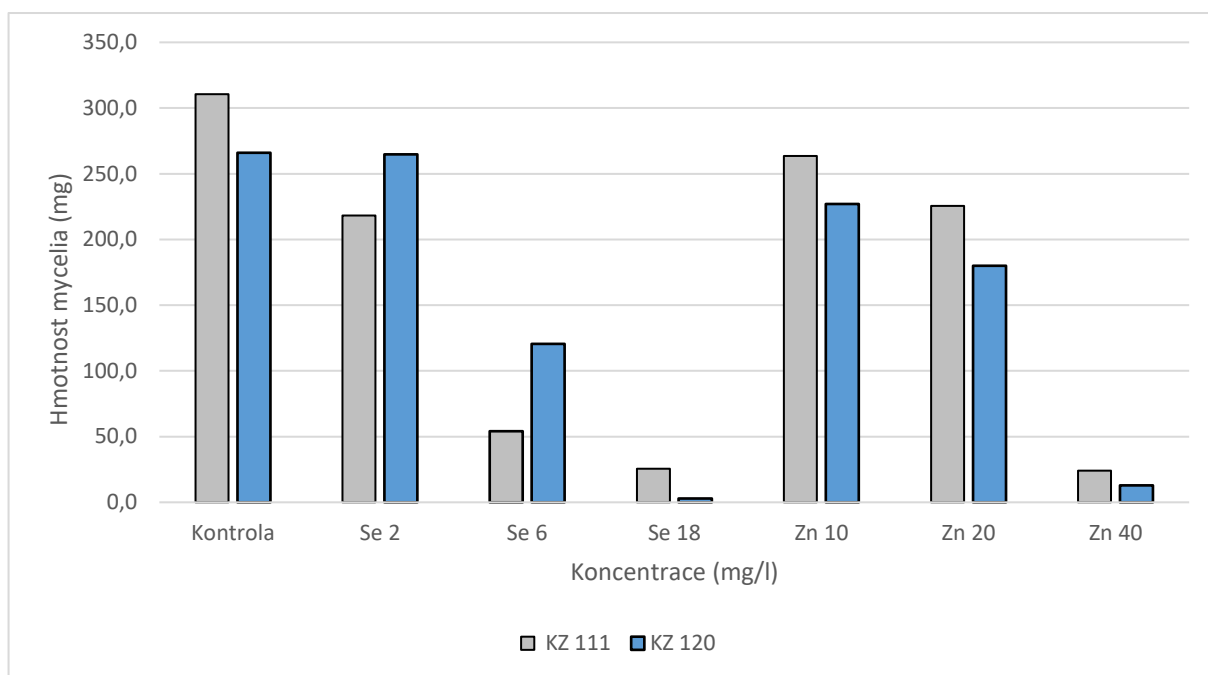


Graf 16 Vliv zvýšených dávek selenu na výnos plodnic u 4 kmenů korálovce ježatého

6.2.3.2 Vliv selenu a zinku na produkci mycelia korálovce ježatého

Ukázalo se (Graf 17), že nejvyšší produkce mycelia při hloubkové (submerzní) kultivaci bylo dosaženo na kontrolním selenem neobohaceném živném roztoku. Při obohacení 2 mg na 1 litr roztoku se produkce mycelia od neobohacené varianty u jednoho z kmenů korálovce nezměnila a u druhého kmene se snížila. Při koncentraci 18 mg byla produkce mycelia silně snížena. To nekoresponduje s vlivem selenu na výnos plodnic pěstovaných na pevném pilinovém substrátu. Výnos plodnic byl nejvyšší při přidavku 2 mg seleničitanu sodného na 1 kg substrátu a nijak se s rostoucí koncentrací seleničitanu do substrátu výrazně nesnižoval. Na druhé straně se ukázalo, že na tekuté půdě kultura korálovce citlivěji reaguje na zvyšující se koncentrace seleničitanu sodného a nejvyšší dávka 18 mg již zcela omezila jeho růst.

V případě obohacení tekuté půdy síranem zinečnatým docházelo také k postupnému snižování produkce mycelia, ale pokles produkce biomasy mycelia se vzrůstající koncentrací síranu zinečnatého nebyl tak výrazný jako v případě obohacení roztoku seleničitanem sodným.



Graf 17 Produkce mycelia 2 kmenů *H. erinaceus* na tekutém živném mediu při různých koncentracích selenu a zinku

7 Příprava a analýza vzorků hub pro stanovení obsahu selenu a zinku

7.1 Příprava vzorků plodnic

Jednotlivé varianty vzorků byly sklizeny při určité velikosti plodnic (prodejní velikost, plodnice má mírně podvinutý okraj klobouku). Sklizené vzorky byly nejdříve umístěny při teplotě $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ a posléze byly zamražené vzorky lyofilizovány.

Vysušené vzorky většiny zkoumaných druhů hub byly zhomogenizovány v kávomlýnku ETA 0067 s mlecími kameny. Vzorky byly homogenizovány postupně od nejnižší dávky přidaných prvků (kontrola) po nejvyšší a předány do laboratoře k analýze.

Plodnice lesklokorek jsou ale natolik tuhé, že je není možné homogenizovat podobně jako ostatní druhy. Pro mletí plodnic lesklokorky byl proto zvolen oscilační mlýn MM 301. Díky tomuto přístroji mohou být současně namlety 2 vzorky o objemu 0,2 – 20 ml v časovém intervalu 90 sekund. Mlecí nádoby vytvářejí oscilace v horizontální poloze. Uvnitř nádobek jsou umístěny společně se vzorky mlecí kuličky, které způsobují náraz s vysokou energií na vzorek materiálu v kulatých koncích mlecí nádoby. Intenzita vibrací byla nastavena na 30 Hz.

7.2 Postup stanovení Se a Zn

Měření pomocí hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-MS, Inductively coupled plasma mass spectrometry) bylo provedeno v laboratoři LECH FAPPZ ČZU.

Mineralizace vzorků proběhla v čistých víálkách z křemenného skla v mikrovlnném rozkladném systému (Discover, SP-D, CEM Corp., USA). Do každé z viálek bylo naváženo 0,2 g homogenizovaného vzorku (s přesností na 0,1 mg). Dále byly pipetou přidány 3 ml HNO_3 (Analpure, Analytika, Česká republika) a 3 ml H_2O_2 (p.a., Rotipuran, ROTH, Německo). Byl

použit následující protokol: 10 min ohřev na teplotu 180 °C, 10 min při teplotě 180 °C, 10 min zchlazení na teplotu 50 °C. Mineralizát byl kvantitativně převeden do 50 ml plastové zkumavky a doplněn na finální objem 40 ml ultračistou vodou (Milli-Q systém, Millipore, SAS, Francie). V takto zředěných mineralizátech byla stanovena koncentrace Se a Zn při měření izotopů ⁷⁸Se, ⁶⁶Zn technikou ICP-MS (Agilent 8900, Agilent Technologies Inc., USA) v heliovém módu kolizní cely. Jako interní standardy byly použity ⁷²Ge, ⁷⁴Ge, ¹⁰³Rh. K zajištění kvality měření a správnosti výsledků metody pro stanovení obsahu prvků ve vzorcích hub byly pravidelně analyzovány také slepé vzorky a certifikovaný referenční materiál (BCR-185R, bovine liver).

8 Příprava doplňků stravy z plodnic *Pleurotus ostreatus*

Předchozí výsledky ukazují, že plodnice hlívy ústříčné obohacené zinkem nejsou vhodné pro klinické studie, protože následkem vyšších dávek síranu zinečnatého se do plodnic nepodaří akumulovat dostatečné množství Zn. Proto jsme se zaměřili na přípravu doplňku stravy z plodnic obohacených selenem.

Při zamýšleném použití hub jako selenizovaného doplňku stravy se výrobní proces musel upravit tak, aby bylo dosaženo optimálního obsahu Se v houbách nastavením vhodné dávky seleničitanu sodného do substrátu. Společnost Terezia Company má požadavek na vyšší obsah selenu v obohacených plodnicích. Na základě výsledků firma vyhodnotila, že přírůstek 2 a 6 mg selenu na kg substrátu je nedostatečný pro výrobu doplňku stravy s přihlédnutím k denní referenční hodnotě příjmu Se.

Při přípravě substrátu hlívy s vysokým obsahem Se ke klinickému pokusu byl použit roztok seleničitanu zaručující dávku 18 mg Se na 1 kg substrátu. Podařilo se získat 0,8 kg sušené hlívy, která byla jemně namleta a předána do Terezia Company. Výsledky měření obsahu selenu v hlívě ke klinickému pokusu viz Tab. 4.

Tab. 4 Průměrná hodnota obsahu Se a Zn v hlívě ze substrátu ke klinickému pokusu

Se		Zn	
µg/g	± SD	µg/g	± SD
69,1	2,7	43,5	1,1

Pozn. SD – Standard deviation (směrodatná odchylka)

Bylo navrženo několik variant kapslí podle jejich velikosti a obsahu Se (% denní referenční hodnoty příjmu). Firma se rozhodla, že nejlepší variantou bude 300 mg hlívy v 1 kapsli, což je 37 % RHP selenu (viz Tab 5).

Tab. 5 Kalkulované velikostní varianty kapslí

Hlíva ústříčná sušený prášek v 1 cps – Selen 69 µg/g					
Plnění do kapsle	250 mg	270 mg	300 mg	320 mg	350 mg
Obsah Se (% RHP)	17 µg (31 % RHP)	19 µg (33 % RHP)	21 µg (37 % RHP)	22 µg (40 % RHP)	24 µg (43 % RHP)

Pozn. 55 µg Se = 100 % RHP, RHP – referenční hodnota příjmu

9 Popis uplatnění certifikované metodiky

Metodika najde uplatnění u pěstitelů hlívy a dalších léčivých hub, kteří mají zájem o pěstování hub s přidanou hodnotou pro trh čerstvými houbami i pro další zpracování (konzervace, sušení). Nabízí se i možnost využití sušených a namletých plodnic obohacených hub u výrobců doplňků stravy.

10 Srovnání novosti postupů

V rámci studia vybraných druhů léčivých hub byly obohacovány substráty pro 4 druhy léčivých hub selenem a zinkem. V rámci jednotlivých druhů byly vybrány takové kmeny, které reagovaly významně na příjem selenu. Byla také upřesněna optimální dávka selenu dodaná do substrátu a to 18 mg Se na 1 kg substrátu. Součástí metodiky je také postup přípravy doplňku stravy – hlívy obohacené selenem. Metodika nalezne uplatnění u zájemců o pěstování širokého spektra hub obohacených selenem.

11 Ekonomické aspekty

Při přípravě substrátu hlívy obohacené selenem se předpokládá jeho obohacení seleničitanem sodným. To předpokládá navýšení nákladů při přípravě substrátu o cenu seleničitanu sodného. Jeho cena činí 2 000 Kč za 100 g. Aby se obohacení substrátu seleničitanem účinně projevilo zvýšením denní dávky selenu je třeba obohatit 5 t substrátu 60 g seleničitanu sodného v hodnotě 1 200 Kč. Vynaložení dalších nákladů není potřeba.

Tab. 6 Náklady na výrobu 5 tun substrátu hlívy ústříčné

Položka	Množství	Cena za jednotku v Kč	Celkem Kč
Sláma	1,5t	1500	2250
Sadba	250 kg	47	11750
Vápenec	250 kg	1,20	300
Nafta na drcení, plnění propařovačky, pytlování a vyvážení	43 l	39	1677
Uhlí	180 kg	3,415	615
Pytle	250 ks	5,66	1415
Mzda na veškeré práce při přípravě substrátu a pěstování včetně odvodů	32 hodin	194	6208
Energie na propařování	$(7 \text{ kW} * 24 * 7)/6 = 196 \text{ kW}$	3,9	764
Seleničitan sodný	60 g	2000	1200
Celkem 5 t substrátu na výrobu 1 t hlívy			26179

Tab. 7 Náklady na pěstování 1 t hlívy

Položka	Náklady na 1 t hlívy v Kč
Energie na pěstírně - měsíční spotřeba na výrobu 8,5 t hlívy/8,5	2524
Mzdové náklady včetně odvodů na sběr a balení hlívy 30 hodin* 187 Kč	5610
Rozvozové náklad: mzda včetně odvodů 84 hodin/8,5 t= 9,88 * 194	1917
Vozidla 2949 km * 6 Kč = 17694,-- Kč/8,5	2082
Režie 1190400,--Kč za rok / 100 t	11904
Náklady na výrobu 1 t hlívy včetně substrátu	49016
Průměrná realizační cena za 1 t hlívy	53427
<u>Zisk</u>	4411

12 Závěry

V naší práci byla zkoumána schopnost vybraných druhů hub pěstovaných na různých substrátech akumulovat ve svých plodnicích selen a zinek. Substráty pro pěstování hlív (*Pleurotus* sp.), šiitake (*Lentinula edodes*), u lesklokorek *Ganoderma lingzhi*, *G. adspersum* a *G. lucidum* a několika kmenů korálovce (*Hericium erinaceus*). byly obohaceny selenem v dávkách 2, 6 a 18 mg/kg (ve formě Na_2SeO_3) a zinkem v dávkách 10, 20 a 40 mg/kg (ZnSO_4).

Byl porovnán obsah Se a Zn v kloboucích a třeních hub. Rovněž byl stanoven vliv použitých substrátů na obsah selenu v plodnicích a vliv přídavku Se a Zn na růst mycelia hlívy a korálovce. Kromě toho byl zkoumán příjem selenu různými druhy hlív, za účelem stanovení takového kmene, který má největší akumulační potenciál selenu. U všech studovaných druhů hub se s přidavkem seleničitanu sodného byly obsahy Se v houbách nejvyšší při nejvyšší dávce 18 mg/kg. V kloboucích byl obsah Se vyšší než ve třeních. Při studiu vlivu přídavku seleničitanu sodného na výnos se ukázalo, že se zvyšující dávkou seleničitanu se u korálovce zvýšil výnos a to na hladině suplementace selenu 2 mg/kg.

Cílem této práce je návod na možné využití obohacené hlívy ústřičné o selen jako doplňku stravy poskytující selen. Výsledky pokusů s obohacováním selenem statisticky prokázaly schopnost *P. ostreatus* významně akumulovat tento prvek z různých substrátů. Ukázalo se, že složení substrátu má vliv na příjem selenu kulturou studovaných hub. Mycelium hlívy ústřičné prorůstalo rychleji substrátem z *Miscanthus* a pšeničných otrub než stejným substrátem s přidavkem listnatých pilin. Výsledky ukázaly, že při obohacování substrátů seleničitanem sodným bude vhodné používat takové kmeny hlívy ústřičné, které po obohacení vykazovaly nejvyšší obsah Se v plodnicích jako tomu bylo u kmene HK 35. Ukázalo se, že obohacování substrátů hlívy ústřičné seleničitanem sodným může vést k rozšíření sortimentu doplňků stravy.

Praktickou aplikací byl vývoj doplňku stravy – kapsle plněné hlívou obohacené selenem. Aby se dosáhlo odpovídajícího obsahu selenu a to 37% RHP (referenční hodnota příjmu), osvědčilo se použití hlívy pěstované na substrátu doplněném 18mg Se na 1 kg substrátu.

V rámci experimentu bylo zjištěno, že obohacování substrátu zinkem mělo zanedbatelný účinek. Obsah zinku v plodnicích všech studovaných hub byl jen mírně zvýšen a zvýšení nebylo průkazné. Ani při nejvyšší dávce síranu zinečnatého nebylo dosaženo výrazně zvýšeného obsahu zinku v plodnicích studovaných hub.

Při obohacení tekutého živného media (sladový extrakt) o stejné koncentraci seleničitanu sodného se ukázalo, že na ekvivalentních hladinách přídavku Se aplikovaných v experimentech s tuhými substráty působily zvýšené dávky Se na růst mycelia negativně.

13 Literatura

- Antonyak H, Iskra R, Panas N, Lysiuk R. 2018. Selenium. Pages 63-98 in Malavolta M, Mocchegiani E, editors. Trace Elements and Minerals in Health and Longevity. Springer International Publishing AG, Cham.
- Bhatia P, Aureli F, D'amato M, Prakash R, Cameotra SS, Nagaraja TP, Cubadda F. 2013. Selenium bioaccessibility and speciation in biofortified *Pleurotus* mushrooms grown on selenium-rich agricultural residues. *Food Chemistry* 140(1-2):225-230.
- Bhatia P, Prakash R, Prakash NT. 2013. Selenium uptake by edible oyster mushrooms (*Pleurotus* sp.) from selenium-hyperaccumulated wheat straw. *J Nutr Sci Vitaminol* **59**:69-72.
- Beelman RB, Royse DJ. 2005. Selenium Enrichment of *Grifola frondosa* (Dicks.:Fr.) S.F.Gray (Maitake Mushroom). *International Journal of Medicinal Mushrooms*. Available from <http://dl.begellhouse.com/journals/708ae68d64b17c52,0d0f121956dd501b,0b4bc022690d2149.html> (accessed August 2020).
- Brown KH, Sara EW, Peerson JM. 2001. The Importance of Zinc in Human Nutrition and Estimation of the Global Prevalence of Zinc Deficiency. *Food and Nutrition Bulletin* **2**:113-125.
- EFSA NDA Panel (EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies). 2014. Scientific Opinion on Dietary Reference Values for selenium. *EFSA Journal* 2014; **12**:3846.
- EFSA NDA Panel (EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies). 2014. Scientific Opinion on Dietary Reference Values for zinc. *EFSA Journal* 2014; **12**:3844.
- Finley JW. 2005. Selenium accumulation in plant foods. *Nutr Rev.* **63**:196-202.
- Finley JW. 2006. Bioavailability of selenium from foods. *Nutrition Reviews* **64**:146-151
- Gać P, Czerwińska K, Macek P, Jaremków A, Mazur G, Pawlas K, Poręba R. 2021. The importance of selenium and zinc deficiency in cardiovascular disorders. *Environmental Toxicology and Pharmacology* **82**.
- Gąsecka M, Mleczek M, Siwulski M, Niedzielski P, Kozak L. 2015b. The effect of selenium on phenolics and flavonoids in selected edible white rot fungi. *LWT - Food Science and Technology* **63**(1):726-731.
- Gąsecka M, Mleczek M, Siwulski M, Niedzielski P. 2015a. Phenolic composition and antioxidant properties of *Pleurotus eryngii* enriched with selenium and zinc. *European Food Research and Technology* 242: 723-732(2016).
- Haase, H., Ellinger, S., Linseisen, J., Neuhauser, M., Richter. 2020, Revised D-A-CH-reference values for the intake of zinc. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 61,
- Hu T, Hui G, Li H, Guo Y. 2020. Selenium biofortification in *Herichium erinaceus* (Lion's Mane mushroom) and its in vitro bioaccessibility. *Food Chemistry* 331.

- Hu T, Li H, Zhao G, Guo Y. 2021a. Selenium enriched *Hypsizygus marmoreus*, a potential food supplement with improved Se bioavailability. *LWT - Food Science and Technology* 140.
- Hu Z, Yao Y, LV M, Zhang Y, Zhang L, Yuan Y, Yue T. 2021a. Isolation and identification of three water-soluble selenoproteins in Se-enriched *Agaricus blazei* Murrill. *Food Chemistry* 344.
- Chen L, Wang Z, Zhang B, Ge M, Ng H, Niu Y, Liu L. 2019. Production, structure and morphology of exopolysaccharides yielded by submerged fermentation of *Antrodia cinnamomea*. *Carbohydrate Polymers* 205:271-278.
- Izydorczyk G, Ligas B, Mikula K, Witek-Krowiak A, Moustakas K, Chojnacka K. 2021. Biofortification of edible plants with selenium and iodine – A systematic literature review. *Science of The Total Environment* 754.
- Jothimani D, et al. 2020. COVID-19: Poor outcomes in patients with zinc deficiency. *International Journal of Infectious Diseases* 100:343-349
- Jablonský I, Šásek V. 2006. Jedlé a léčivé houby: pěstování a využití. Brázda, Praha.
- Kvíčala J. 2003. Zvýšení příjmu mikronutrientu selenu – utopie, fikce, prozřetelnost či nutnost? – I. část. *Interní medicína pro praxi* 5:295-300.
- Maret W, Sandstead HH. 2006. Zinc requirements and the risks and benefits of zinc supplementation. *J Trace Elem Med Biol.* 20:3-18.
- Mehdi Y, Hornick JL, Istasse L, Dufrasne I. 2013. Selenium in the environment, metabolism and involvement in body functions. *Molecules* 18:3292-3311.
- Navarro-Alarcon M, Cabrera-Vique C. 2008. Selenium in food and the human body: A review. *Sci. Total Environ.* 400:115-141.
- Prasad AS. 2000. Effects of zinc deficiency on immune function. *J. Trace Elem. Exp. Med.* 13:1-20.
- Presnyakova MV, Kostina OV, Albitskaya ZV. 2019. Biological role of zinc and its importance for pathogenesis of autistic spectrum disorders. *Social and clinical psychiatry* 29: 63-70.+ Russell RM, et al. 2001. Dietary Reference Intakes for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium, and Zinc. The National Academies Press, Washington, DC.
- Salnikova EV. 2016. Human needs for zinc and its sources (review). *Trace Elements in Medicine* 17:11-15.
- Santos H, Filipe O, Teixeira J, Schoenfeld BJ. 2020. Dietary vs. pharmacological doses of zinc: A clinical review. *Clinical Nutrition* 39(5):1345-1353.
- Shu Y, WU M, Yang S, Wang Y, Li H. 2020. Association of dietary selenium intake with telomere length in middle-aged and older adults. *Clinical Nutrition* 39(10):3086-3091.

- Silva M, Luz JM, Paiva A, Mendes DR, Carvalho AA, Naozuka J, Kasuya M. 2019. Growth and Tolerance of *Pleurotus ostreatus* at Different Selenium Forms. *Journal of Agricultural Science* 11:151-158.
- Silva MCS, Naozuka J, Luz JMR, Assunção LS, Oliveira PV, Vanetti MCD, Bazzolli DMS, Kasuya MCM. 2012. Enrichment of *Pleurotus ostreatus* mushrooms with selenium in coffee husks. *Food Chemistry* 131:558-563.
- Simonova A, Pfannhauser, W. 2008. Selen – Vorkommen, Wirkung und Versorgung. *Die Ernährung = Nutrition* 32:364-378.
- Skalny AV, Rudakov IF. 2004. Bioelements in medicine, Moscow.
- Solovyev N, Prakash NT, Bhatia P, Prakash R, Drobyshchev E, Michalke B. 2018. Selenium-rich mushrooms cultivation on a wheat straw substrate from seleniferous area in Punjab, India. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 50:362-366.
- Stajic M, Brceski I, Vukojević J, Duletic-Lausevic S. 2005. Ability of Selenium Absorption by Mycelia of *Pleurotus eryngii* (DC.:Fr.) Quel., Depending on Selenium Source in Medium. *International Journal of Medicinal Mushrooms* 7:467-468.
- Turło J, Gutkowska B, Herold F. 2010. Effect of selenium enrichment on antioxidant activities and chemical composition of *Lentinula edodes* (Berk.) Pegl. mycelial extracts. *Food and Chemical Toxicology* 48(4):1085-1091.
- Velez MEV, da Luz JMR, da Silva MdCS, Cardoso WS, Lopes LdS, Vieira NA, Kasuya MCM. 2019. Production of bioactive compounds by the mycelial growth of *Pleurotus djamor* in whey powder enriched with selenium. *LWT - Food Science and Technology* 114.
- Yashona DS, Mishra US, Aher SB. 2018. Response of pulse crops to sole and combined mode of zinc application: A review. *J. Soils and Crops* 28:249-258.
- Zhou D, Xiao Y, Wu H. 2021. Selenium accumulation, speciation, and its effect on nutritive value of *Flammulina velutipes* (Golden needle mushroom). *Food Chemistry* 350: 128667.
- Zhou F, Yang W, Wang M, Miao Y, Cui Z, Li Z, Liang D. 2018. Effects of selenium application on Se content and speciation in *Lentinula edodes*. *Food Chemistry* 265:182-188.
- Zięba P, Kała K, Włodarczyk A, Szewczyk A, Kunicki E, Sękara A, Muszyńska B. 2020. Selenium and Zinc Biofortification of *Pleurotus eryngii* Mycelium and Fruiting Bodies as a Tool for Controlling Their Biological Activity. *Molecules* 25:889

14 Seznam publikací, které předcházely metodice

- Jablonský, I., Šašek, V. (2006): Jedlé a léčivé houby - pěstování a využití. Brázda. ISBN: 80-209-0341-0.
- Jablonský I, Šašek V, Koudela M. 2019 Jedlé a léčivé houby a jak je pěstovat. Profi Press, Praha.
- Jablonský, I., Jelínek, F., Kaplan, L., Koudela, M., Tlustoš, P., Bazalová, M. (2018) Zhodnocení fyzikálně-chemických a biologických vlastností substrátů založených na bázi separátů upravených fermentací. . Certifikovaná metodika. Česká zemědělská univerzita v Praze. 37 s.
- Kadlecová, H. (2020) Diplomová práce.:Příjem selenu a zinku houbami šiitake (*Lentinula edodes*) a lesklokorka (*Ganoderma lucidum*) kultivovanými na různých substrátech s cílem využití plodnic hub jako doplňků stravy, Česká zemědělská univerzita v Praze. Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů. Praha. 72 s.
- Otradovcová, Š. (2016): Diplomová práce: Vliv ošetření substrátu a teplotních podmínek na vývoj kultury *Pleurotus eryngii* a *Pleurotus nebrodensis*. Česká zemědělská univerzita v Praze. Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů. Praha. 72 s.
- Panina ,A. (2020) Diplomová práce.:Příjem selenu a zinku hlívou ústřičnou (*Pleurotus ostreatus*) kultivovanou na různých substrátech s cílem využití plodnic hub jako doplňků stravy, Česká zemědělská univerzita v Praze. Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů. Praha. 59 s.
- Sobotová, R. (2016): Diplomová práce. Příprava substrátu pro pěstování korálovce ježatého (*Hericium erinaceus*) za použití různých přísad a teplotních ošetření. Česká zemědělská univerzita v Praze. Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů. Praha.69 s.



Hlíva citrónová (*Pleurotus citrinopileatus*)

Hlíva ústříčná (*Pleurotus ostreatus*)



Pleurotus sp. – bezspórý druh

Hlíva vějířová (*Pleurotus flabellatus*)

Obr. 3 Kmeny hlív (*Pleurotus* sp.) obohacované selenem a zinkem



Kontrola



2 mg na 1 kg substrátu



6 mg Se



18 mg Se

Obr. 4 Plodnice šiitake (*Lentinula edodes*) na substrátech obohacených různými dávkami selenu



Plodnice *Ganoderma lucidum*
při nedostatečném osvětlení



Ganoderma lucidum
vyvinutá v optimálních podmínkách

Obr. 5.1 Kmeny lesklokorek obohacované selenem a zinkem



Ganoderma linzhi



Ganoderma lucidum 2 mg Zn



Ganoderma lucidum obohacená 40 mg Zn



Ganoderma lucidum – kontrola

Obr. 5.2 Kmeny lesklokorek obohacované selenem a zinkem



Kmen KZ 92



Kmen KZ 91



Kmen KZ 111



KZ 120

Obr. 6 Kmeny korálovce ježatého (*Hericium erinaceus*) obohacované selenem a zinkem