

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra agroenvironmentální chemie a výživy rostlin



**Pestovanie jedlých a liečivých húb na substrátoch
pripravených fermentáciou pilín**

Diplomová práca

Autor práce: Adam Brezáni

Obor studia: Ekologické zemědělství

Vedoucí práce: prof. Ing. Pavel Tlustoš, CSc.

Konzultant: Ing. Ivan Jablonský, CSc.

© 2017 ČZU v Praze

Čestné prehlásenie

Prehlasujem, že svoju diplomovú prácu "Pestovanie jedlých a liečivých húb na substrátoch pripravených fermentáciou pilín" som vypracoval samostatne pod vedením vedúceho diplomovej práce a s použitím odbornej literatúry a ďalších informačných zdrojov, ktoré sú citované v práci a uvedené v zozname literatúry na konci práce. Ako autor uvedenej diplomovej práce ďalej prehlasujem, že som v súvislosti s jej vytvorením neporušil autorské práva tretích osôb.

V Prahe dňa 13. 4. 2017

Pod'akovanie

Rád by som touto cestou poďakoval prof. Ing. Pavlu Tlustošovi, CSc. za dôveru a vedenie diplomovej práce. Ďalej potom Ing. Ivanovi Jablonskému, CSc. za podrobné zasvätenie do problematiky, pomoci pri zakladaní pokusov a nespočetné množstvo odborných rád. Následne chcem poďakovať členom a vedúcim Katedier agroenvironmentální chémie a výživy rastlin, chémie a zahradníctví za poskytnuté zázemie pre pokusy a ich pomoc pri spracovaní analýz vzoriek. Ďakujem Ing. Kateřině Svobodové, Ph.D. z Mikrobiologického ústavu AV v Praze za pomoc pri stanovení enzymatickej aktivity a RNDr. Davidovi Novotnému, Ph.D. z Výskumného ústavu rostlinné výroby v Praze, za poskytnuté kmene a sadbu skúmaných húb. Výsledky z tejto diplomovej práce boli použité v projekte TAČR 04020329 „Výzkum a vývoj technologie výroby substrátů pro pěstování druhů jedlých a léčivých hub s využitím odpadních surovin a odpadního tepla z bioplynových stanic“.

Pestovanie jedlých a liečivých húb na substrátoch pripravených fermentáciou pilín

Súhrn

Existuje mnoho štúdií o problematike kultivácie húb na ligninolytických odpadoch, avšak málo z nich sa zaoberalo ich kultiváciou na ihličnatých pilinách. V práci Croan (2004) bolo ukázané, že úpravou ihličnatých pilín fermentáciou je možné získať substrát, na ktorom je možné kultivovať jedlé a liečivé huby. Vďaka tomu by bolo možné tento ľahko dostupný, ale zatiaľ málo ekonomicky zaujímavý materiál zhodnotiť. Ihličnaté piliny, musia však prejsť úpravou, pri ktorej sú odbúrané prchavé organické látky, ktoré zabraňujú úspešnej kolonizácii substrátu hubou.

Cieľom práce bolo zistiť, či fermentáciou smrekových pilín je možné pripraviť substrát vhodný pre pestovanie jedlých a liečivých húb, zároveň preukázať, či je kvapalná zložka digestátu (fugát) vhodná pre zlepšenie procesu fermentácie pilín.

V rámci predloženej diplomovej práce boli smrekové piliny fermentované po dobu 3, 6, alebo 9 týždňov. U niektorých variant bol využitý 5 % prídavok fugátu na podporu mikrobiálnej aktivity. Tým sa urýchľuje a zefektívňuje samotná fermentácia. Následne, na týchto variantách fermentovaných pilín boli kultivované jedlé a liečivé huby *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) *P. Kumm.*, *Pleurotus eryngii* (DC.) *Quél.*, *Hericium erinaceus* (Bull.) *Pers.* a *Ganoderma lucidum* (Curtis) *P. Carst.* Pri každom pokuse boli použité aj bukové piliny ako kontrolná varianta.

Z fermentovaných smrekových pilín bola vybraná varianta po 6 týždňoch ošetrovania s prídavkom fugátu (F6), ktorá sa na základe prevedeného pokusu t.j. sledovania intenzity rastu mycélia na jednotlivých substrátoch, fermentovaných po rôznu dobu, javila ako najvhodnejšou alternatívou pre kultiváciu jedlých a liečivých húb. Zároveň bolo vykonané stanovenie prchavých organických látok u smrekových pilín, pričom v 6. týždni fermentácie boli tieto látky redukované z 31,86 mg/kg na 10,47 mg/kg u varianty F6. Táto fugátom obohatená varianta bola porovnávaná s bukovými pilinami a s variantou smrekových pilín fermentovaných po dobu 6 týždňov, ale bez prídavku fugátu (B6). Na týchto troch substrátoch boli opakovane vykonané kolonizácie substrátu jedlými a liečivými hubami, stanovená aktivita ligninolytických enzýmov, pomer C : N, zmena hodnoty pH substrátu počas kolonizácie a stanovený obsah lignínu pred a po kolonizácii hubou.

Na základe týchto informácií bolo usúdené, že substrát upravený fermentáciou po dobu 6 týždňov s 5 % prídavkom fugátu je tou najvhodnejšou variantou pre kultiváciu jedlých a

liečivých húb. Tento substrát bol v rýchlosti kolonizácie substrátu hubami *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus eryngii* a *Ganoderma lucidum* rovnako efektívny ako bukové piliny. Najlepšie sa darilo na ošetrovaných smrekových pilinách *Pleurotus ostreatus* a bolo zistené, že *Hericium erinaceus* nie je schopná tieto druhy substrátov úspešne kolonizovať.

Nakoľko smrekové piliny a fugát sú ľahko dostupným materiálom jedná sa o veľmi zaujímavý segment s možnosťou uplatnenia v ekologickom poľnohospodárstve v rámci diverzifikácie výroby.

Kľúčová slova: Huby, enzýmy, fugát, piliny, mycélium, fermentácia.

Cultivation of Edible and Medicinal Mushrooms at Growing Substrates Made of Saw Dust Fermentation

Summary

Many studies were focused on cultivation of edible and medicinal mushrooms at lignocellulose waste materials, but only few have dealt with cultivation of those mushrooms at coniferous sawdust. Croan (2004) showed, that fermentation of coniferous sawdust may lead to substrate which is suitable for growing mushrooms. Due to this fact, it is possible to convert this low value wood waste into gourmet and medicinal mushrooms. Coniferous sawdust needs to undergo treatment, getting rid of volatile organic compounds that inhibit successful colonization of those substrates by fungi.

The goal of my thesis was to employ the fermentation to treat coniferous sawdust and evaluate suitability of this option to create a substrate for cultivation of edible and medical mushrooms. Moreover, we aimed to prove whether a liquid part of digestate is advisable for enhancing the fermentation effect.

Spruce sawdust was fermented for the length of 3, 6, and 9 weeks. Some variants were treated with liquid part of digestate at rate of 5 % to enhance microbial activity, which speeds up the process of fermentation. Fermented material was used for cultivation of *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm., *Pleurotus eryngii* (DC.) Quél., *Hericiium erinaceus* (Bull.) Pers. and *Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Carst. Each trial included beech sawdust used as a control sample.

Out of all the fermented spruce sawdust samples, the six weeks treated variant with addition of liquid part of digestate (F6) was chosen as the best substrate for fungi cultivation. This claim is based on experiment which has proven that aforementioned variant is more suitable for growth of edible and medical mushrooms in comparison to beech sawdust and fermented sawdust without liquid part of digestate (B6). The content of volatile organic compounds (VOC) was determined, showing the reduction of VOC in F6 substrate, from 31,86 mg/kg to 10,47 mg/kg respectively, compared to B6. The mycelium growth rate was repeatedly measured in these substrates. Subsequently, enzyme assays were performed, as well as measurements of C : N ratio and change of pH value during colonization. Moreover, total lignin content was obtained before and after fungi colonization.

Based on the data, the fermented coniferous sawdust treated with liquid part of digestate was evaluated as a substrate which is comparable to beech sawdust substrate in the rate of mycelium

colonization. *Pleurotus ostreatus* thrived the most on fermented spruce sawdust with addition of liquid part of digestate, while *Hericiium erinaceus* was not able to successfully colonize these kinds of substrate.

Thanks to high abundance of spruce sawdust and liquid part of digestat in Czech Republic, proposed cultivation technology is an attractive way of production diversification at ecological farm.

Keywords: Mushrooms, enzymes, liquid part of digestate, sawdust, mycelium, fermentation.

Obsah

1 Úvod.....	1
2 Hypotéza práce	3
3 Cieľ práce.....	3
4 Teoretická časť	4
4.1 Kultivácia húb	4
4.1.1 Sterilizácia substrátu	7
4.1.2 Pasterizácia substrátu	7
4.1.3 Hodnota pH substrátu a jeho vplyv na rast podhubia a plodníc	8
4.1.4 Pomer C : N v substráte	9
4.1.5 Pestovanie húb na pilinách ihličnatých drevín	11
4.1.5.1 Základná charakteristika terpénov	11
4.1.5.2 Kultivácia húb na ihličnatých pilinách.....	12
4.1.6 Fugát	13
4.2 Kultivácia vybraných druhov jedlých a liečivých húb.....	13
4.2.1 Mykologická charakteristika <i>Pleurotus ostreatus</i>	14
4.2.2 Intenzívne pestovanie <i>Pleurotus ostreatus</i>	15
4.2.3 Mykologická charakteristika <i>Pleurotus eryngii</i>	16
4.2.4 Intenzívne pestovanie <i>Pleurotus eryngii</i>	17
4.2.5 Mykologická charakteristika <i>Hericiium erinaceus</i>	19
4.2.6 Intenzívne pestovanie <i>Hericiium erinaceus</i>	19
4.2.7 Mykologická charakteristika <i>Ganoderma lucidum</i>	20
4.2.8 Intenzívne pestovanie <i>Ganoderma lucidum</i>	21
4.3 Medicínske účinky liečivých a jedlých húb	22
4.4 Lignín	24
4.5 Ligninolytické huby a ich význam	25
4.6 Ligninolytické enzýmy.....	26
4.6.1 Lakáza	26
4.6.2 Lignínperoxidáza	28
4.6.3 Mangán dependentná peroxidáza.....	29
4.6.4 Verzateľná peroxidáza	31
4.6.5 Uplatnenie ligninolytických enzýmov v degradácii organických polutantov	31
5 Materiál a metódy	33
5.1 Materiál	33
5.1.1 Agarové živné médium	33
5.1.2 Sadba.....	33

5.1.3	Použité huby	33
5.1.4	Použité nádoby pri kultivácii húb	34
5.1.5	Substrátový materiál	34
5.2	Metódy	35
5.2.1	Pokus - fermentácia smrekových pilín.....	35
5.2.2	Pokus – sledovanie intenzity rastu jednotlivých jedlých a liečivých húb na bukových pilinách	36
5.2.3	Pokus – sledovanie intenzity rastu mycélia jedlých a liečivých húb na jednotlivých substrátoch	37
5.2.4	Pokus – sledovanie intenzity rastu mycélia jedlých a liečivých húb na vybraných substrátoch s 20 % obohatením pšeničnými otrubami	38
5.2.5	Pokus – stanovenie aktivity ligninolytických enzýmov	39
5.2.5.1	Kultivácia húb pre stanovenie ligninolytickej enzymatickej aktivity	39
5.2.5.2	Odber dvoch typov vzoriek pre stanovenie ligninolytickej enzymatickej aktivity.....	40
5.2.6	Stanovenie ligninolytickej enzymatickej aktivity	41
5.2.6.1	Tekuté vzorky (kultivačné tekutiny, enzýmy vyextrahované do pufru).....	42
5.2.6.2	Pevné vzorky.....	44
5.2.7	Stanovenie pomeru C : N.....	45
5.2.8	Stanovenie hodnoty pH.....	45
5.2.9	Stanovenie živíc v smrekových pilinách na začiatku a počas fermentácie	46
5.2.9.1	Stanovenie živíc	46
5.2.9.2	Stanovenie prchavých látok	46
5.2.10	Stanovenie lignínu podľa Klasona a holocelulózy	47
5.2.10.1	Stanovenie lignínu.....	47
5.2.10.2	Stanovenie holocelulózy (celulóza + hemicelulóza).....	49
5.2.11	Štastické vyhodnotenie	49
6	Výsledky a diskusia.....	50
6.1	Sledovanie rastu mycélia na bukových pilinách (kontrola)	50
6.2	Intenzita rastu mycélia jedlých a liečivých húb na jednotlivých substrátoch ..	51
6.3	Zmena obsahu prchavých organických látok v smrekových pilinách počas fermentácie.....	54
6.4	Aktivita ligninolytických enzýmov na jednotlivých substrátoch.....	56
6.5	Obsah C a N, pomer C : N	63
6.6	Zmena hodnoty pH substrátu počas kolonizácie substrátu jedlými a liečivými hubami	63
6.7	Zmena obsahu lignínu počas kolonizácie substrátu jedlými a liečivými hubami.....	65
7	Záver.....	67
	Zdroje:	69

8 Zoznam obrázkov.....	83
9 Zoznam grafov.....	83
10 Zoznam tabuliek.....	84
11 Prílohy	1

1 Úvod

Na základe dát Českého statistického úřadu z roku 2015 sa Českéj republike vyřařilo 16 163 000 m³ drevnej hmoty bez kůry. Prevažne sa jednalo o drevo pochádzajúce z ihličnatých stromov (14 385 000 m³), pričom až 85 % tvoril smrek (ČSU, 2015). Odpadový hospodář (2016) uvádza, že pri spracovaní dreva vzniká približne 35 % odpadu, 30 % tohto odpadu predstavujú piliny a hobliny. Väčšina drevného odpadu sa vyuřiva v energetike a krmovinářstve. Ďalšou alternatívou je použitie drevného odpadu ako substrát pre pestovanie jedľých a liečivých hůb (Stamets, 1996; Sanchéz, 2010; Oei, 2016).

Kultivácia jedľých hůb je vhodný biotechnologický proces pre recykláciu ligninocelulotického organického odpadu. Je veľmi pravdepodobné, že sa jedná o jediný proces, ktorý zahrňa produkciu potravy s vysokým obsahom živín a zároveň znižuje znečistenie životného prostredia (Beetz and Kustudia, 2004). Veľké množstvo nepoužitého ligninocelulózoveho materiálu je dostupné v tropických a subtropických oblastiach. Tieto druhotné produkty sú nezužitkované a ponechané hnitiu. Využitie týchto surovín pre pestovanie hůb s využitím lokálnych technológií môže premeniť tento nepoužitelný materiál na substrát vhodný pre pestovanie jedľých a liečivých hůb (Tesfaw, 2015).

Po určitom ošetrení ihličnatých pilín, ktorý ich zbaví prechavých látok môže vzniknúť výnosovo zaujímavý substrát vhodný pre kultiváciu jedľých a liečivých hůb (Croan, 2004). Niektoré huby bielej hniloby sú schopné rozkladať lignín. Po vylodení substrátu danou hubou vznikne surovina s pridanou hodnotou, ktorá je vhodná ako krmivo pre hospodárske zvieratá alebo „bio-palivo“ (Cohen et al., 2002).

Nakoľko sa ČR zaviazala, že do roku 2020 bude 13,5 % elektrickej energie pochádzať z obnoviteľných zdrojov, jedným z nich sú bioplynové stanice (Martinát et al., 2016).

Momentálne je problém ako využiť vedľajší produkt (digestát) pochádzajúci z anaeróbnej digescie pri výrobe bioplynu. Naskytá sa možnosť použitia kvapalnej zložky digestátu (fugátu) z bioplynových staníc pre zlepšenie parametrov substrátu vhodného pre kultiváciu jedľých a liečivých hůb.

Veľa jedľých a liečivých hůb je ľahko kultivovateľných a nevyžadujú finančne náročné technologické zázemie. Pri zabezpečení vhodných rastových parametrov a marketingu poskytnú huby zaujímavú alternatívu k diverzifikácii produkcie malých a stredných fariem.

Sú takisto vhodnou komoditou pre ekologicky zameranú produkciu, nakoľko všetky suroviny potrebné pre výrobu substrátu vznikli prirodzenou cestou bez použitia chemických prípravkov. Niektoré druhy kultivovaných hůb sú odolnejšie proti chorobám a parazitom ako ostatné.

Všetky tieto faktory prispievajú k vhodnosti húb ako produktu ekologickej farmy(Cotter, 2014). Menej hodnotné druhotné suroviny sa takto môžu využiť pre pestovanie húb a vyplodený substrát sa môže použiť ako zložka kompostu alebo materiál pre výrobu peliet. Týmto budú vstupné a výstupné suroviny produkcie celej farmy oveľa hodnotnejšie využité. Dôležitým aspektom je marketing, teda schopnosť tieto huby predat'. Trh v ČR nie je tak pestrý ako v zahraničí a je potrebné zákazníkovi vysvetliť prečo sú dané huby lepšie, zaujímavejšie a chutnejšie ako momentálne pestované druhy. Tento krok je práve lepšie zvládnuteľný na malých farmách/podnikoch, ktoré majú svoj uzavretý kruh spotrebiteľov. Mnoho ekologických fariem poskytuje svojmu spotrebiteľovi priamo vidieť proces produkcie ponúkaných produktov.

2 Hypotéza práce

K riešeniu diplomovej práce na tému „*Pestovanie jedlých a liečivých húb na substrátoch pripravených fermentáciou pilín*“, boli formulované nasledovné hypotézy:

Je možné fermentáciou pilín z ihličnatých druhov drevín pripraviť substrát vhodný pre pestovanie jedlých a liečivých húb?

Je vhodné využiť kvapalnú zložku digestátu (fugátu) pre zlepšenie procesu fermentácie pilín?

3 Cieľ práce

Cieľom diplomovej práce na tému „*Pestovanie jedlých a liečivých húb na substrátoch pripravených fermentáciou pilín*“ bolo spracovať poznatky prevažne zahraničných autorov zaoberajúcich sa problematikou kultivácie jedlých a liečivých húb a na základe vybraných analytických metód preukázať, že úpravou (fermentácia a prídavok fugátu počas fermentácie) smrekových pilín môže vzniknúť substrát vhodný pre pestovanie jedlých a liečivých húb – *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm., *Pleurotus eryngii* (DC.) Quél., *Hericiium erinaceus* (Bull.) Pers. a *Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Carst.

Na rôznych variantách substrátu boli vyhodnotené enzymatické aktivity ligninolytických enzýmov produkovanými týmito hubami, pomer C : N, rast mycélia jednotlivých húb, hodnota pH a obsah lignínu. Všetky tieto dáta prispeli k ucelenému vyhodnoteniu vhodnosti upravených smrekových pilín ako substrátu pre pestovanie jedlých a liečivých húb.

4 Teoretická časť

4.1 Kultivácia húb

Kultiváciu húb zahrňuje niekoľko rôznych operácií, z ktorých každá jedná musí byť starostlivo vykonaná. Konkrétne sa jedná o:

- príprava kultivačného média,
- príprava čistej kultúry,
- príprava inokula (sadby),
- inkubácia inokula,
- príprava a úprava substrátu (miešanie, tepelná úprava, plnenie do vriec alebo nádob),
- inokulácia (osadenie substrátu sadbou),
- inkubácia počas ktorej prebieha prerastenie substrátu,
- kultivácia osadeného substrátu v produkčnej miestnosti,
- zber plodníc (Stamets, 1996).

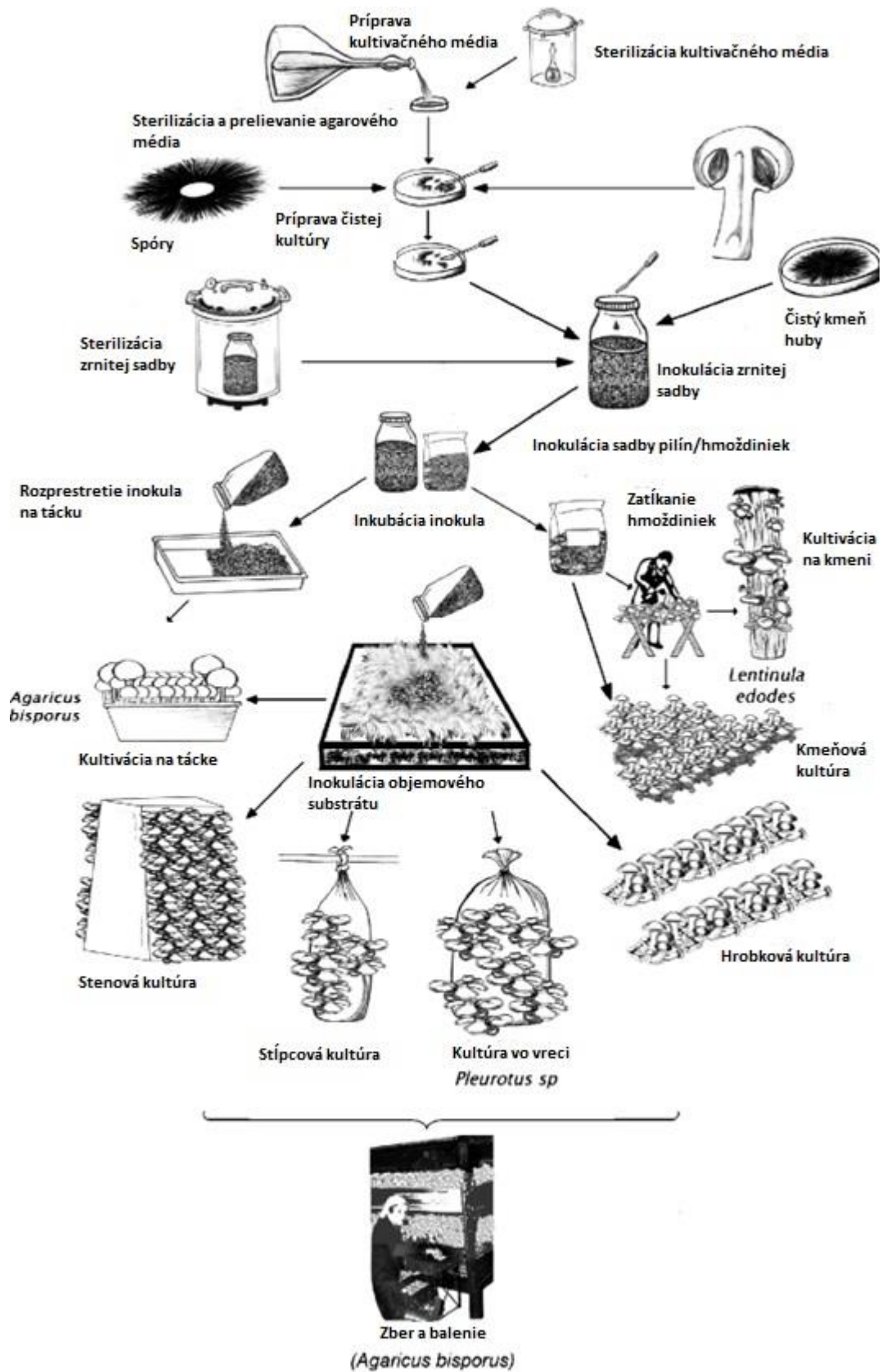
Príprava substrátu, inokulácia, inkubácia a podmienky pre produkciu závisia na kultivovanom druhu huby. Prvá fáza zahŕňa získanie čistého mycélia, z časti špecifickej huby alebo spóry. Pre získanie inokula je mycélium kultivované na zrnách obilnín, napríklad pšenice, raže alebo prosa, takisto nazývané podhubie. Hlavnou úlohou mycéliom prerasteného zrna je rýchla kolonizácia špecifického substrátu pre samotnú tvorbu výnosu, čiže rast plodníc. Jedným z kľúčových faktorov úspechu produkcie húb je kvalita samotného podhubia, ktoré musí byť pripravené za sterilných podmienok tak, aby sa zabránilo kontaminácii substrátu inou hubou alebo organizmom (Sánchez, 2010).

Druhou fázou je príprava materiálu – substrátu, na ktorom sú huby kultivované. Vlastnosti substrátu charakterizujú, ktorá huba a mikrób ho budú schopné kolonizovať. Prostredie kultivácie osadeného substrátu je takisto dôležité. Parametre ako vlhkosť prostredia, osvetlenie a teplota dohromady s internými vlastnosťami substrátu hrajú dôležitú úlohu v tom, či mycélium bude schopné rásť na danom substráte. Čím lepšie substrát spĺňa podmienky pre rast jedného typu húb a čím menej pre iný, tým sa stáva selektívnejším. Selektivita substrátu je závislá na:

- dostupných živinách,
- hútnosti,

- obsahu a distribúcii vody,
- hodnoty pH,
- mikrobiologickej aktivite,
- dôkladnom premiešaní všetkých zložiek substrátu,
- fermentácii,
- tepelnom ošetrení (pasterizácia alebo sterilizácia) (Oei, 2016).

Okolo 300 druhov húb je jedlých, ale iba 30 druhov bolo domestikovaných a 10 ich je komerčne pestovaných (Barney, 1997). Najpestovanejšou hubou v komerčnej sfére je momentálne *Agaricus bisporus* (Sonnenberg et al., 2017). Po mnoho rokov sú huby konzumované a cenené pre ich chuť, ekonomickú a ekologickú hodnotu a liečivé účinky. Vo všeobecnosti huby obsahujú 90 % vody a 10 % sušiny (Morais et al., 2000; Sánchez, 2004). Nutričná hodnota je porovnateľná s bežnými potravinami ako sú vajcia, mlieko a mäso (Oei, 2016). Huby takisto obsahujú vitamíny a sú výborným zdrojom esenciálnych aminokyselín (Sánchez, 2004). Celková energetická hodnota plodníc sa pohybuje medzi 250 – 350 kJ/kg čerstvej huby (Oliver and Delmas, 1987; Laborde, 1995).



Obrázok 1 - Kompletná kultivácia a zber húb (Stamets, 1996)

4.1.1 Sterilizácia substrátu

Úlohou každého tepelného ošetrenia je eliminácia počtu kontaminantov na takú úroveň, ktorá umožňuje dobrý vývin podhubia. Kompletná sterilizácia, kde sú všetky organizmy zabitú tepelným ošetrením je častokrát náročná na dosiahnutie. Doba sterilizácie závisí na type danej huby a zaužívaných technikách lokálnych pestovateľov húb po celom svete. Rozoznávame dva typy tepelného ošetrenia:

1. Tlaková sterilizácia s teplotou okolo 121 °C po dobu 2 – 2.5 hodín,
2. semi-sterilizácia s teplotou pod 100 °C pri okolitom tlaku prostredia po dobu 8 hodín, jedná sa o technologicky menej náročnú operáciu s obdobným výsledkom eliminácie mikroorganizmov ako pri tlakovej sterilizácii.

Tlaková sterilizácia pri 121 °C vyžaduje nádoby, ktoré odolajú pretlakovaniu aspoň 1 atmosféry. Semi-sterilizácia môže byť dosiahnutá v menej technicky náročných nádobách, alebo stanu podobných konštrukciách. Substrát môže byť sterilizovaný v mase alebo už jednotlivo zabalený vo vreckách.

Vrecká s príslušným substrátom ktoré prešli sterilizáciou pri teplote 121 °C tak následne zabezpečia skrátenie doby vylodenia substrátu, pretože organické zložky sú čiastočne rozložené pri vysokej teplote.

Počas tepelného ošetrenia väčšina kontaminantov bude v substráte zabitých. Je dôležité zabezpečiť aby teplota bola dostatočne vysoká v každom vrecku. Rozloženie vreciek v autokláve musí zabezpečiť priepustnosť pary ku každému vrecku (Oei, 2016).

4.1.2 Pasterizácia substrátu

V počiatočných rokoch kultivácie rodu *Pleurotus* bol substrát sterilizovaný. Neskoršie bolo zistené, že tepelné ošetrenie pri nižších teplotách je takisto dostačujúce. Párová pasterizácia a ponorenie do horúcej vody sú tepelne menej náročné ako semi-sterilizácia a sterilizácia. Para alebo voda sa využíva k udržaniu substrátu pri adekvátnej teplote (obvykle okolo 60 – 70 °C) po dobu 6 – 10 hodín. Pri tejto teplote je väčšina konkurentov kultivovaných húb eliminovaných, ale prospešné mikroorganizmy prežijú.

Ponorenie do horúcej vody sa líši oproti pasterizácii v absencii pary. Popri zabití väčšiny konkurentov huby, horúca voda odstráni ľahko rozpustné komponenty zo substrátu. Tieto komponenty by boli napadnuté ako prvé počas kontaminácie substrátu, ich odstránenie poskytuje viac selektívny substrát. Odporúča sa vyvarovať nadmernému počtu pasterizácii (nie viac ako 2 – 3) za použitia tej istej vody, aby sa predišlo problémom s prípadnou

kontamináciou. Pasterizácia parou vyžaduje tunel. Technika ponárania substrátu do horúcej vody je nenáročná, pretože sú potrebné iba zdroj teplej vody a nádoba, respektíve kontajner, ktorý dokáže dostatočne dobre izolovať substrát od teploty okolia.

Ďalšou možnosťou je pasterizácia suchého substrátu parou vo veľkom otáčavom kontajneri s priebežným ochladzovaním studenou vodou. Teplá slama ľahšie absorbuje vodu. Táto technológia zahŕňa veľké investície a substrát býva viac kontaminovaný v porovnaní s predchádzajúcimi dvomi technikami, preto sa v praxi uplatňuje iba málo (Oei, 2016).

4.1.3 Hodnota pH substrátu a jeho vplyv na rast podhubia a plodníc

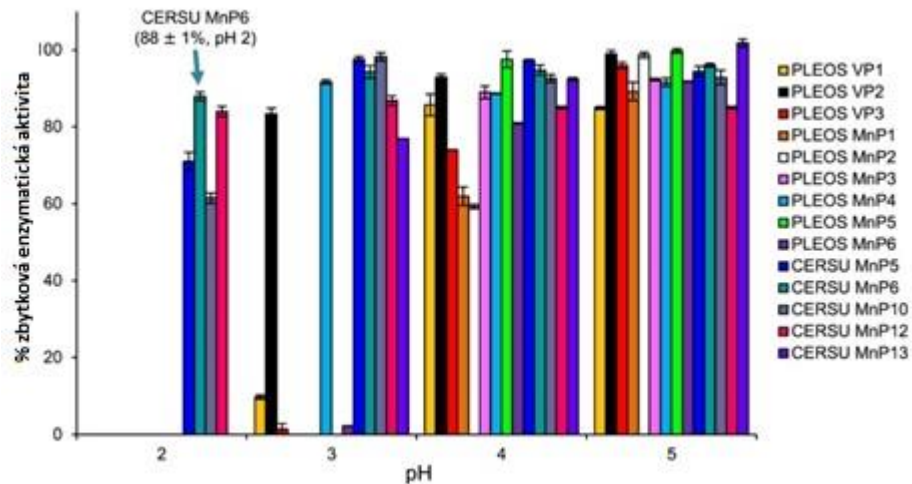
Hodnota pH substrátu patrí medzi jedny zo základných parametrov, ktoré sú sledované pri kultivácii húb. Zabezpečenie optimálneho pH pre daný druh huby prispieva k celkovému vyššiemu výnosu (Tesfaw, 2014).

Podhubie počas svojho rastu produkuje enzýmy a kyseliny, ktoré postupne znižujú hodnotu pH. Na stabilizáciu pH sa používa prídavok sadry, zväčša to býva 1 % v celkovom objeme substrátu (Stamets, 1996).

Rawte a Diwan (2011) sledovali rast 5 izolovaných kmeňov *Pleurotus spp.*, pri rôznych hodnotách pH. Huby kultivovali na 5 rôznych médiách s kontrolovanými hodnotami pH v rozpätí 3.0 – 8.0. Po 9 dňoch inkubácie bolo zrejmé, že optimálna hodnota pH pre rast je 5.0 a najmenej biomasy podhubia bolo zozbieraných z média s pH 3.0 – 4.0. Vyššie hodnoty pH 7.0 – 8.0 takisto zaznamenali obmedzenie rastu biomasy.

Príliš kyslé pH môže mať vplyv na produkciu peroxidáz (mangán dependentná peroxidáza a verzatilná peroxidáza) rozkladajúcich lignín. Fernández-Fueyo et al. (2014) poukazujú na zmenu aktivity peroxidáz pri rôznych hodnotách pH u húb bielej hniloby *Pleurotus ostreatus* a *Ceriporiopsis subvermispota* kultivovaných na štandardizovaných médiách s rozsahom hodnôt pH 2.0 – 5.0. Celkovo bolo pozorovaných 14 peroxidáz (3 verzatilné peroxidázy a 11 MnP). Extrémne nízke hodnoty pH limitovali produkciu niektorých peroxidáz,

iba 4 typy enzýmov boli aktívne, pričom v prostredí s hodnotami pH 5.0 všetkých 14 peroxidáz bolo stabilných (vid'. graf 1).



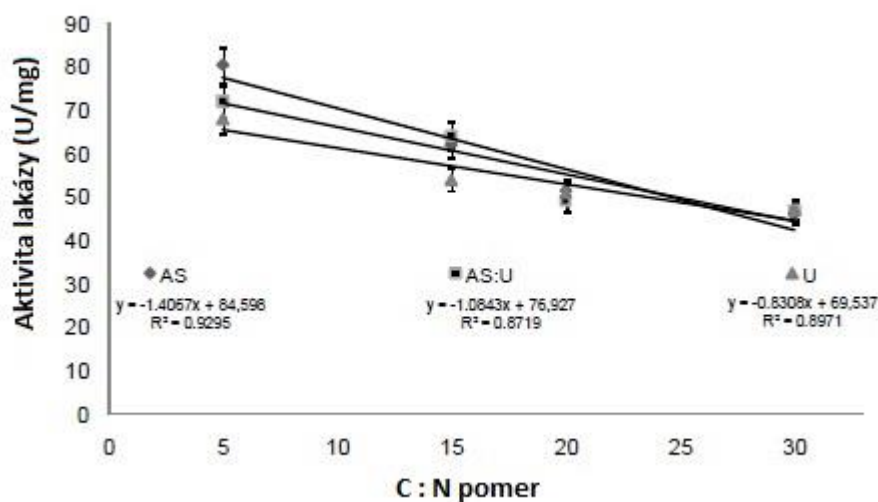
Graf 1 - Vplyv kyslého prostredia na produkciu rôznych peroxidáz produkovaných hubami bielej hniloby *Pleurotus ostreatus* a *Ceriporiopsis subvermisporea*, po 24 hodinovej inkubácii pri teplote 4 °C v 100 mM Britton-Robinson (BR) pufre s hodnotou pH 2.0 – 5.0. PLEOS VP – *Pleurotus ostreatus* verzatílina peroxidáza. PLEOS MnP – *Pleurotus ostreatus* mangán dependentná peroxidáza. CERSU MnP - *Ceriporiopsis subvermisporea* mangán dependentná peroxidáza (Fernández-Fueyo et al., 2014)

4.1.4 Pomer C : N v substráte

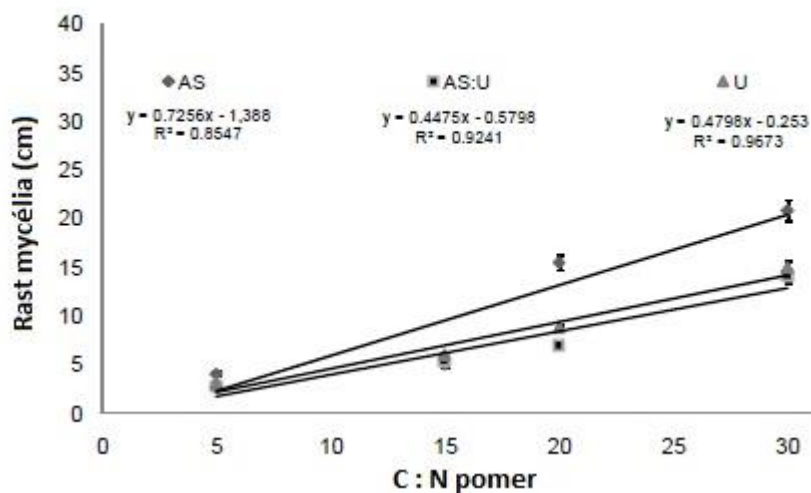
Adekvátny pomer C : N v substráte je dôležitý pre dostatočné rozloženie ligninocelulózy a tým pádom aj úspešnej produkcie húb na tomto substráte (Philippoussis et al., 2001). Pre *Pleurotus spp.* je vhodný pomer C : N v rozpätí 32 : 1 – 150 : 1, v tomto rozmedzí je tvorba plodníc efektívnejšia a nastáva vyšší výnos (Chang and Miles, 1984). Prebytok alebo nedostatok obsahu dusíku v substráte môže mať za následok nedostatočný rast húb (Mantovani et al., 2007). Príliš vysoké prídavky materiálov s vysokým obsahom dusíka (sójové otruby) v substráte môžu zúžiť pomer C : N a obsah živín na úroveň, čo je v konečnom dôsledku kontraproduktívne pre tvorbu plodníc u *Pleurotus ostreatus* (Isikhuemhen and Mikiashvilli, 2009). Pri prebytku dusíku nastáva redukcia rozkladu substrátu (Rajaratnam and Bano, 1989). Nadbytok organického alebo minerálneho dusíku v substráte môže spôsobiť inhibíciu syntézy ligninolytických enzýmov húb bielej hniloby (Bisaria et al., 1997).

Vo všeobecnosti rast mycélia húb bielej hniloby ako sú *Pleurotus ostreatus* a *Lentinula edodes* sa navýši so zväčšujúcim sa pomerom C : N, ale tvorba enzýmu lakázy je znížená.

Pomer C : N užší ako 30 : 1 napomáha syntéze lakázy u týchto húb. Najväčšia produktivita lakázy bola zaznamenaná pri hodnote C : N 5 : 1 pričom rast mycélia *Pleurotus ostreatus* a *Lentinula edodes* bol redukovaný. Tieto dve huby sú vhodné pre kolonizáciu substrátu bohatého na lignín, pričom produkcia lakázy navýši prístupnosť uhlíku v kolonizovanom substráte (D'Agostini et al., 2011). *Pleurotus ostreatus* má schopnosť adaptovať enzymatickú produkciu v závislosti na koncentrácii dusíka v substráte. Toto správanie má pravdepodobne súvislosť s vyššou adaptabilitou huby, ktorá rastie na substrátoch s rôznou koncentráciou dusíka a pomeru C : N. Naopak *Agaricus subrufescens* dobre rastie na kompostových médiách s predchádzajúcim rozkladom ligninocelulytickej časti týchto substrátov. *Lentinula edodes* v prírode rastie na kmeňoch stromov, takže technológie, ktoré sú založené na obohacovaní substrátu dusíkom nebudú príliš účinné pre navýšenie produkcie lakázy alebo výnosu (Elisashvili et al., 2008).



Graf 2 - Vzťah medzi produkciou lakázy huby *Pleurotus ostreatus* a pomeru C:N kultivovaného média (sójové plevy s prídavkom N) AS - síran amonný, U – močovina, AS : U (1 : 1), (D'Agostini et al., 2011)



Graf 3 - Vzťah medzi rastom mycéliá huby *Pleurotus ostreatus* a pomeru C: N kultivovaného média (sójové plevy s prídavkom N) AS - síran amónny, U – močovina, AS : U (1 : 1), (D'Agostini et al., 2011)

4.1.5 Pestovanie húb na pilinách ihličnatých drevín

Huby rodu *Pleurotus* sú celosvetovo kultivované na rôznych ligninocelulolytických odpadoch z poľnohospodárstva alebo na dreve tvrdých drevín, ale na dreve ihličnatých drevín nikdy neboli produkované. Huby bielej hniloby primárne napadajú tvrdé drevo, ale nerastú na mäkkom dreve ihličnanov. Hlavným dôvodom je vysoký obsah extraktív alebo živíc (Croan, 2004).

Mäkké ihličnaté dreviny	Tvrde listnaté dreviny
– Živičné kyseliny: 40 – 45 % extraktív	– Žiadne živičné kyseliny alebo monoterpény
– Mastné kyseliny: 40 – 60 %	– Mastné kyseliny: 60 – 90 %
– Monoterpény (turpentin)	– Fenoly
– Fenoly	

Tabuľka 1 - Rozdiel v type dreva a obsahu extraktívnych komponentov (Cole, 2010)

4.1.5.1 Základná charakteristika terpenov

Terpény a ich deriváty predstavujú širokú skupinu zlúčenín (viac ako 4 000 ich bolo izolovaných a popísaných), ktoré sa nachádzajú v rastlinách. Pojem terpény sa týka uhlíkových, kde zlúčeniny spoločne nazývajúce sa „terpenoidy“ nesú jeden alebo viac kyslíkových funkčných skupín, ako sú hydroxylové, karbonylové a karboxylové skupiny

kyselín. Základnou štruktúrou terpénov je izoprén C_5H_8 a sú rozdelené do viacerých podjednotiek na základe počtu izoprénových jednotiek spojených do terpénu, tak ako to je prezentované v tabuľke 2. Mono-, sesqui-, di-, tri- a polyterpenoidy sú najrozšírenejšie v dreve. Monoterpény a monoterpenoidy sú prchavé látky a sú čiastočne príčinou typickej vône dreva. Vyskytujú sa hlavne v živiciach mäkkého dreva, v tvrdšom dreve je ich výskyt raritný. Monoterpény reprezentujú jednu z najvýznamnejších zložiek živcových kanálikov extraktív a exsudátov v mäkkom dreve (Yang and Jaakkola, 2011).

Názov	Počet $C_{10}H_{16}$ jednotiek	Vzorec
Monoterpény	1	$C_{10}H_{16}$
Sesquiterpény	1.5	$C_{15}H_{24}$
Diterpény	2	$C_{20}H_{32}$
Triterpény	3	$C_{30}H_{48}$
Polyterpény	>4	$>C_{40}H_{64}$

Tabuľka 2 - Klasifikácia hlavných terpénových štruktúr vyskytujúcich sa v dreve (Stenius, 2000)

4.1.5.2 Kultivácia húb na ihličnatých pilinách

Croan (2004) úspešne kultivoval viaceré druhy z rodu *Pleurotus* potom *Hericium erinaceus* a *Grifola frondosa* na ošetrovaných pilinách rôznych druhov ihličnatých drevín. Pred kultiváciou jednotlivými jedlými hubami boli piliny ošetrované hubami schopnými rozkladať extraktívne látky ako terpény. Huby ako *Aureobasidium spp.*, *Ceratocystis spp.*, a *Ophiostoma spp.* boli použité na ošetrovanie substrátu po dobu 4 – 5 dní. *Ophiostoma piliferum* kolonizovala živcové kanáliky najlepšie. Po tejto dobe huby boli schopné odstrániť až 70 – 99.9 % extraktívnych látok. Substrát bol následne sterilizovaný a naočkovaný jedlými hubami, ktoré dosahovali výnos porovnateľných so substrátmi z pilín tvrdších drevín, ktoré sú bežne využívané v komerčnej sfére.

Dorano et al. (2000) dokázali odstrániť až 90 % z väčšiny lipofilických extraktívov za použitia *Bjerkandera sp.* and *Trametes versicolor*. Takisto Van Beek et al. (2007) preukázali, že použitím huby *Trametes versicolor* počas 4 týždňového ošetrovania pilín *Picea sitchensis* je možné odstrániť 40 % živých kyselín a 100 % redukcia triglyceridov.

Martinez-Inigo et al. (1999) poukazujú na fakt, že extraktívne látky neošetrených pilín ihličnatej dreviny *Pinus sylvestris* sú toxické pre viaceré huby bielej hniloby.

4.1.6 Fugát

Jednou z vhodných metód spracovania tekutých a pevných organických odpadov je proces anaeróbnej fermentácie, pretože je spojený s produkciou energie a redukciou znečistenia (Fezzani and Cheikh, 2008). (Abubaker et al., 2012) potvrdili, že po aplikácii nerozložiteľného zbytku z procesu anaeróbnej digestie (digestátu) na pôdu došlo ku zvýšeniu mikrobiologickej aktivity pôdy a celkovo mala aplikácia priaznivejší vplyv na mikrobiálnu aktivitu a výnos ako minerálne hnojivá.

Procesom anaeróbnej fermentácie sa menia niektoré vlastnosti vstupného materiálu, stúpa podiel amoniaku vo fermentačnom zbytku a dochádza ku zvýšeniu hodnoty pH, ktorá sa pohybuje okolo 8. Obsah ďalších živín ako fosfor, vápnik, draslík a horčík nie sú biologickým procesom pozmenené. Obsah síry je redukovaný. Tepelné ošetrenie a zdržanie vo fermentačnom procese obmedzuje klíčivosť semien rastlín a aktivitu patogénov (Schattauer and Weiland, 2006). Fugát je hnojivo pochádzajúce z anaeróbnej digestie v bioplynnej stanici, ktoré obsahuje organické látky a minerálne živiny. Má len mierny zápach, alebo v ideálnom prípade nezapácha vôbec (Schievano et al., 2009). Fugát je mechanicky odseparovaný digestát a vzniká zriedený roztok obsahujúci celé spektrum živín v prijateľnej forme pre rastliny. Fugát je charakteristický svojím nízkym obsahom sušiny, ktorá sa pohybuje v rozmedzí 0,8 % – 4 % a je možné ho aplikovať ako kvapalné hnojivo (Kolář et al., 2010). Dusík je predovšetkým obsiahnutý v minerálnej forme, takže je rastlinám prístupný. Kvôli vysokému obsahu vody sú koncentrácie živín v pôvodnej hmote nízke a obsah prístupného dusíka sa v kvapalnom fugáte pohybuje v rozmedzí 0,15 – 0,3 %, obsah draslíku je obdobný a obsah ďalších živín je významne nižší (Kolář et al., 2009).

4.2 Kultivácia vybraných druhov jedlých a liečivých húb

V práci boli použité huby bielej hniloby, schopné produkovať ligninolytické enzýmy a efektívne rozkladať lignín obsahujúci substrát. Ten bol v tomto prípade tvorený fermentovanými smrekovými pilinami.

4.2.1 Mykologická charakteristika *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm, český názov *Hlíva ústříčná*, slovenský názov *Hlíva ustricová*

Klobúk má priemer 50 – 150 mm, niekedy až 350 mm, je mäsitý, v mladosti na okrajoch úzko vlnitý, neskoršie rozložený, šedej až hnedej farby, niekedy modročierny, na povrchu je hladký a suchý. Dužina je pomerne hrubá, belavá, príjemnej vône a chuti. Lupene sú belavé, dosť riedke, celokrajné, zbiehajúce sa na hlúbik. Hlúbik je dlhý 15 – 50 mm, hrubý 18 – 20 mm, obyčajne silno excentrický až postranný, hladký alebo pozdĺžne ryhovaný. Výtrusy sú valcovité, hladké a bezfarebné (Jablonský a Šašek, 2006).



Obrázok 2 - *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm. (Foto: Jablonský)

Pleurotus ostreatus takisto nazývaná „hiratake“ alebo „houbitake“ (Mizuno and Zhuang, 1995; Rühl et al. 2008). Vo voľnej prírode sa vyskytuje na listnatých stromoch počas jari a jesene (bavlník, buk, dub, javor, breza, vrba, topoľ a jelša). Jedná sa o kozmopolitný druh. Z evolučného hľadiska sa jedná o veľmi úspešnú hubu, pretože dokáže rásť na širokom spektre drevín. Napriek tomu, že ju možno nájsť na umierajúcom dreve, kde sa správa ako saprotrof, môže sa za vhodných podmienok správať aj ako fakultatívny parazit (Stamets, 1996). Kultivuje sa na rôznych druhoch ligninocelulózového substrátu, napríklad: kávová dreň, piliny, kakaové škrupiny, arašidové a kokosové škrupiny, obaly semien bavlníka, drevo, slama, tráva, kukuričné klasy atď. (Sánchez, 2010). Je druhou najviac komerčne pestovanou hubou po *Agaricus bisporus*. Hlavnými dôvodmi sú chuť, medicínske využitie a výživová hodnota (Tesfaw, 2015). Jej produkcia je celosvetovo tak vysoká, pretože je schopná rásť v širokom rozpätí teplôt a plodiť počas celého roka. *Pleurotus ostreatus* nie je náročná na rastové podmienky, plodnice huby sú málokedy napadané chorobami alebo škodcami a môžu byť

produkované relatívne jednoduchou a ekonomicky výhodnou technológiou. Vyžaduje krátku dobu pre vyplodenie v porovnaní s ostatnými druhmi jedlých húb (Bhattacharjya, 2014).

4.2.2 Intenzívne pestovanie *Pleurotus ostreatus*

V modernej produkcii húb sa používajú zmesi rôznych materiálov. Napríklad zmes obalov zo semien bavlníka zmiešané s pšeničnou slamou majú schopnosť nasat' vodu vo väčšom objeme, akoby to bolo len pri samotných obaloch zo semien bavlníka. Vo väčšine prípadov sa používa iba pasterizácia substrátu pri teplote 60 – 70 °C po dobu 6 – 10 hodín, ktorá je vykonaná parou počas procesu premiešavania zmesi s vodou v miešačke (Royse, 2007). Pestovatelia sa usilovali o optimalizovanie množstva použitého inokula k naočkovaniu substrátu. Navýšenie použitého množstva inokula (až do 5 % vlhkej váhy substrátu) znamenalo navýšenie následnej úrody plodníc (Royse, 2002). Pasterizovaný substrát je následne plnený do 12 – 15 kg čírych alebo čiernych plastových vreciek. Po inkubácii sú vrecká presunuté do produkčnej komory s udržiavanými podmienkami vhodnými pre fruktifikáciu (Sánchez, 2010).

Inkubácia	Teplota: 24 °C Relatívna vlhkosť: 85 – 95 % Doba: 12 – 21 dní CO ₂ : 5 000 – 20 000 ppm Výmena čerstvého vzduchu za hodinu: 1x Svetelné nároky: Žiadne
Iniciácia primordií	Teplota: 10 – 15,6 °C Relatívna vlhkosť: 95 – 100 % Doba: 3 – 5 dní CO ₂ : < 1000 ppm Výmena čerstvého vzduchu za hodinu: 4 – 8x Svetelné nároky: 1 000 – 1 500 lux
Vývoj plodnice	Teplota: 10 – 21 °C Relatívna vlhkosť: 85 – 90 % Doba: 4 – 7 dní CO ₂ : < 1000 ppm Výmena čerstvého vzduchu za hodinu: 4 – 8x Svetelné nároky: 1 000 – 1 500 lux
Úrodové cykly	3 – 4 cykly, 7 – 14 dní medzi úrodami, dĺžka 45 – 55 dní

Tabuľka 3 - Rastové parametre pre *Pleurotus ostreatus* (Stamets, 1996)

4.2.3 Mykologická charakteristika *Pleurotus eryngii* (DC.) Quél., český názov *Hlíva máčková*, slovenský názov *Hlíva kotúčová*

Klobúk plodnice dosahuje priemer 3 – 12 cm. Na rozdiel od ostatných druhov rodu *Pleurotus* má klobúk síce menší priemer, ale hrúbka dužiny je 10 – 15 mm. Mladé plodnice spočiatku majú mierne podvihnuté okraje a v dospelosti získavajú lievikovitý tvar. Hlúbik je dlhý 3 – 10 cm, umiestnený stredovo, silný. Má jemnú dužinu na rozdiel od drene ostatných *Pleurotus* a lahodnú sladkú chuť. Lamely sú riedko umiestnené, tenké, šedej farby. Plodnice rastú jednotlivo alebo v malých trsoch. Vypestované plodnice dosahujú väčších rozmerov ako plodnice nájdené v prírode (Jablonský a Šašek, 2006).



Obrázok 3 - *Pleurotus eryngii* (DC.) Quél. (Foto: Jablonský)

Je pomenovaná po rastline *Eryngium campestre* (český názov *Máčka ladní*, slovenský názov *Kotúč poľný*) z čeľade mrkvovitých, na ktorej odumretom dreve parazituje vo voľnej prírode. *Pleurotus eryngii* je trhovovo perspektívnym druhom ako delikátna jedlá huba s chrumkavou textúrou, vysokou výživovou hodnotou a mandľovou chuťou, pričom je čím ďalej, tým viac populárnou u spotrebiteľov. Dopyt po nej narastá v Európe aj v Ázii (Dai, 2014). Vo voľnej prírode sa vyskytuje v Južnej Európe, Severnej Amerike a Centrálnej Ázii (Stamets, 1996). *Pleurotus eryngii* je momentálne najviac pestovanou hubou v Južnej Kórei, Číne a Japonsku (Im et al., 2013). *Pleurotus eryngii* je typickou saprotrofickou hubou rozkladajúcou celulózu a lignín počas jej rastu a vývoja. Slama z rôznych druhov plodín (pšenica, ryža), odpad z lesníctva (piliny), odpady z potravinárskeho priemyslu (očistené kukuričné klasy, pšeničné otruby, obaly zo semien bavlníka) sa využívajú na jej pestovanie (Dai, 2014). Extenzívnym spôsobom kultivácie je vonkajšia kultivácia na vertikálne otočených kmeňoch tvrdého dreva. Relatívne ľahko sa dá pestovať na nahromadenej slame vo vonkajších podmienkach. Niektoré kmene sú schopné rásť na dreve ihličnanov. Má výborné skladovacie vlastnosti, pričom na policiach v obchodoch vydrží v dobrom stave dlhšie ako väčšina iných komerčne pestovaných húb. Oproti iným druhom z rodu *Pleurotus* má výrazne menej spór (Stamets, 1996).

4.2.4 Intenzívne pestovanie *Pleurotus eryngii*

S uprednostnením na použitie pilín tvrdého dreva je táto huba relatívne jednoduchá na kultiváciu. I keď rastie na slame obilnín (napr. pšenica), úrody nie sú tak hojné ako pri *Pleurotus ostreatus*. Okrem prípadu, ak sú pri použití toho istého substrátu s rovnakým pomerom inokula,

dodané prídavky (napr. otruby). Vhodným materiálom pre substrát je väčšina tvrdých drevín, pšeničná slama a obaly zo semien bavlníka alebo pšeničné otruby podporujú tvorbu plodníc. Táto huba nie je tak adaptívna k širokému spektru substrátov ako *Pleurotus ostreatus*. Ak je pestovaná na pšeničnej slame, prídavok 5 – 10 % obalov zo semien bavlníka má najväčší efekt v navýšení úrody (Stamets, 1996). Substrát sa sterilizuje a zvyčajne plní do 1 – 1,5 kg polypropylénových vreciek alebo kontajnerov. Túto hubu nie je vhodné pestovať v blokoch alebo veľkoobjemových vreciach. *Pleurotus eryngii* je náročná na navodzovanie podmienok pre tvorbu plodníc a preto nie je jednoduché dosiahnuť spoľahlivého výnosu. Dôležitou súčasťou rastovej komory je automaticky regulovateľná výmena vzduchu (Jablonský a Šašek, 2006).

Inkubácia	Teplota: 24 °C Relatívna vlhkosť ovzdušia: 90 – 95 % Doba: 12 – 16 dní CO ₂ : 5 000 – 20 000 ppm Výmena čerstvého vzduchu za hodinu: 1x Svetelné nároky: Žiadne
Iniciácia primordií	Teplota: 10 – 15 °C Relatívna vlhkosť: 95 – 100 % Doba: 4 – 5 dní CO ₂ : < 500 – 1 000 ppm Výmena čerstvého vzduchu za hodinu: 4 – 8x Svetelné nároky: 500 – 1 000 lux
Vývoj plodnice	Teplota: 15 – 21 °C Relatívna vlhkosť: 85 – 90 % Doba: 4 – 8 dní CO ₂ : < 2 000 ppm Výmena čerstvého vzduchu za hodinu: 4 – 5x Svetelné nároky: 500 – 1 000 lux
Úrodové cykly	Dĺžka: 45 dní, 14 dní medzi úrodami

Tabuľka 4 - Rastové parametre pre *Pleurotus eryngii* (Stamets, 1996)

4.2.5 Mykologická charakteristika *Hericium erinaceus* (Bull.) Pers., český názov *Korálovec ježatý*, slovenský názov *Koralovec ježovitý*

Plodnica nie je rozlíšená na klobúk a hlúbik (ten je iba rudimentárny), je koralovito rozvetvená, často guľová. V priemere má 5 – 30 cm, na povrchu sú ostne dlhé 3 – 6 cm nesúce hymenium s bazídiami a bazidiospórami. Rúško pokrýva mäkký povrch ostňov. Plodnice majú v dobe zrelosti bielu farbu, ktorá sa postupne mení na hnedožltú a neskoršie hnedú (Jablonský a Šašek, 2006).



Obrázok 4 - *Hericium erinaceus* (Bull.) Pers. (Foto: Jablonský)

Huba pochádza z Číny a je laicky nazývaná „opičia hlava“. Jej chuť pripomína homára. Je známou jedlou hubou hlavne v Európe a v oblasti Orientu, avšak v Európe je problém ju nájsť v komerčnej sfére. Pri ponuke tejto huby môže nastať problém s marketingom, nakoľko nie veľa spotrebiteľov ju pozná a je nedostatočne spropagovaná (Oei, 2016). Je rozšírená v Severnej Amerike, Európe, Číne a v Japonsku. Vo voľnej prírode rastie na zomierajúcich alebo umretých bukoch, orechoch, duboch a javoroch. Rastie hlavne na kmeňoch alebo pňoch. Hlavným problémom pri predaji huby je jej vysoký obsah vody a biela farba, takže pri prípadnom poškodení sú pomliaždeniny zreteľne viditeľné. Ak sa hnedé pomliaždeniny vyskytnú, tak sa stávajú ložiskom bakteriálnych ochorení, ktoré sa následne šíria po zvyšku zdravej huby (Stamets, 1996).

4.2.6 Intenzívne pestovanie *Hericium erinaceus*

Pre substrát na pestovanie sa môžu použiť objemné materiály ako piliny, cukrová trstina, kukuričné vretená, zbytky z alkoholových destilérií, obaly zo semien bavlníka a nasekanej slame. Najčastejšie používanou receptúrou je zmes: 78 % pilín pochádzajúcich z tvrdého dreva,

20 % ryžových otrúb, 1 % sacharózy, 1 % sadry. Vlhkosť substrátu by sa mala pohybovať okolo 65%. Substrát sa zvyčajne plní do 1 kg plastových vreciek alebo 500ml nádob, ktoré sú následne sterilizované. Ako inokulum sa používa zrnitá sadba alebo sadba z pilín. Pri pestovaní sa môžu objaviť deformácie plodníc, ktorých hlavnou príčinou je zvýšená koncentrácia CO₂ v ovzduší (Oei, 2016).

Inkubácia	Teplota: 21 – 24 °C Relatívna vlhkosť ovzdušia: 95 – 100 % Doba: 10 – 14 dní CO ₂ : > 5 000 – 40 000 ppm Výmena čerstvého vzduchu za hodinu: 0 – 1x Svetelné nároky: Žiadne
Iniciácia primordií	Teplota: 10 – 15,6 °C Relatívna vlhkosť ovzdušia: 95 – 100 % Doba: 3 – 5 dní CO ₂ : 500 – 700 ppm Výmena čerstvého vzduchu za hodinu: 5 – 8x Svetelné nároky: 500 – 1 000 lux
Vývoj plodnice	Teplota: 18 – 24 °C Relatívna vlhkosť ovzdušia: (85) 90 – 95 % Doba: 4 – 5 dní CO ₂ : 500 – 1 000 ppm Výmena čerstvého vzduchu za hodinu: 5 – 8x Svetelné nároky: 500 – 1 000 lux
Úrodové cykly	14 dní medzi úrodami

Tabuľka 5 - Rastové parametre pre *Hericium erinaceus* (Stamets, 1996)

4.2.7 Mykologická charakteristika *Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Carst, český názov Lesklokorka lesklá, slovenský názov Lesklokôrovka obyčajná

Ganoderma lucidum vytvára plodnice s polkruhovým, obličkovitým klobúkom a excentrickým hlúbikom, niekedy bez hlúbiku, bokom prirastené k substrátu. Klobúk o priemere 60 – 120 mm je mierne klenutý, pokrytý lakovou vrstvou žltohnedej, purpurovej až tmavohnedej farby s tupým alebo zvlneným okrajom. Hlúbik je štíhly, dlhý 50 – 150 mm, o hrúbke 10 – 20 mm, excentrický alebo bočný, tmavo gaštanovo hnedý. Póry sú dlhé

5 – 20 mm, najskôr belavé, neskôr krémové, v dospelosti hnedé. Dužina je najskôr žltohnedá, neskôr hnedá, na lome plstnatá, korkovej konzistencie a nepríjemnej múčnej chuti. Vôňa dužiny je zatuchnutá. Výtrusný prach je svetlo hnedý, výtrusy sú vajcovité. Okrem pohlavných spór – bazidiospor vytvára aj vegetatívne spóry – mikrokonídie (Jablonský a Šašek, 2006).



Obrázok 5 - *Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Carst. (Foto: Jablonský)

Huba mnohých mien, ktorá bola používaná v medicíne po storočia. V Japonsku sa nazýva „Reishi“ alebo „Mannentake“, v Číne a Kórei „Ling Chi“. Jedná sa o lesklú chorošovitú hubu s červenou farbou plodníc, ktorých tvar pripomína obličky. Je známa pre svoje liečivé účinky, v Číne dokonca verili, že špeciálna tinktúra rozotretá po hrudi mŕtveho ho môže priviesť naspäť na svet. Záznamy o používaní tejto huby v liečiteľstve sú staré viac ako 2 000 rokov. Väčšinou sa huba namelie a používa sa namletý prášok (napr. káva), nakoľko pre prípravu pokrmov a priame požívanie *Ganoderma* nie je príliš vhodná, kvôli svojej konzistencii a nahorklosti (Stamets, 1996). *Ganoderma lucidum* parazituje na stromoch, ktoré môže poškodiť (Oei, 2016). Pre extrakciu bioaktívnych polysacharidov β -D glukanov sa využíva submerzná kultivácia, zväčša na sterilizovanom zemiakovom médiu (Habijanec et al., 2015). Vysoký obsah CO_2 môže ovplyvniť rast primordií, pričom následne sa plodnice nemusia diferencovať (Stamets, 1996).

4.2.8 Intenzívne pestovanie *Ganoderma lucidum*

Hlavným substrátom sú piliny z rôznych širokolistých drevín. Základ substrátu tvorí 75 % jemných bukových pilín, 25 % hrubých topoľových pilín, pričom sa môžu použiť piliny rôznych širokolistých drevín. Piliny sa obohacujú rôznymi šrotmi a múčkami, z ktorých sa najviac osvedčila pšeničná múka, pšeničné alebo ryžové otruby. Otruby zvyšujú zadržiavanie vody substrátom a obsah tiamínu, ktorý podporuje tvorbu plodníc. Prídavok sadry

alebo vápenca neutralizuje kyseliny tvorené kultúrou huby a podporuje diferenciaciu plodníc. pH by sa malo pohybovať v rozmedzí 4,2 – 5,3. Substrát sa následne plní do 1,5 – 2 kg plastových vreciek a nechá sa sterilizovať (Jablonský a Šašek, 2006).

Inkubácia	Teplota: 21 – 27 °C Relatívna vlhkosť ovzdušia: 95 – 100 % Doba: 10 – 20 dní CO ₂ : toleruje do 50 000 ppm alebo 5 % Výmena čerstvého vzduchu za hodinu: 0 – 1x Svetelné nároky: Žiadne
Iniciácia primordíí (tzv. parohy)	Teplota: 18 – 24 °C Relatívna vlhkosť ovzdušia: 95 – 100 % Doba: 14 – 28 dní CO ₂ : 20 000 – 40 000 ppm Výmena čerstvého vzduchu za hodinu: 0 – 1x Svetelné nároky: 4 – 8 hodín 200 – 500 lux
Iniciácia primordíí (tzv. obličky)	Teplota: 21 – 27 °C Relatívna vlhkosť ovzdušia: 95 – 100 % Doba: 14 – 28 dní CO ₂ : 5 000 – 20 000 ppm Výmena čerstvého vzduchu za hodinu: Podľa potreby udržania vhodnej koncentrácie CO ₂ Svetelné nároky: 12 hodín 500 – 1 000 lux
Vývoj plodnice	Teplota: 21 – 27 °C Relatívna vlhkosť ovzdušia: 90 – 95 % Doba: 60 dní CO ₂ : < 2 000 ppm Výmena čerstvého vzduchu za hodinu: Podľa potreby udržania vhodnej koncentrácie CO ₂ Svetelné nároky: 12 hodín 750 – 1500 lux
Úrodové cykly	Dve úrody v 90 – 120 dní

Tabuľka 6 - Rastové parametre pre *Ganoderma lucidum* (Stamets, 1996)

4.3 Medicínske účinky liečivých a jedlých húb

Huby boli podrobne študované pre ich výživové vlastnosti a takisto aj pre ich liečivé účinky (Zhao et al., 2003). Veľké množstvo zlúčenín ako lecitín, polysacharidy,

polysacharid-peptidy a polysacharid-proteinové komplexy boli izolované z húb a mnoho z týchto zlúčenín má zároveň aj imunologické a protirakovinové účinky (Wang et al., 2000; Wasser and Weis, 1999). Tieto zlúčeniny sa nazývajú modifikátormi biologickej odozvy (biological response modifier alebo BRM). Sú to látky, ktoré nepoškodzujú a nadbytočne nestresujú organizmus, ale pomáhajú mu adaptovať sa na biologický a okolitý stres. Počas predošlých 40 rokov, sa používa mnoho polysacharidov a polysacharid-proteinových komplexov u liečivých húb ako hlavný zdroj terapeutických prípravkov poskytujúcich imunologické a protinádorové vlastnosti. Režimy účinku týchto zlúčenín stále nie sú známe, ale napriek tomu sú používané pre navýšenie bunkových komponentov imunitného systému (Sarangi et al., 2006). Stimulácia špecifického imunitného systému bioaktívnymi polymérmi z liečivých húb má významný efekt na dospievanie, diferenciáciu a proliferáciu viacerých typov imunitných buniek špecifickej imunity, a tým pádom sa môžu správať ako protinádorové zlúčeniny. Sú jedným z najväčších nevyužitých zdrojov so silným farmaceutickým potenciálom (Wasser, 2002). Približne 50 druhov húb má potenciál pre vyťaženie imúnne aktívnych látok, ktoré preukázali protinádorovú aktivitu. Najmenej šesť polysacharidov: Lentinan, Schizophyllan, polysacharid-K (PSK), polysacharid-P (PSP), „Active Herose Correlated Compounds (AHCC) a Maitake (frakcia D) bolo preskúmaných na rakovine vyskytujúcej sa u ľudí (Kidd, 2000). Vo všeobecnosti, bunková stena väčšiny húb pozostáva z piatich hlavných komponentov: (1→3)-β-D glukán, (1→6)-β-D glukán, chitín a glykoproteíny. β glukán vytvára 9 – 46 % hmoty bunkovej steny (Novák and Vetvička, 2008; Chan et al., 2009).

Liečivé účinky *Pleurotus ostreatus* akými sú napríklad protirakovinové aktivity, imunomodulárne efekty, protivírusové, antibiotické, protizápalové a cholesterol znižujúce aktivity, sú celosvetovo známe. Bolo zaznamenané, že vodný extrakt z plodníc a mycélia tohto druhu hrá rolu v navýšení produkcie reaktívnych foriem kyslíku z neutrofilných granulocytov, ktoré majú imunomodulačné vlastnosti zahŕňajúce všetky imuno kompetitívne bunky (Shamtsyan, 2004).

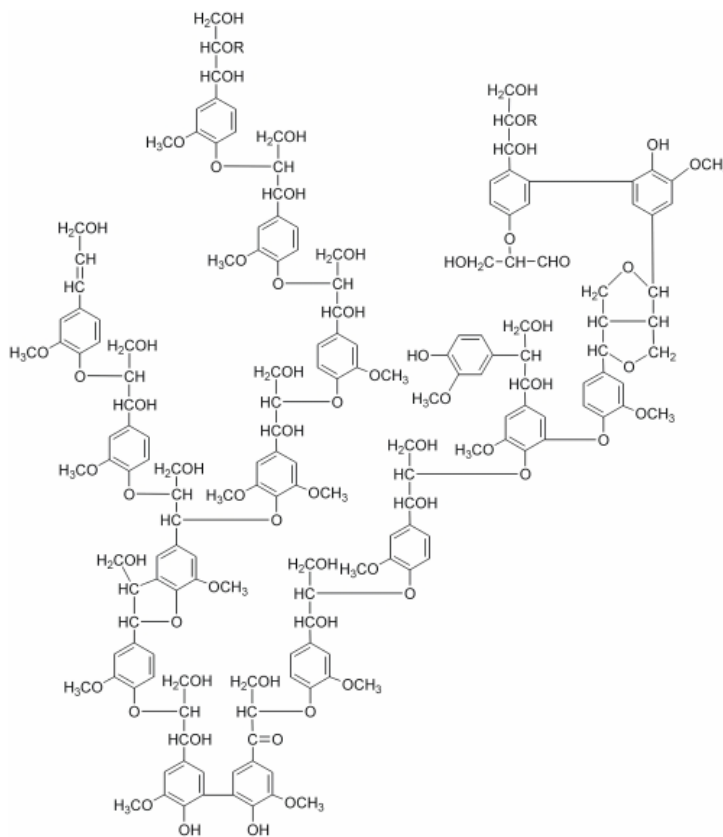
Extrakt z *Ganoderma lucidum* boli veľmi prospešné v liečení mnohých ľudských chorôb od mikrobiologických infekcií po vírusové ochorenia ako napríklad HIV vďaka svojim imunomodulárnym vlastnosťami, liečenie zhubných nádorov pri rakovine pľúc alebo zlyhaní obehového systému (Patel et al., 2012). Mnoho štúdií preukázalo, že polysacharidy *Ganoderma lucidum* (hlavne β-D glukany) môžu modulovať funkcie mnoho komponentov imunitného systému ako antigén prezentujúce bunky, T a B lymfocyty, NK bunky, neutrofilné granulocyty,

dendritické bunky a produkciu cytokinínu (Habijanec et al., 2015). Momentálna hodnota trhu s touto liečivou hubou činí 2,5 mld.\$ (Bishop et al., 2015).

Mycélium a plodnice *Hericium erinaceus* obsahujú mnoho bioaktívnych zlúčenín s liečivým účinkom. Najnovšie poznatky ukázali, že táto huba je nápomocná pri liečení viacerých ochorení ako sú Alzheimer, mnoho typov rakovín a takisto má aj imunoregulačné schopnosti (Jiang, 2014).

4.4 Lignín

Je druhý najrozšírenejší biopolymér na Zemi. Tento zložitý fenylypropanový heteropolymér premenlivého zloženia je jediný prírodne syntetizovaný polymér s aromatickými alkoholmi. Vo všeobecnosti pozostáva z troch aromatických prekursorov – p-kumarylalkohol, sinapylalkohol a koniferylalkohol (Wei et al., 2009). Tieto prekurzory formujú guaiacyl- (G), syringyl- (S) a p-hydroxyferyl (H) podjednotky hlavne v molekule lignínu (Martinez, 2005). Vzhľadom k značnej zložitosti molekuly lignínu je zložitá určiť jeho presnú chemickú štruktúru a molekulovú hmotnosť. Takisto izolácia natívneho lignínu je veľmi komplikovaná. Biodegradácia lignínu predstavuje kľúčový krok v kolobehu uhlíka v prírode (Šušla a Svobodová, 2006).



Obrázok 6 - Štruktúra lignínu (Stiborová et al., 1999)

4.5 Ligninolytické huby a ich význam

Ligninolytické huby, takisto nazývané ako „huby bielej hniloby“ alebo drevokazné huby, sú skupinou hubovitých organizmov (z veľkej časti bazidiomycety) schopné degradovať rekalcitrantný polymér lignín. V angličtine sú označované ako „White rot fungi“. Schopnosť odbúravať lignín im umožňuje, na rozdiel od iných organizmov, získavať energiu z ostatných polysacharidov zabudovaných v ligninocelulóзовých substrátoch chránených lignínom. Samostatné odbúravanie im neprináša žiaden energetický zisk (Pointing, 2001; Singer et al. 2002). Mnoho húb bielej hniloby zároveň rozkladá lignín, hemicelulózu a celulózu, pričom iné druhy sú selektívnejšie a rozkladajú primárne lignín. Napríklad *Ceriporiopsis subvermispota*, *Phlebia spp.*, *Physisporinus rivulosus* a *Dichomitus squalens* selektívne rozkladajú lignín. *Trametes versicolor*, *Heterobasidium annosum*, *Phanerochaete chrysosporium* a *Irpex lacteus* zároveň rozkladajú všetky časti bunkovej steny rastlín. Selektívne degradujúce huby majú významný potenciál v biotechnologických aplikáciách, kde je potrebné odstrániť lignín pre získanie neporušenej celulózy ako napríklad „bio-rozvlákňovacích“ procesoch a takisto pri procesoch, kde hlavným dôvodom je zabezpečenie nechránených sacharidov pre následné použitie, napríklad ako krmivo pre zvieratá alebo bio-palivo. Napríklad *C. subvermispota*, ktorá nemá celulózy, bola vybraná pre „bio-rozvlákňovacie“ procesy ako selektívny rozklad lignínu (Dashtban et al., 2010). Degradácia lignínu sa odohráva v rámci ich sekundárneho metabolizmu, a to pomocou produkcie tzv. lignín modifikujúcich enzýmov (lignin modifying enzymes – LME). Hlavnými LME u drevokazných húb sú:

- lignín peroxidáza (LiP, E.C. 1.11.1.14.),
- mangán-dependentná peroxidáza (MnP, E.C. 1.11.1.13.),
- lakáza (Lac, E.C. 1.10.3.2.),
- niekedy sa spomína aj mangán-independentná peroxidáza MiP (Pointing, 2001).

U niektorých rodov ligninolytických húb bola popísaná aktivita verzatilnej peroxidázy (VP) (EC 1.11.1.16) (Martinez, 2002).

Najviac preštudovanou drevokaznou hubou je *Phanerochaete chrysosporium*, ktorá produkuje množstvo isoenzýmov lignín peroxidázy a mangán peroxidázy, ale neprodukuje lakázu. Mnoho iných húb bielej hniloby produkuje lakázu navyše k mangán a lignín peroxidázam v rôznych kombináciách. Na základe vzorových radov produkovaných enzýmami možno huby bielej hniloby zaradiť do troch skupín:

1. Lignín – mangán peroxidáza (napr. *Phanerochaete chrysosporium* a *Phlebia radiata*). *Phanerochaete chrysosporium* je veľmi efektívna pri degradácii lignínu a niektoré kmene tejto huby sú lignín selektívne, čo napomáha procesu biologického rozvlákňovania. Bielidlo v čističke odpadových vôd je možné nahradiť hubami, ktoré budú schopné vybieliť zmes na produkciu papiera.
2. Mangán peroxidáza – lakáza (napr. *Dichomius squalens* a *Rigidoporus lignosus*). Niektoré huby, ktoré sú schopné selektívne rozkladať lignín, zjavne neprodukujú lignín peroxidázu. Dôležitosť lignín peroxidázy bola prehodnotená v lignín degradačných procesoch. Avšak existuje mnoho dôvodov prečo je problém demonštrovať nejakú enzymatickú aktivitu LiP v niektorých hubách. Induktor môže byť veratryl alkohol a iné aromatické zlúčeniny, ktoré tvrdo regulujú produkciu rôznych enzýmov.
3. Lignín peroxidáza – lakáza (napr. *Phlebia ochraceofulva* a *Junghuhnia separabilima*). Huby, ktoré neprodukujú MnP sú neefektívnymi rozkladačmi lignínu na CO₂ (Hatakka, 1994).

4.6 Ligninolytické enzýmy

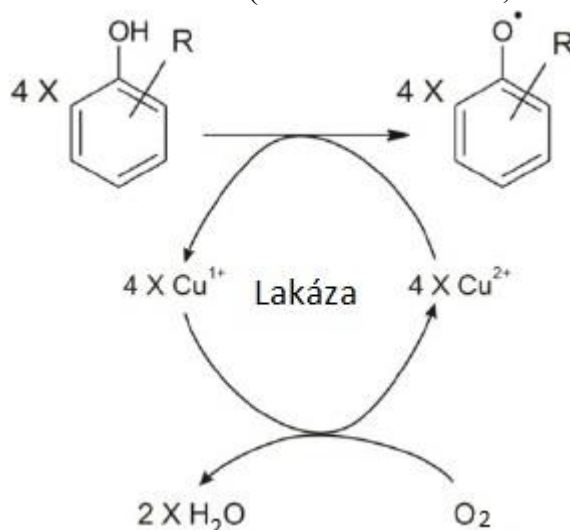
Medzi základné ligninolytické enzýmy húb bielej hniloby patria peroxidázy (lignín peroxidáza, mangán dependentná peroxidáza, verzatilná peroxidáza) a fenoxidáza lakáza (Hatakka, 1994; Šušla a Svobodová, 2006).

4.6.1 Lakáza

Lakáza (Lac) je súčasťou rastlín, mnohých húb (hlavne húb bielej hniloby), niektorých baktérii a hmyzu. Patrí do skupiny polyfenolických oxidáz obsahujúcich meď, ktoré katalyzujú štvorelektrónovú redukciu kyslíku na vodu. Lakáza ligninolytických húb obsahuje vo svojej molekule štyri atómy medi v oxidačnom stave ²⁺, ktoré sú rozmiestnené medzi tromi odlišnými väzbovými miestami. V katalytickom mechanizme enzýmu hrajú meďnaté ióny dôležitú úlohu (Baldrian, 2006; Gianfreda et al., 1999; Sharma et al., 2007).

Lakáza typicky obsahuje tri typy atómov medi, z ktorých jeden jej dáva charakteristickú modrú farbu. Podobné enzýmy, ktorým chýba atóm medi a sú zodpovedné za modrú farbu, sú nazývané „žlté“ alebo „biele“ lakázy. Avšak mnoho autorov nepovažuje tieto enzýmy za lakázy ako také. Lakáza predstavuje veľmi nešpecifický enzým o molekulovej hmotnosti v rozmedzí 60 – 70 kDa (Baldrian, 2006).

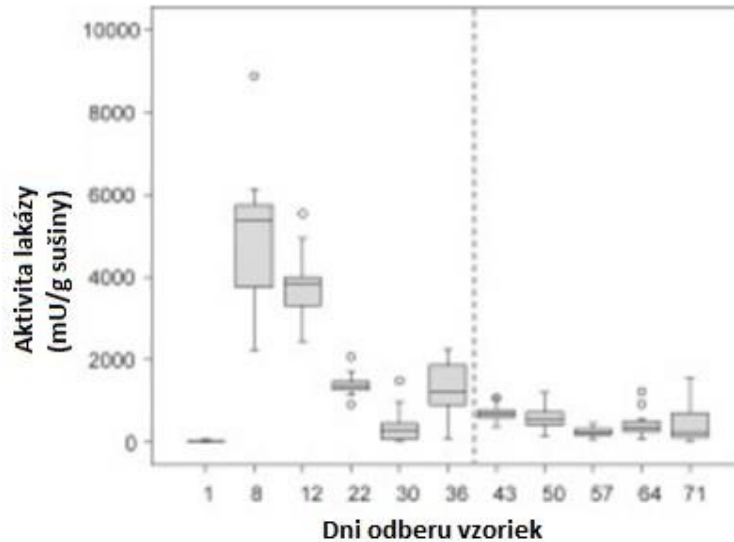
Oxiduje veľa odlišných zlúčenín, ako sú fenoly, polyfenoly, aromatické amíny a nefenolické organické substráty za vzniku reaktívnych radikálov, ktoré podliehajú ďalšej už neenzymatickej depolymerizácii, repolymerizácii alebo demetylácii. Okrem účasti lakázy pri degradácii lignínu zastáva tento enzým u húb aj ďalšie fyziologicky významné funkcie. Podieľa sa na sporulácii, detoxifikácii alebo tvorbe bunkového pigmentu. Lakáza je taktiež mnohými hubami produkovaná vo forme rôznych izoenzýmov. Sú to intracelulárne a extracelulárne enzýmy, ktoré sú vylučované do kultivačného média (Šušla a Svobodová, 2006).



Obrázok 7 - Všeobecný reakčný mechanizmus lakáz. Štyri monoelektrónové oxidácie sú katalizované zo substituovaného fenolického substrátu (R) tvoriaceho korešpondujúce voľné radikály. Elektróny sú následne transferované a uchované (za použitia štyroch atómov medi) medzi proteín a nakoniec transferované do molekuly kyslíka za produkcie dvoch molekúl vody (Enguita, 2011)

Viacero autorov (Baldrian and Gabriel, 2003; Velázquez-Cedeño et al., 2004; Savoie et al., 2007; Kurt and Buyukalaca, 2010; Ruiz-Rodríguez et al., 2011, Bánfi et al., 2015) uviedlo, že najvyššie hodnoty aktivity enzýmu lakázy boli pozorované na začiatku vegetatívneho rastu, 7 – 10 deň od inokulácie. V týchto štúdiách boli kultivované rôzne kmene *Pleurotus ostreatus* na blokoch pšeničnej slamy v rozmedzí hmotností 0.02 – 1 kg, ktoré boli buď sterilizované alebo pasterizované. Elisashvili et al. (2003) monitorovali produkciu lakázy pri troch úrodových cykloch, v dňoch 23. až 65., na 9 – 10 kg blokoch substrátu pochádzajúceho z odpadu produkcie bavlny. Maximálna aktivita bola pozorovaná pri tvorbe primordií a plodníc, počas všetkých troch úrodových cykloch, ale nebol sledovaný začiatok vegetatívneho štádia.

Bánfi et al. (2015) tvrdia, že je potrebné brať do úvahy mnohé faktory pri porovnávaní dát z rôznych štúdií. Kvalitu a zloženie substrátu, kmene aplikovaných húb a veľkosť kultivácie môžu byť rozdielne.



Graf 4 - Namerané hodnoty enzymatickej aktivity lakázy huby *Pleurotus ostreatus* v rôznom čase od inokulácie substrátu. Bodkovaná čiara rozdeľuje dva kultivačné cykly (Bánfi et al., 2015)

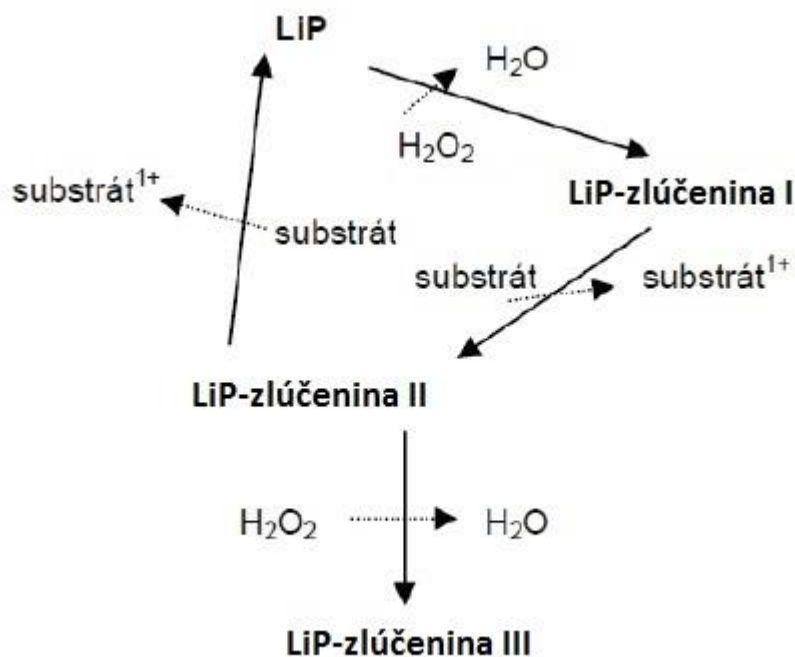
4.6.2 Lignínperoxidáza

Lignínperoxidáza (LiP) je hemoproteín obsahujúci glykoproteíny. Hrá dôležitú úlohu pri biodegradácii zložky bunkovej steny, lignínu (Piontek, 2001).

Lignínperoxidáza má molekulovú hmotnosť v rozmedzí 40 – 45 kDa. Jedná sa o zložený proteín obsahujúci molekulu hem. V prítomnosti endogénne vytváraného peroxidu vodíka katalyzuje oxidáciu nefenolických aromatických štruktúr lignínu za vzniku arylkationtových radikálov. Počas svojho katalytického cyklu (obrázok 3) je lignínperoxidáza oxidovaná H_2O_2 . Dochádza k odtrhnutiu dvoch elektrónov z jej molekuly a vzniká medziprodukt (Lip-zlúčenina I), ktorý potom oxiduje substrát odstránením jedného elektrónu za vzniku redukovanejšieho enzýmového medziproduktu (Lip-zlúčenina II). Tento medziprodukt potom oxiduje ďalšiu molekulu substrátu odbúraním jedného elektrónu, čím sa enzým vracia do svojho pôvodného stavu.

V prítomnosti nízkej koncentrácie substrátu a nadbytku H_2O_2 môže byť Lip-zlúčenina II vďaka svojej vysokej reaktivite s H_2O_2 premenená na neaktívnu formu enzýmu (Lip-zlúčenina III). Inaktiváciou enzýmu v nadbytku H_2O_2 bránia aromatické látky, napr. ako tryptofan

a veratrylalkohol. Pokiaľ sú tieto zlúčeniny s ochraňujúcim účinkom prítomné, stávajú sa pre zlúčeninu II vhodnejším substrátom a umožňujú dokončenie katalytického cyklu lignínperoxidázy (Šušla a Svobodová, 2006).



Obrázok 8 - Katalytický cyklus lignínperoxidázy (Šušla a Svobodová, 2006)

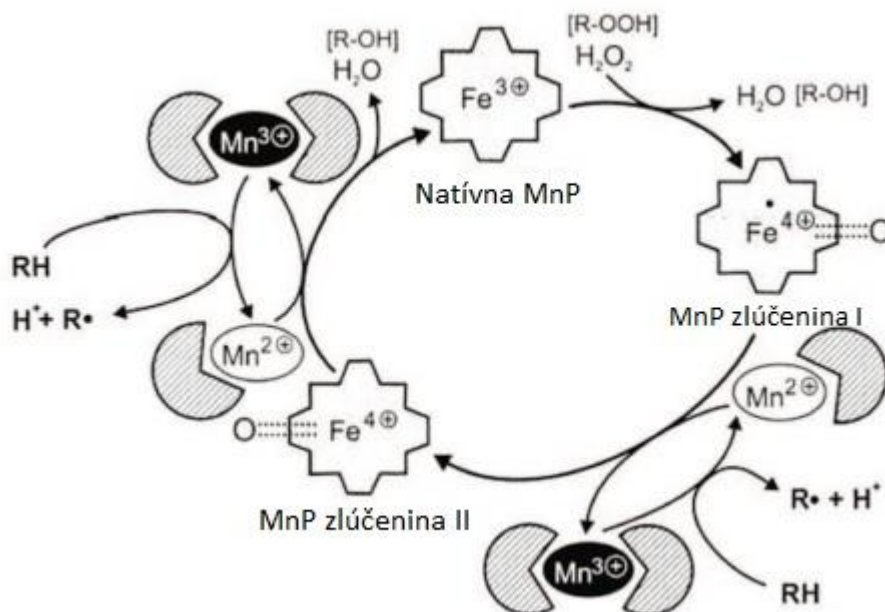
4.6.3 Mangán dependentná peroxidáza

Mangán dependentná peroxidáza (MnP) je extracelulárny glykoproteín a vylučovaný v mnohých izoformách, ktoré obsahujú jednu molekulu hem ako je protopofyrin IX (Asgher et al., 2008).

MnP katalyzuje peroxid dependentnú oxidáciu mangánu (II) (ako redukovaný substrát) na mangán (III), ktorý je následne vypustený z povrchu enzýmu do komplexu s oxalátom alebo inými chelátormi. Chelátovaný mangán (III) komplex vystupuje ako reaktant s nízkou molekulovou hmotnosťou, difúzny redox – mediátor fenolových substrátov počínajúc jednoduchými fenolmi, amínmi, farbivami, fenol lignín subštruktúrami a dimérmami (Wong, 2009; Wesenberg et al., 2003, Asgher et al., 2008).

Mangán dependentná peroxidáza je často produkovaná vo forme početných izoenzýmov, ktorých molekulová hmotnosť je 45 – 55kDa. Izoenzýmy MnP sa hlavne líšia v izoelektrických bodoch, ktoré sa skôr nachádzajú v kyslej oblasti (pH 3 – 4) Katalytický cyklus MnP (obrázok 4) je podobný ako u ostatných hemových peroxidáz. Zahrňuje ako natívnu formu enzýmu obsahujúcu kation Fe^{3+} , tak reaktívne medziprodukty (zlúčenina I, zlúčenina II). Na rozdiel

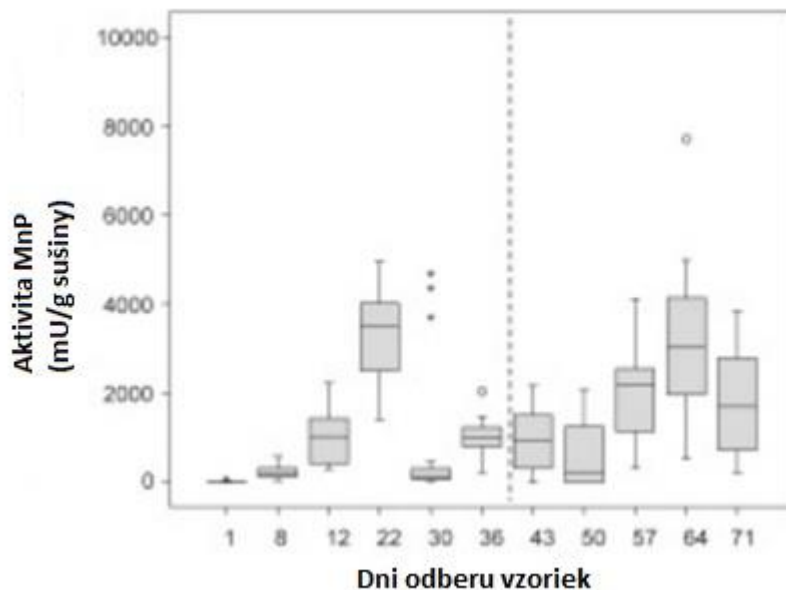
od iných peroxidáz preferuje MnP ako substrát Mn^{2+} . Kation Mn^{2+} vystupuje ako donor jedného elektrónu a je oxidovaný na Mn^{3+} . Reaktívne Mn^{3+} je stabilizované karboxylovými kyselinami (šťafeľová, malonová, mliečna). Vzniknuté cheláty môžu následne katalyzovať jednoelektrónovú oxidáciu rôznych substrátov (Šušla a Svobodová, 2006).



Obrázok 9 - Katalytický cyklus mangán dependentnej peroxidázy (Šušla a Svobodová, 2006)

Niektorí autori uvádzajú, že spoločne s poklesom aktivity lakázy sa začala aktivita MnP naopak navyšovať vo vegetatívnom štádiu, okolo 12. dňa od inokulácie. Najvyššia aktivita bola zaznamenaná pri tvorbe plodníc (Baldrian and Gabriel, 2003; Velázquez-Cedeño et al., 2004; Ruiz-Rodríguez et al., 2011). Naopak v štúdiu (Savoie et al., 2007) bola najvyššia aktivita pozorovaná hneď na začiatku vegetatívneho štádia, tak ako to je pri lakáze. Rühl et al. (2008) zaznamenali, že aktivita MnP sa simultálne menila s trendom lakázy počas celej doby pozorovania.

V štúdiu Baldrián & Gabriel (2003), kde iba vegetatívny rast bol pozorovaný je znázornené, že nastal rapidný pokles lakázy po prvých dvoch týždňoch a zároveň v tom istom období nastáva prvý nárast aktivity MnP (najvyššia pri dni 20. – 23.), pričom tieto aktivity sú nezávislé od tvorby plodníc.



Graf 5 - Namerané hodnoty enzymatickej aktivity mangán dependentnej peroxidázy huby *Pleurotus ostreatus* v rôznom čase od inokulácie substrátu. Bodkovaná čiara rozdeľuje dva kultivačné cykly (Bánfi et al., 2015)

4.6.4 Verzátlna peroxidáza

Verzátlna peroxidáza (VP) bola ako ligninolytický enzým prvýkrát popísaná u huby *Pleurotus eryngii* (Martinez et al., 1996). Neskôr bola prítomnosť VP popísaná takisto z ďalších druhov húb *Pleurotus* a *Bjerkandera* (Sarkar et al., 1997; Moreira et al. 2005).

VP je schopná katalyzovať ako redoxné reakcie typické pre LiP, t.j. oxidáciou nefenolických aromatických substrátov za vzniku aromatických radikálov, tak reakcie typické pre MnP, t.j. oxidácia Mn^{2+} na Mn^{3+} . Katalytické vlastnosti VP viedli k označeniu tohto enzýmu ako LiP-MnP hybrid. Hybridné vlastnosti VP boli potvrdené analýzou trojrozmerného modelu enzýmu, na ktorom boli nájdené štruktúry prítomné u MnP, tak aj u LiP. VP z *Pleurotus eryngii* má vyššiu afinitu na H_2O_2 a Mn^{2+} ako je tomu u peroxidáz huby *Phanerochaete chrysosporium* (Moreira et al., 2007).

4.6.5 Uplatnenie ligninolytických enzýmov v degradácii organických polutantov

Schopnosť húb bielej hniloby transformovať a mineralizovať široké spektrum organických polutantov bola popísaná v mnohých štúdiách (Pointing, 2001). Biodegradačných procesov sa vo väčšine prípadov zúčastňovali priamo ligninolytické enzýmy (Rabinovich et al., 2004).

U niektorých druhov drevokazných húb bolo zistené, že môžu rozkladať nebezpečné aromatické nitro zlúčeniny (Donnelly et al., 1997). Napríklad *Phanerochaete chrysosporium* bola schopná mineralizovať 2,4,6-trinitrotoluen (Paszynski and Crawford, 1995). Štúdie s purifikovanou MnP dokázali, že za degradáciu tejto explozívnej aromatickej zlúčeniny boli zodpovedné ligninolytické enzýmy (Scheibner and Hofrichter, 1998).

Ligninolytické enzýmy hub bielej hniloby sa priamo uplatňujú pri biodegradácii polychlorovaných bifenolov (PCB) (Paszynski and Crawford, 1995; Novotný, 1997). Dec a Bollag (1995) uvádzajú zapojenie enzýmu lakázy huby *Trametes versicolor* v dehalogenácii PCB.

Ligninolytické enzýmy hrajú dôležitú úlohu pri mineralizácii a degradácii polycyklických aromatických uhľovodíkov (PAU), ktoré svojou toxicitou a perzistenciou v životnom prostredí predstavujú vážny ekologický problém (Anderson and Henrysson, 1996). Purifikovaná MnP huby *Phanerochaete chrysosporium* dokázala efektívne oxidovať dvanásť rôznych PAU tvorených 3 – 6 aromatickými kruhmi (Bogan and Lamar, 1995).

Huby bielej hniloby sú často študovanými mikroorganizmami vďaka svojej schopnosti účinne degradovať syntetické farbivá (McMullan et al., 2001; Wesenberg et al., 2003).

Lignín peroxidázou *Phanerochaete chrysosporium* oxiduje rôzne sulfonové azo farbivá za vzniku benzochinónov a sulfofenyl hydroperoxidád (Chivukula, 1995).

V posledných rokoch bol vyvíjaný tlak na efektívne využívanie a zhodnotenie organických odpadov z poľnohospodárstva, lesníctva a potravinárskeho priemyslu ako surových materiálov a substrátov pre fermentáciu v pevnom skupenstve (Moldes et al., 2003; Risdianto et al., 2010). Navyše, väčšina týchto odpadov obsahuje lignín a/alebo celulózu alebo hemicelulózu, ktoré sa môžu správať ako induktory ligninolytickej aktivity. Väčšina týchto odpadov má vysoký obsah cukrov, čo napomáha ekonomickej stránke týchto procesov (Risdianto et al., 2010). Využitie týchto typov odpadov sa nájde nielen ako zdroj pre prípravu alternatívnych substrátov, ale takisto aj pri riešení problémov so znečistením životného prostredia (Moldes et al., 2003; Neifar et al. 2011). Fermentácia v pevnom skupenstve je považovaná za najlepšiu metódu pre kultúry filametózných húb a pre produkciu ligninolytických enzýmov, pretože rastú v podmienkach, ktoré napodobňujú ich prirodzené prostredie. To má za následok produkciu konkrétne enzýmov vo veľkom množstve, podobne ako je to pri vodou zaplavených fermentáciách (Kumar and Mishra, 2011; Neifar et al., 2011).

5 Materiál a metódy

5.1 Materiál

5.1.1 Agarové živné médium

Pre pokusy bol ako kultivačné médium použitý sladínový agar naliaty do Petriho misiek.

Sladínový agar 2 %

- 20 g agar
- 20 g sladina
- 1 000 ml destilovaná voda

Úprava hodnoty pH na 7.0 – 8.0 a následná sterilizácia média 20 minút pri teplote 121 °C

5.1.2 Sadba

Pre všetky pokusy v rámci tejto diplomovej práce bola použitá zrnitá sadba. Príprava sadby spočívala v prevarení pšeničných zŕn až do štádia napučania. Potom bola prepláchnutá studenou vodou a po odkvapkaní zmiešaná so sadrou. Pripravené zrná boli naplnené do sklenených 1 l fľaš do $\frac{3}{4}$ ich objemu. Fľaše boli uzavreté vatovými zátkami a prekryté alobalom. Následne boli fľaše sterilizované v autokláve pri teplote 121 °C po dobu dvoch hodín. Po prirodzenom vychladnutí boli naočkované za sterilných podmienok vo flowboxe medzikultúrou alebo agarovým bločkom príslušnej huby a pretrepané. Po naočkovaní boli fľaše ponechané v tme pri teplote 24 °C a 1 x za týždeň boli pretrepané. Prerastená a pripravená sadba bola skladovaná pri teplote 2 – 4 °C.

5.1.3 Použité huby

- *Pleurotus ostreatus* kmeň P35 zo zbierky fytopatogenných hub Výskumného ústavu rastlinnej výroby, v.v.i. Praha-Ruzyně
- *Pleurotus eryngii* kmeň Korea
- *Hericium erinaceus* CPPF 5087 zo zbierky fytopatogenných hub Výskumného ústavu rastlinnej výroby, v.v.i. Praha-Ruzyně
- *Ganoderma lucidum* kmeň GA2 pôvodom z Thajska

5.1.4 Použité nádoby pri kultivácií húb

V priebehu pokusov boli použité:

- Omnia poháre s objemom 700 ml – uzatvárané viečkami z hliníkovej fólie
- Sklenené skúmavky s priemerom 4 cm a výškou 23,5 cm - uzatvárané viečkami z hliníkovej fólie
- PP (polypropylénové) kýbliky o objeme 2 300 ml s výškou 15 cm a priemerom 13,4 cm – uzatvárané s PP viečkami s molitanovým filtrom

5.1.5 Substrátový materiál

Pri pokusoch boli použité bukové a smrekové piliny z píl Petrovice a Školního lesního podniku ČZU v Praze. Bukové piliny slúžili ako kontrola počas všetkých pokusov, nakoľko na základe literatúry je dokázané, že medzi pestovateľmi zo stredoeurópskeho klimatického pásma je to preferovaný drevný materiál. Je na ňom možné dosiahnuť stabilných výnosov pri pestovaní jedlých a liečivých húb.

Podľa (Croan, 2004) je možné ihličnaté piliny využiť na kultiváciu jedlých a liečivých húb, ale piliny musia prejsť určitou úpravou, aby boli zbavené extraktív ako sú živice a iné prchavé látky, do takej miery aby neboli toxické pre huby. Z tohto dôvodu boli smrekové piliny upravené pomocou fermentácie po rôznu dobu. Niektoré varianty (vid'. tab. 7) boli obohatené o fugát pochádzajúci z bioplynnej stanice Krásna Hora nad Vltavou. Vstupnými surovinami v tejto bioplynovej stanici sú kukuričná siláž, trávna senáž a kravská hnojovica.

Označenie	Materiál	Doba fermentácie (týždne)	Prídavok fugátu (% w/w)
SMREK	Smrekové piliny	0	0
BUK	Bukové piliny	0	0
B0	Smrekové piliny	0	0
B3	Smrekové piliny	3	0
B6	Smrekové piliny	6	0
B9	Smrekové piliny	9	0
F0	Smrekové piliny	0	5
F3	Smrekové piliny	3	5
F6	Smrekové piliny	6	5
F9	Smrekové piliny	9	5

Tabuľka 7 - Jednotlivé varianty substrátov používaných pri pokusoch

5.2 Metódy

5.2.1 Pokus - fermentácia smrekových pilín

Celkovo boli založené dve fermentácie na pracovisku KAVR v Červenom Újezde za účelom získania materiálu, ktorý bude po úprave vhodný pre kultiváciu jedlých a liečivých húb. Na každú fermentáciu bolo použitých približne 200 kg materiálu.

Vždy bola ako prvá stanovená vlhkosť smrekových pilín, odber bol vykonaný z viacerých miest za vzniku reprezentatívnych vzoriek a následným sušením pri 105 °C. Piliny boli doplnené o príslušné množstvo vody, pričom výsledná vlhkosť bola 50 % počas fermentácie. Piliny

s vodou boli miešané v miešačke, čím sa zabezpečilo rovnomerné prevlhčenie materiálu. Niektoré varianty boli obohatené o 5 % w/w fugátu. Materiál bol následne naplnený do špeciálne upravených sudov (10 ks.), cez ktoré je možné vhaňať vzduch s reguláciou tlaku. Sudy boli umiestnené vo vyhrievanej miestnosti s regulovanou teplotou 30 °C.

Prvá pokusná dávka fermentácie celkovo trvala 9 týždňov. Počas 3. a 6. týždňa boli dva sudy z každej varianty (s prídavkom a bez prídavku fugátu) odobraté. Ich obsah bol presypaný do plastových vriec, ktoré boli skladované pri teplote 4 °C až do následného použitia. Na konci fermentácie boli zvyšné sudy takisto presypané do plastových vriec a skladované pri teplote do 4 °C. Pri zakladaní, počas 3., 6. a 9. týždňa boli odobraté vzorky, ktoré boli následne analyzované. Druhá pokusná dávka fermentácie celkom trvala 6 týždňov u všetkých sudov. Ich obsah bol presypaný do plastových vriec, ktoré boli skladované pri teplote 4 °C až do následného použitia.

Počas obidvoch fermentácií sa dbalo na udržanie konštantnej vlhkosti (stanovenie vlhkosti pri 105 °C z každého sudu) substrátu pri aerácii. V prípade potreby bol materiál opätovne premiešaný v miešačke a doplnený o príslušné množstvo vody.

5.2.2 Pokus – sledovanie intenzity rastu jednotlivých jedlých a liečivých húb na bukových pilinách

Pokus bol založený za účelom zistenia intenzity rastu jednotlivých húb na kontrolnom substráte, čo boli bukové piliny. Na základe stanovenej vlhkosti bukových pilín pri 105 °C boli doplnené o príslušné množstvo vody, vlhkosť substrátu 68 %, ručne premiešané a naplnené do skúmaviek s priemerom 4 cm. Skúmavky boli uzatvorené hliníkovou fóliou a sterilizované po dobu 2 hod. v autokláve pri teplote 121 °C. Po vychladnutí sa skúmavky v sterilných podmienkach flowboxu zaočkovali na povrch substrátu zrnitou sadbou húb - *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus eryngii*, *Hericium erinaceus*, *Ganoderma lucidum*, z každej varianty boli pripravené 4 opakovania. Skúmavky boli inkubované pri teplote 24 °C bez potreby osvetlenia. Od naočkovania boli celkovo 3 x zmerané prírastky rastu mycélia od povrchu substrátu. Meranie bolo vykonané na 4 osách, ktoré boli načrtnuté na stene pohára a výsledok bol následne spriemerovaný (prírastok mycélia na deň). Dáta boli analyzované metódou rozptylu ANOVA.

5.2.3 Pokus – sledovanie intenzity rastu mycélia jedlých a liečivých húb na jednotlivých substrátoch

Použité huby:

- *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm kmeň P35 zo zbierky fytopatogenných húb Výskumného ústavu rastlinnej výroby, v.v.i. Praha-Ruzyně
- *Pleurotus eryngii* (DC.) Quél. kmeň *Korea*
- *Hericium erinaceus* (Bull.) Pers. CPPF 5087 zo zbierky fytopatogenných húb Výskumného ústavu rastlinnej výroby, v.v.i. Praha-Ruzyně
- *Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Carst kmeň GA2 pôvodom z Thajska

Použité varianty substrátov: SMREK, BUK, B3, B6, B9, F3, F6, F9 (viď tabuľka 7, str. 35).

Cieľom pokusu bolo zistiť, ktorá varianta substrátu je najvhodnejšia pre pestovanie vybraných jedlých a liečivých húb.

Pri sledovaní intenzity rastu mycélia boli použité OMNIA poháre o objeme 700 ml, uzatvárané hliníkovou fóliou. Prvým krokom bolo stanovenie sušiny pri 105 °C jednotlivých variant substrátu. Po následnom stanovení sušiny substrátu bola ich vlhkosť upravená na 68 %. Pripravené substráty boli rovnomerne plnené do OMNIA pohárov, cca. 2 cm od okraja tak aby vznikol priestor pre očkovací sadbu. Uzavreté poháre boli sterilizované po dobu 2 hod. v autokláve pri teplote 105 °C. Po vychladení boli poháre za sterilných podmienok zaočkované zrnitou sadbou na povrch substrátu príslušnými hubami. Zaočkované OMNIA poháre boli inkubované pri teplote 24 °C bez potreby osvetlenia. Od naočkovania boli celkovo 2 x zmerané prírastky rastu mycélia od povrchu substrátu. Meranie bolo vykonané na 4 osách, ktoré boli načrtnuté na stene pohára a výsledok bol následne spriemerovaný (prírastok mycélia na deň). Dáta boli analyzované metódou rozptylu ANOVA.

Pri pokuse sme skúmali 8 rôznych variant substrátu, 4 druhy húb po 4 opakovaníach. Celkovo bolo založených 128 ks. OMNIA pohárov za účelom sledovania intenzity rastu mycélia.

5.2.4 Pokus – sledovanie intenzity rastu mycélia jedlých a liečivých húb na vybraných substrátoch s 20 % obohatením pšeničnými otrubami

Použité huby:

- *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm kmeň P35 zo zbierky fytopatogenných húb Výskumného ústavu rastlinnej výroby, v.v.i. Praha-Ruzyně
- *Pleurotus eryngii* (DC.) Quél.kmeň Korea
- *Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Carst kmeň GA2 pôvodom z Thajska

Použité varianty substráty: SMREK, BUK, B6, F6 (viď tabuľka 7, str. 35), pričom každá varianta bola obohatená 20 % w/w pšeničnými otrubami.

Na základe výsledkov predchádzajúceho pokusu boli vybrané dve reprezentatívne varianty substrátu (B6 a F6) a dve kontroly (SMREK a BUK). Cieľom pokusu bolo zistiť vplyv intenzity rastu mycélia na obohatenia substrátu pšeničnými otrubami 20 % w/w.

Pri sledovaní intenzity rastu mycélia boli použité PP kýbliky o objeme 2 300 ml s výškou 15 cm a priemerom 13,4 cm – uzatvárané s PP viečkami s molitanovým filtrom. Prvým krokom bolo stanovenie sušiny pri 105 °C jednotlivých variant substrátu. Po následnom stanovení sušiny substrátu bola ich vlhkosť upravená na 68 %. Pripravené substráty boli rovnomerne plnené do PP kýblikov, cca. 3-4 cm od okraja tak aby vznikol priestor pre očkovaciu sadbu. Uzavreté PP kýbliky boli sterilizované po dobu 24 hod. v preparovacej komore pri teplote 90 °C. Po vychladení boli kýbliky za sterilných podmienok zaočkované zrnitou sadbou na povrch substrátu príslušnými hubami. Zaočkované kýbliky boli inkubované pri teplote 18 °C bez potreby osvetlenia. Od naočkovania boli celkovo 2 x zmerané prírastky mycélia od povrchu substrátu. Meranie bolo vykonané na 4 osách, ktoré boli načrtnuté na stene pohára a výsledok bol následne spriemerovaný (prírastok mycélia na deň). Dáta boli analyzované metódou rozptylu ANOVA.

Pri pokuse sa skúmali 4 rôzne varianty substrátu, 3 druhy húb v 10 opakovaniach. Celkovo bolo založených 120 ks. PP kýblikov za účelom sledovania intenzity rastu mycélia.

5.2.5 Pokus – stanovenie aktivity ligninolytických enzýmov jedlých a liečivých húb na vybraných substrátoch

Použité huby:

- *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm kmeň P35 zo zbierky fytopatogenných húb Výskumného ústavu rastlinnej výroby, v.v.i. Praha-Ruzyně
- *Pleurotus eryngii* (DC.) Quél. kmeň Korea
- *Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Carst kmeň GA2 pôvodom z Thajska

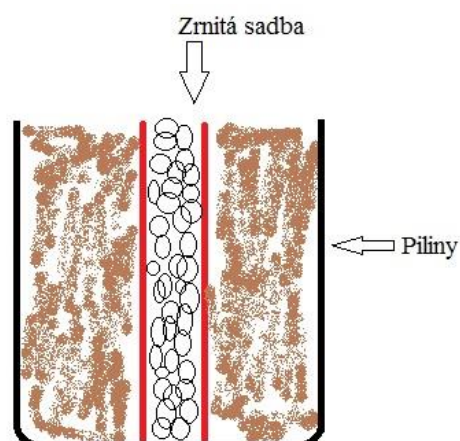
Použité varianty substrátov: BUK, B6, F6 (vid' tabuľka 7, str. 35).

Na základe výsledkov predchádzajúceho pokusu boli vybrané dve reprezentatívne varianty substrátu (B6 a F6) a jedna kontrola (BUK). Princípom bolo vhodne kolonizovať substrát hubami a v rôznych dňoch od zaočkovania substrátu preverenie ligninolytickej enzymatickej aktivity vybraných húb, čiže ich schopnosť efektívne rozkladať lignín.

5.2.5.1 Kultivácia húb pre stanovenie ligninolytickej enzymatickej aktivity

Pre kultiváciu húb boli použité OMNIA poháre o objeme 700 ml, uzatvorené hliníkovou fóliou. Sušením pri 105 °C bola zistená sušina jednotlivých substrátov a následne ich vlhkosť bola upravená na 68 %. Takto pripravený substrát bol plnený do OMNIA pohárov s tým, že v strede ostal tzv. komín, priestor bez substrátu s priemerom 2 cm. Poháre boli sterilizované v autokláve pri teplote 121 °C po dobu 2 hodín. Po vychladnutí boli poháre očkované v sterilnom prostredí flowboxu do komínov zrnitou sadbou jednotlivých húb. Týmto spôsobom bolo zabezpečené husté a rovnomerné prerastenie substrátu podhubím. Zaočkované poháre boli inkubované pri teplote 24 °C bez potreby osvetlenia

Pri pokuse sa overovali 3 rôzne varianty substrátu, 3 druhy húb v 3 opakovaníach a 4 odberoch. Celkovo bolo založených 108 ks. OMNIA pohárov za účelom kultivácie húb a následného stanovenia ligninolytickej enzymatickej aktivity v rôznu dobu od naočkovania substrátu.



Obrázok 10 - Spôsob kultivovania húb do komínkov pre stanovenie enzymatickej aktivity (autor)

5.2.5.2 Odber dvoch typov vzoriek pre stanovenie ligninolytickej enzymatickej aktivity

5.2.5.2.1.1 Použité chemikálie:

- Octan sodný
- Ľadová octová kyselina
- Kyselina octová
- TWEEN 80 – 20 g
- Glycerol – 100 ml

5.2.5.2.1.2 Materiál:

- Chladiaca miestnosť 4 °C
- Pomôcky pre odber vzoriek
- Eppendorf 1,5 ml – 216 ks. (predvážené)
- Falcon skúmavky 12 ml– 108 ks.
- Nádoby na trepanie
- Filtračný papier
- Sušiareň

5.2.5.2.1.3 Príprava roztoku pufru pre extrakciu 10 mM, pH 5,0 s prídavkom TWEEN 80:

- 1,36 g octan sodný + 500 ml destilovaná voda + 5g TWEEN 80
- pridať 10 mM kyselina octová do pH 5,0 (príprava 10 mM kyseliny octovej: 57 µl ľadovej octové kyseliny pridať do 100 ml H₂O (destilovaná))
- doplniť do 1000 ml destilovanou vodou.

5.2.5.2.1.4 Extrakcia enzýmov pre tekuté vzorky

Z jedného kultivačného pohára sa odobrala reprezentatívna vzorka (z viacerých miest). Vzorka sa odvážila s presnosťou na tri desatinné miesta, umiestnila sa do plastových nádob, pričom sa doplnila o päťnásobok svojho objemu octanovým pufrom. Vzorky sa trepli 120 min. (pri 4 °C, 100 rpm). Vzorky boli prefiltrované cez predvážený filtračný papier s presnosťou na štyri desatinné miesta do Falcon skúmaviek.

Po prefiltrovaní vzoriek sa papiere vysušili v sušiarňi (105 °C, 12-24h). Bola zaznamenaná hmotnosť vysušených vzoriek (mg) a objem získaného filtrátu (ml).

Do Falcon skúmaviek s filtrátom bol pridaný glycerol pre stabilizáciu filtrátu (finálna koncentrácia glycerolu 5% w/w). Vzorky boli skladované pri teplote - 20 °C do samotného stanovenia enzymatickej aktivity.

Celkovo boli vzorky odoberané v termínoch 5., 10., 15. a 20. deň od zaočkovania substrátu. Počet vzoriek bol 108 ks.

5.2.5.2.1.5 Odber pevných vzoriek pre stanovenie enzýmov

Z celého profilu každého pohára sa urobili vzorky, ktoré boli naplnené do Falcon skúmaviek 12 ml. Vzorky boli skladované pri teplote - 20 °C do samotného stanovenia enzymatickej aktivity. Počet vzoriek bol 108 ks.

5.2.6 Stanovenie ligninolytickej enzymatickej aktivity jedlých a liečivých húb

Boli stanovené aktivity ligninolytických enzýmov u vybraných jedlých a liečivých húb:

- Lakáza
- Mangán dependentná peroxidáza
- Lignín peroxidáza

Aktivity boli stanovené na 96 kvetovom spektrofotometri SPECTRAMAX. Meranie prebiehalo v Mikrobiologickom ústave AV ČR v.v.i. v Praze.

Pri lakáze boli použité merania cez roztok ABTS (2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonová kyselina)) v tekutom a pevnom vzorku. Výsledky boli prepočítané a následne porovnané. Pri lakáze bola takisto vypočítaná miera výťažnosti pri extrakcii v porovnaní s pevnou vzorkou. Boli vytvorené trendové línie skúmaných ligninolytických enzýmov každej huby.

5.2.6.1 Tekuté vzorky (kultivačné tekutiny, enzýmy vyextrahované do pufru)

5.2.6.1.1 Lakáza – ABTS test podľa Matsumura et al. (1986)

Chemikálie:

- 120 mM Na-acetátový pufer pH 5.0
- 50 mM roztok ABTS v H₂O (destilovaná)

Postup:

Pipetovať 160 µl pufru + 20 µl vzorky. Reakciu štartovať pridaním 20 µl ABTS a okamžite merať pri $\lambda=420$ nm (meranie po 12 s po dobu 5 min.).

Molárny extinkčný koeficient ABTS 36 000 M⁻¹ cm⁻¹.

5.2.6.1.2 Lakáza/MiP/MnP – DMP test podľa DeJong et al. (1994)

Chemikálie:

- 65.8 mM Na-malonátový pufer pH 4.5
- 20 mM roztok DMP (v 20 % EtOH)
- 20 mM MnSO₄
- 20 mM EDTA
- 10 mM H₂O₂ (pripraviť čerstvý pred každým meraním zo zásobného 30 % H₂O₂)

Príprava 10 mM H₂O₂: 50 µl 30 % H₂O₂ + 44 ml H₂O (destilovaná).

Postup:

Pipetovať:

- A. 170 µl pufru + 20 µl vzorky + START 10 µl DMP
- B. 152 µl pufru + 20 µl vzorky + 10 µl MnSO₄ + 8 µl H₂O₂ + START 10 µl DMP
- C. 152 µl pufru + 20 µl vzorky + 10 µl EDTA + 8 µl H₂O₂ + START 10 µl DMP

Pipetovať dohromady pufer, vzorku, MnSO₄, EDTA a H₂O₂. Štartovať reakciu pridaním 10 µl DMP a merať okamžite $\lambda=469$ nm (meranie 12 s po dobu 5 min.).

Molárny extinkčný koeficient DMP: 49 600 M⁻¹ cm⁻¹.

Rekalkulácia aktivít:

Lakáza = A

MiP = C - A

MnP = B - C

5.2.6.1.3 Lignín peroxidáza – veratryl alcohol test podľa Vyas et al. (1994)

Chemikálie:

- 0.1 M Na-tartrátový pufer pH=3.0
- 20 mM Veratryl alkohol (VeOH)
- 54 mM H₂O₂ (pripraviť čerstvý pred každým meraním zo zásobného 30 % H₂O₂)

Príprava 54 mM H₂O₂: 0,275 ml 30 % H₂O₂ + 50 ml H₂O (destilovaná).

Pri stanovení $\lambda=310$ nm je potrebná UV transparentná kyveta.

Postup:

Pipetovať 155 μ l pufru, 30 μ l vzorky a 10 μ l 54 mM H₂O₂. Štartovať reakciu pridaním 5 μ l veratryl alkoholu a okamžite merať $\lambda=310$ nm (meranie po 12 s po dobu 5 min.).

Molárny extinkčný koeficient VeOH: 9 300 M⁻¹ cm⁻¹.

5.2.6.1.4 Výpočet aktivity tekutých vzoriek

Aktivita sa udáva v jednotkách (U, U = μ mol.min⁻¹) vzťahnutý na objem tekutiny (l).

Výpočet aktivity podľa vzorca:

$$EA [U/l] = dA_{60s} \cdot V_{rm} / \epsilon \cdot l \cdot V_{vz}$$

Pričom:

- dA_{60s} = zmena λ za 60 s.
- V_{rm} = objem reakčnej zmesi [0,0002 l]
- ϵ = molárny extinkčný koeficient [v jednotkách μ M⁻¹ cm⁻¹]
- objem vzorky [v jednotkách l]

Prepočet vyššie uvedenej aktivity na aktivitu v pôvodnom vzorku pred extrakciou:

Aktivitu EA [U/l] vynásobiť objemom pufru použitého na extrakciu [v jednotkách l]. Získanú hodnotu vydeliť suchou hmotnosťou pôvodného vzorku použitého na extrakciu [v jednotkách mg]. Výsledná aktivita potom vyjde v jednotkách enzymatickej aktivity na mg vzorku [v jednotkách U/mg].

5.2.6.2 Pevné vzorky

5.2.6.2.1 Lakáza – ABTS test

Chemikálie, materiál:

- cca. 20 – 50 mg nesusušeného vzorky
- predvážené skúmavky 1,5 ml
- 120 mM Na-acetátový pufer pH=5.0
- 50 mM roztoku ABTS v H₂O (destilovaná)

Molárny extinkčný koeficient ABTS 36 000 M⁻¹ cm⁻¹.

Postup:

Inkubovať vzorku v predvážených skúmavkách s pufrom (900 µl) a enzýmovým substrátom – ABTS (100 µl) – inkubácia 2 min. pri izbovej teplote za stáleho trepania (vortex). Potom oddeliť vzorku od pufru centrifugáciou (30 s., max. otáčky) a zmerať absorbanciu supernatantu pri λ=420 nm.

Ako kontrolu (=blank) inkubovať rovnakú reakčnú zmes bez vzorky. Supernatant z nej použiť ako blank pre spektrofotometrické meranie vzoriek.

Ako kontrola absorbancie pozadia inkubovaná pôdna vzorka s pufrom bez pridania ABTS. Vysušiť zostávajúce vzorky pilín pri 105 °C a stanoviť ich suchú hmotnosť [mg].

Vypočítať enzymatickú aktivitu v jednotkách enzymatickej aktivity (U) na mg suchej vzorky [U/mg].

5.2.6.2.2 Výpočet aktivity pevných vzoriek

Najskôr spočítať zmenu absorbancie pri 1 min.

$$dA_{60s} = (\lambda \text{ vzorky} - \lambda \text{ kontroly bez ABTS}) / 2$$

Spočítať enzymatickú aktivitu (EA) podľa vzorca:

$$EA [U/mg] = (dA_{60s} \cdot V_{rm}) / (\epsilon \cdot l \cdot V_{vz})$$

Pričom:

- dA_{60s} = zmena λ za 60 s.
- V_{rm} = objem reakčnej zmesi [0,001 l]
- ϵ = molárny extinkčný koeficient [v jednotkách $\mu\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$]
- objem vzorky = sušina vzorky [mg]

5.2.7 Stanovenie pomeru C : N v jednotlivých substrátoch

Použité huby:

- *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm kmeň P35 zo zbierky fytopatogenných hub Výskumného ústavu rostlinné výroby, v.v.i. Praha-Ruzyně
- *Pleurotus eryngii* (DC.) Quél. kmeň Korea
- *Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Carst kmeň GA2 pôvodom z Thajska

Použité varianty substrátov: BUK, B3, B6, B9, F3, F6, F9 (vid' tabuľka 7, str. 35).

Cieľom bolo zistiť pomer uhlíka ku dusíku jednotlivých substrátov pred kolonizáciou húb nakoľko sa jedná o jeden z najdôležitejších faktorov pri posudzovaní kvality substrátu a do akej miery bol tento pomer ovplyvnený fermentáciou.

Celkové obsahy C, H, N vo vzorkách pilín boli stanovené na prístroji pre elementárnu analýzu Vario MACRO cube (Elementar Analysensysteme, GmbH, Nemecko). Suché vzorky pilín boli navážené do cínovej fólie a následne boli katalyticky spaľované pri teplote 1150 °C v prúde veľmi čistého kyslíku. Nosným plynom bolo čisté hélium. Po tepelnom rozklade vzorky bola zmes plynu obsahujúca C, H, N vplyvom kondenzácie a adsorpcie na oxid fosforečný a striebornú vatu. Zmes čistých analyzovaných plynov bola od seba oddelená špecifickou adsorpciou-desorpciou na kolonách a následne bol stanovený ich obsah na tepelne vodivom detektore (TCD).

5.2.8 Stanovenie hodnoty pH kolonizovaného substrátu jedlými a liečivými hubami

Použité huby:

- *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm kmeň P35 zo zbierky fytopatogenných hub Výskumného ústavu rostlinné výroby, v.v.i. Praha-Ruzyně
- *Pleurotus eryngii* (DC.) Quél. kmeň Korea
- *Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Carst kmeň GA2 pôvodom z Thajska

Použité varianty substrátov: BUK, B6, F6 (vid' tabuľka 7, str. 35).

Počas pokusu na stanovenie enzymatickej aktivity boli súbežne odoberané vzorky pre stanovenie pH substrátu počas kolonizácie. Cieľom bolo zistiť pokles pH substrátu počas kolonizácie substrátu hubou. Vzorky boli odoberané 5., 10., 15. a 20. deň od naočkovania substrátu hubami. Počet vzoriek bol 108 ks.

Hodnota pH predom vysušených substrátov bola stanovená vo výluhu 0.01M CaCl₂ v upravenom pomere 1:10 (objem) podľa normy EN 13037.

5.2.9 Stanovenie živíc v smrekových pilinách na začiatku a počas fermentácie

Stanovenie prchavých látok a živíc vo smrekových pilinách počas fermentácie prebehlo na Katedre chémie FAPPZ ČZU Praha. Podstatou bolo zistiť do akej miery je fermentácia a prídavok fugátu v rámci fermentácie účinný pre redukciu prchavých látok a živíc. Pre potreby stanovenia boli piliny vysušené pri 105 °C.

5.2.9.1 Stanovenie živíc

Použité varianty substrátov: SMREK, B3, B6, B9, F3, F6, F9.

Stanovenie odpovedá TAPPI norme T 264 cm-97, ktorá sa používa pre stanovenie lignínu podľa Klasona. Je jeho modifikovanou podobou. Živice sa stanovia vyextrahovaním pomocou benzén-etanolickej zmesi.

Patróna s odextrahovanou vzorkou sa opäť vloží do Soxhletovho prístroja, ktorý sa však v tomto prípade naplní zmesou benzénu a etanolu v pomere 1 objemový diel etanolu a 2 objemové diely benzénu. Extrakcia sa robí podľa TAPPI normy T 264-97 po dobu 6 až 8 hodín. Po skončení extrakcie sa materiál prevedie na Büchnerov lievnik a odsaje sa prebytok extrakčného činidla. Vzorka sa ďalej premyje najskôr etanolom tak dlho, až odtekajúca kvapalina je bezfarebná. Potom sa prevedie premytie destilovanou vodou (cca. 100 ml) k odstráneniu alkoholu. Vzorka sa prevedie do 1 000 ml Erlenmayerovej nádoby a pridá sa 500 ml horúcej destilovanej vody. Nádoba sa potom prevedie do 1 000 ml Erlenmayerovej nádoby a pridá sa 500 ml horúcej destilovanej vody. Nádoba sa potom zahrieva na vodnom kúpeli po dobu 1 hodiny. Po skončení premývania sa obsah nádoby opäť prefiltruje na Büchnerov lievnik a premyje sa s 500 ml horúcou destilovanou vodou. Vzorka sa potom usuší v sušiarňi pri 105 °C a určí sa jeho hmotnosť m_2 .

Množstvo živíc sa vypočíta zo vzťahu:

$$x_r = (m_1 - m_2) / m_{v.s.} \text{ vztiahnuté na v.s. fyto masu alebo}$$

$$x_r = (x_r / (1 - x_h)) / 100 \text{ vztiahnuté na a.s. fyto masu, resp. v \% (*100).}$$

5.2.9.2 Stanovenie prchavých látok

5.2.9.2.1 Destilácia prchavých látok

40 g pilín bolo navážených do kádinky a potom kvantitatívne prevedených do guľatej zabrusenej banky o objeme 1 000 ml. Bolo pridaných 400 ml destilovanej vody. Bola zostavená

aparátúra podľa Likens-Nickersona. Pre zahrievanie banky o objeme 1 000 ml, do ktorej bolo naliatých 50 ml dichlórmetanu p.a. Do banky s dichlórmetanom bol pridaný varný kamienok. Pre zahrievanie dichlórmetanu bol použitý vodný kúpeľ o teplote 60 °C. Voda s pilinami bola privedená k varu a destilácia prchavých látok prebiehala po dobu 4 hodín. Potom bol ohrev vypnutý a aparátúra bola ponechaná vychladnutiu. Potom banka s dichlórmetanom bola opatrne odobratá, pevne uzavretá a uložená v mraziaku do ďalšieho spracovania.

5.2.9.2.2 Príprava vzorky k analýze

Banka bola vybratá z mraziaceho boxu a ponechaná vytemperovať na teplotu laboratória. Potom bol pinzetou vybratý varný kamienok a vzorka bola zahustená čiastočným vyparením dichlórmetanu na rotačnej vakuovej odparke pri teplote vodnej kúpele 30 °C na konečný objem vzorky cca. 2-3 ml. Potom bolo do vzorky presne pridané 0,5 roztoku undekanu v dichlórmetanu o známej koncentrácii (0,982 mg/ml) ako vnútorný štandard.

5.2.9.2.3 Plynová-chromatografická analýza

Pre meranie bol využitý plynový chromatograf Varian 3300 vybavený kremennou kapilárnou kolónou DB-5 (30 m X 0,25 mm i.d., tl. filmu 0,25 µm) a plameno-ionizačným detektorom. Podmienky analýzy: teplota nástreku a detektoru 280 °C, programovaná teplota kolóny (50 °C po dobu 3 minút, nárast 5 °C/min, horná izoterma 260 °C po dobu 10 minút), nosný plyn dusík (vstupný tlak do kolóny 20 psi), prietok cca. 1 ml/min., splitovací pomer 1:20, objem nástreku 1 µm.

5.2.10 Stanovenie lignínu podľa Klasona a holocelulózy

5.2.10.1 Stanovenie lignínu

Stanovenie lignínu a holocelulózy prebiehalo na Univerzite Pardubice, Fakulta chemicko technologická. Oddělení dřeva, celulózy a papíru.

Použité huby:

- *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm kmeň P35 zo zbierky fytopatogenných hub Výskumného ústavu rostlinné výroby, v.v.i. Praha-Ruzyně
- *Pleurotus eryngii* (DC.) Quél. kmeň Korea
- *Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Carst kmeň GA2 pôvodom z Thajska

Použité varianty substrátov: BUK, B6, F6 (vid' tabuľka 7, str. 35).

Cieľom bolo súbežne so stanovením enzymatickej aktivity zistiť, do akej miery boli enzýmy schopné rozložiť lignín v jednotlivých substrátoch. Sledovali sa vzorky pred naočkovaním a 20 dní po naočkovaní (posledný termín odberu vzoriek pre stanovenie enzymatickej aktivity).

Pred samotným stanovením lignínu bolo potrebné stanoviť množstvo popola. Vzorka po stanovení sušiny bola kvantitatívne prevedená do zváženého porcelánového tégliku na stanovenie popola. Množstvo popola v dreve bolo stanovené v súlade s TAPPI normou T 211 om-93 spálením vzorky v peci pri 525 ± 25 °C po predchádzajúcom odpálení nad kahanom, ochladením v exsikátore a určením jeho hmotnosti m_a bežným spôsobom. Obsah popola bol vypočítaný podľa vzorca:

$$x_a = m_a / m_{v.s.} \text{ vztiahnuté na v.s. množstvo pilín alebo}$$

$$X_a = m_a / m_{a.s.} \text{ vztiahnuté na a.s. množstvo pilín resp. v \% (* 100).}$$

Stanovenie lignínu podľa Klasona je založené na hydrolýze a rozpúšťaní všetkých polysacharidických podielov (holocelulózy) vo fytomase pomocou 72 % kyseliny sírovej. Vzorka bola po stanovení živíc prevedená do vyššej a väčšej váženky a priamo v nej sa pokračovalo. Množstvo m_2 vzorky sa preleje 72 % kyselinou sírovou vychladenou v chladničke v množstve odpovedajúce 15 ml tejto kyseliny na 1 g vzorky. Zmes sa intenzívne premieša po dobu 1 minúty sklenenou tyčinkou a následne sa ponechá stáť dve hodiny v miestnosti za občasného zamiešania. Potom sa zmes zriedi prídavkom destilovanej vody tak, aby koncentrácia kyseliny klesla na hodnotu 3 % (napr. ak sa na začiatku použilo 15 ml 72 % kyseliny sírovej, tak sa zmes zriedi prídavkom 345 ml destilovanej vody). Vzorka s touto riediacou vodou sa potom prevedie do varnej banky a zmes sa varí pod spätným chladičom po dobu 4 hodín. Nerozpustný hnedý až tmavohnedý zbytok sa následne odfiltruje cez odvážený sklenený pórovitý filter triedy S₂ a pomaly sa premyje 500 ml teplej destilovanej vody.

Potom sa suší pri teplote 105 ± 3 ° do konštantnej hmotnosti, ochladí v exsikátore a zváži, čím sa určí jeho hmotnosť m_3 . Je to hmotnosť lignínu spoločne s popolom z pôvodnej návažky.

Obsah lignínu zo vzorky (po odčítaní prítomného popola) sa určí zo vzťahu:

$$x_l = (m_3 - x_a * m_{v.s.}) / m_{v.s.} \text{ vztiahnuté na v.s. vzorku alebo}$$

$$X_l = (m_3 - X_a * m_{a.s.}) / m_{a.s.} \text{ vztiahnuté na a.s. vzorku, resp. v \% (*100).}$$

5.2.10.2 Stanovenie holocelulózy (celulóza + hemicelulóza)

Množstvo holocelulózy vo vzorkách je možné získať dopočítaním. K výpočtu sa použije nasledujúci vzťah:

$$x_c = 1 - x_h - x_a - x_t - x_r - x_l - x_c \text{ vztiahnuté na v.s. vzorku alebo}$$

$$X_c = 1 - X_a - X_t - X_r - X_l - X_c \text{ vztiahnuté na a.s. vzorku.}$$

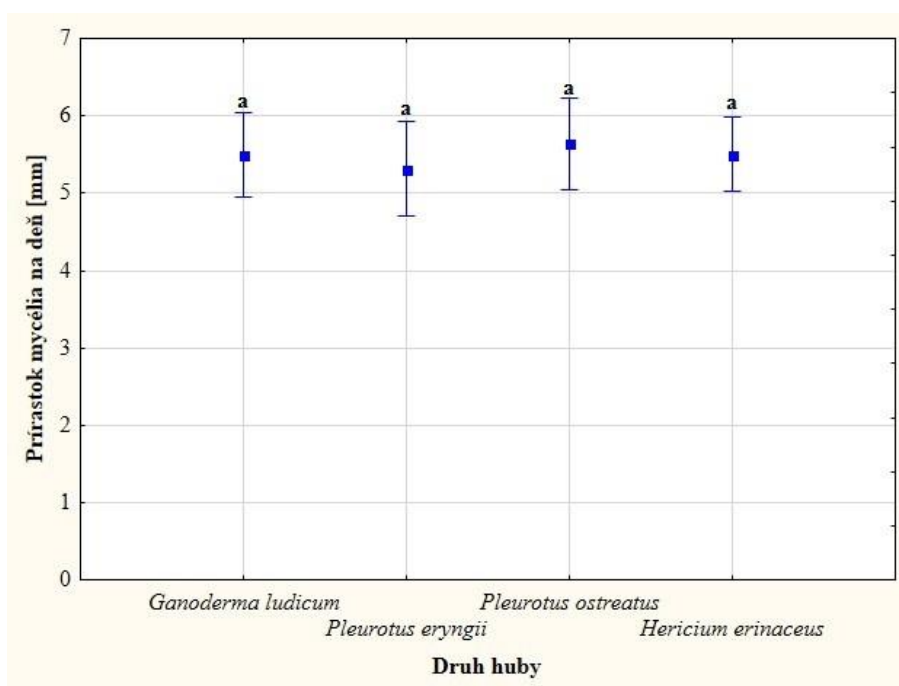
5.2.11 Štatistické vyhodnotenie

V rámci štatistického vyhodnotenia boli priemerné hodnoty prírastku jednotlivých húb na substrátoch vztiahnuté na deň štatisticky vyhodnotené programom Stastica 12 (StatSoft) viacfaktorovou alebo jednofaktorovou analýzou rozptylu a následne podrobnejšie vyhodnotené testom LSD – Fisherov test na hladine významnosti $\alpha = 0,05$.

6 Výsledky a diskusia

6.1 Sledovanie rastu mycélia na bukových pilinách (kontrola)

Piliny pochádzajúce zo stromov s tvrdým drevom sú vo svete využívané ako vhodný substrát pre kultiváciu jedlých a liečivých húb (Stamets, 1996; Sanchéz 2010; Oei, 2016). V podmienkach Českej republiky sú to bukové piliny, ktoré preferujú pestovatelia vďaka svojej dostupnosti. Avšak práve ich relatívne vysoká cena významne vplýva na ekonomiku produkcie húb pretože sa vo veľkom používajú na údenie a výrobu peliet, vďaka svojim výborným energetickým vlastnostiam.

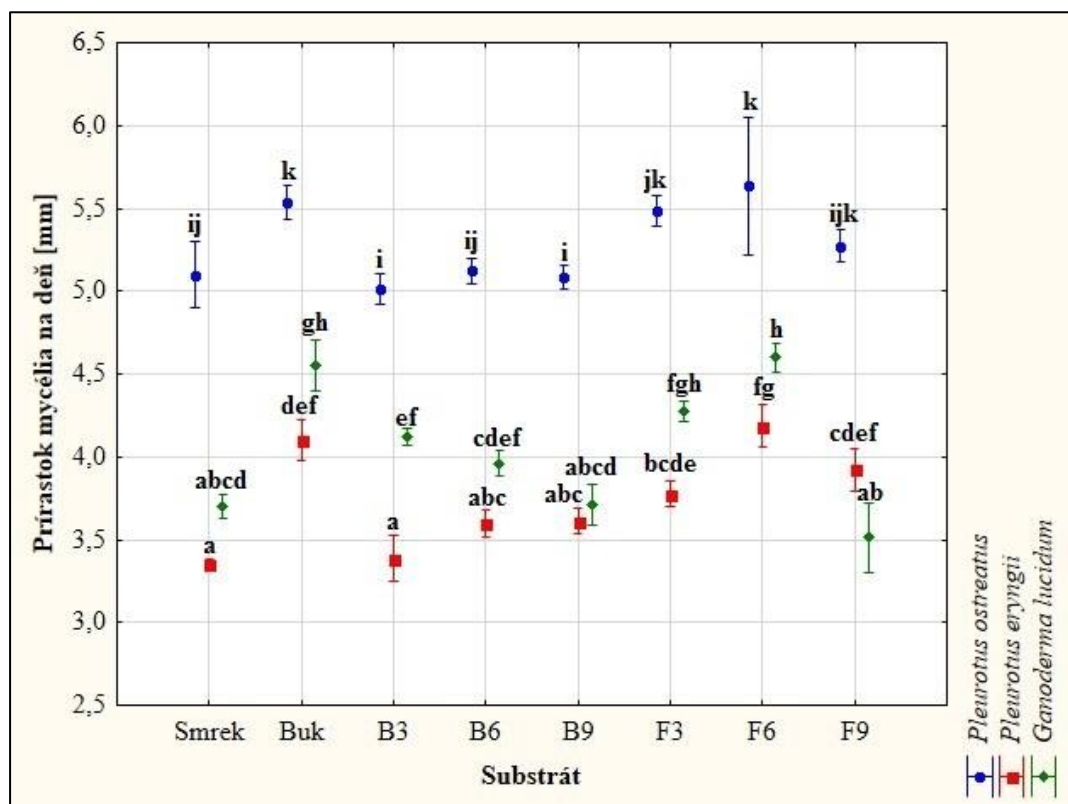


Graf 6 - Intenzita rastu mycélia [mm] jednotlivých húb na bukových pilinách

Cieľom bolo zistiť intenzitu rastu jednotlivých húb na bukových pilinách, nakoľko porovnanie rastu týchto štyroch druhov húb nebolo dostupné. Huby boli kultivované po dobu 23 dní. Z grafu 6 je vidieť, že jednotlivé huby kolonizujú substrát vyrovnané. Je teda možné predpokladať, že štruktúra a fyzikálne vlastnosti substrátu (pilín) nebudú ovplyvňovať intenzitu kolonizácie substrátu a jednotlivé huby bude možné porovnávať na tomto druhu substrátov. *Hericium erinaceus* malo v tomto pokuse veľmi jemné a málo vitálne podhubie, ale mala podobný prírastok ako ostatné testované druhy (viď graf 6).

6.2 Intenzita rastu mycélia jedlých a liečivých húb na jednotlivých substrátoch

Zo všetkých použitých substrátov najlepšia kolonizácia bola zaznamenaná pri všetkých troch hubách (*Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus eryngii* a *Ganoderma lucidum*) u varianty F6 (viď graf 7), čiže smrekových pilinách fermentovaných po dobu 6 týždňov s prídavkom 5 % fugátu. V rámci jednotlivých druhov sa varianty BUK a F6 štatisticky nelíšia, čiže intenzita rastu mycélia prepočítaná na deň bola vo všetkých prípadoch podobná ako na bukových pilinách, ktoré slúžili ako kontrolná varianta, nakoľko práve na tomto substráte býva dosiahnutá najväčšia intenzita rastu podhubia u húb bielej hniloby.



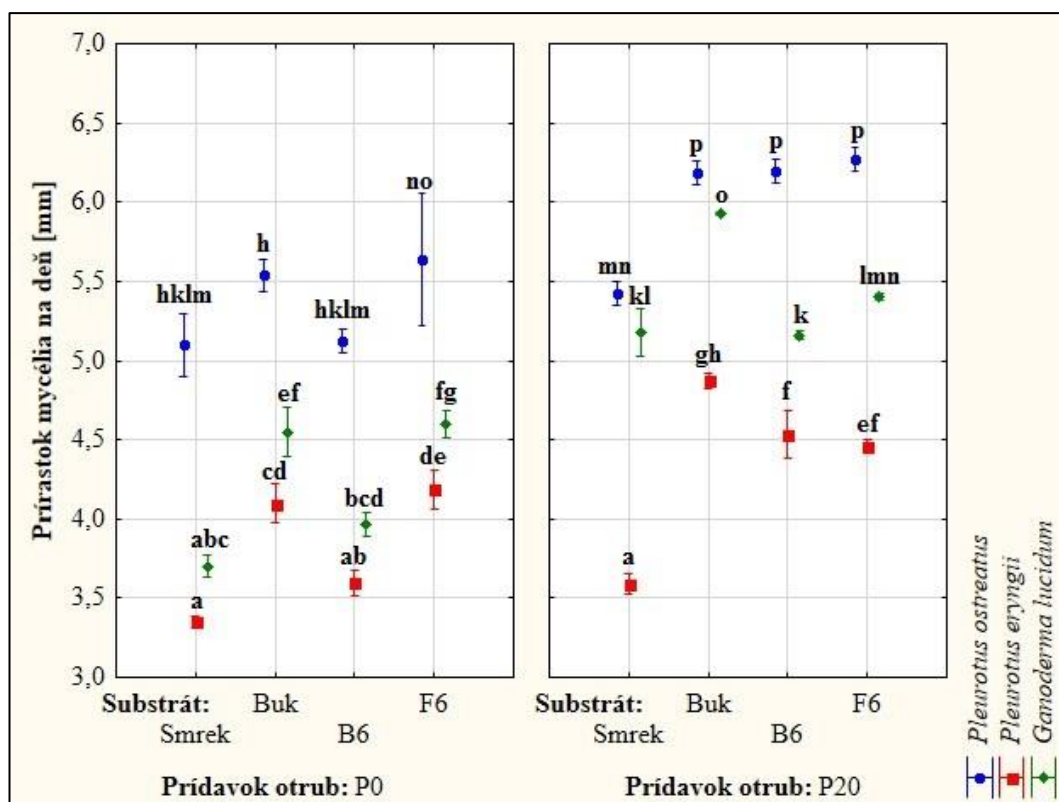
Graf 7- Intenzita rastu mycélia [mm] *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus eryngii*, *Ganoderma lucidum* na substrátoch SMREK, BUK, B3, B6, B9, F3, F6, F9 (viď tabuľka 7, str. 35).

Fugát pridaný do smrekových pilín počas procesu fermentácie mal za úlohu podporiť rozklad látok inhibujúcich rast mycélia. Ukázalo sa, že 6 týždňov fermentácie smrekových pilín je najvhodnejšia doba pre získanie substrátu, ktorý bude kvalitatívne obdobný ako bukové piliny pre kolonizáciu hubami. Doba fermentácie 9 týždňov s 5 % prídavkom fugátu (F9) mala za následok spomalenie rastu mycélia jednotlivých húb. Pravdepodobne za to môžu nahromadené metabolity mikroorganizmov, vďaka ktorým fugát urýchlil rozklad prchavých organických

látok. Fermentácia pilín po dobu dlhšiu ako 6 týždňov teda nie je vhodná pre vytvorenie rastového substrátu a takisto je ekonomicky a časovo neefektívna.

Podľa Jablonský a Šašek (2006) huby bielej hniloby dobre rastú na nerozloženej hmote (slama alebo rôzne listnaté dreviny). Thevasingh et al. (2005) popisuje využitie fermentácie pri odbúravaní prchavých organických látok u kaučukovníku *Hevea brasiliensis*. Piliny kaučukovníku sú ponechané 1-2 mesiace vonku, pričom prchavé organické látky, ktoré sú týmto procesom uvoľnené by mohli poškodiť mycélium *Lentinula edodes*, pre ktorej kultiváciu sa piliny kaučukovníku v Thajsku využívajú. Podnebie Thajska umožňuje takýto druh pasívnej fermentácie, nakoľko v krajine panuje vysoká relatívna vlhkosť a vysoká priemerná teplota. Z tohto dôvodu, pri hľadaní najlepšej úpravy smrekových pilín, bola zvolená kontrolovaná fermentácia pri 30 °C a vlhkosti 50 % za súčasnej aerácie celej masy. Hlavnou úlohou fermentácie bolo odstrániť u smrekových pilín prchavé látky a tým vytvoriť substrát vhodný pre kolonizáciu húb.

Hericium erinaceus nebolo schopné kolonizovať tieto druhy substrátov, čomu napovedal aj prvý pokus intenzity rastu mycélia. Pri tejto hube bol pokus založený dvakrát a v oboch prípadoch bol prírastok na jednotlivých variantách veľmi zanedbateľný alebo nemerateľný, z tohto dôvodu nie je táto huba uvádzaná v nasledujúcich grafoch a tabuľkách.



Graf 8 - Intenzita rastu mycélia [mm] *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus eryngii*, *Ganoderma lucidum* na substrátoch obohatených o 20 % pšeničných otrúb (P20) a na neobohatených substrátoch o pšeničné otruby (P0). Substráty – SMREK, BUK, B3, B6, B9, F3, F6, F9 (viď tabuľka 7, str. 35).

Prídavok 20 % pšeničných otrúb (P20) do rastového, substrátu mal pri každej variante pozitívny vplyv na intenzitu kolonizácie substrátu hubou (viď graf 8). Najlepšie reagovala na prídavok otrúb *Ganoderma lucidum*, ktorá pri variante SMREK štatisticky preukázateľne efektívnejšie kolonizovala substrát ako pri neobohatených substrátoch. Naopak najhoršie reagovala na prídavok otrúb pri substráte SMREK *Pleurotus ostreatus*, pri ktorej nebol štatisticky preukázaný významnejší rozdiel medzi variantami P0 a P20. Avšak pri substrátoch B6, F6 a BUK, prídavok otrúb znamenal štatisticky významný rozdiel. Vo variante s prídavkom otrúb nebol u tejto huby zistený štatistický rozdiel medzi substrátmi B6, F6 a BUK, ale u týchto substrátoch u varianty P0 bol štatisticky významný rozdiel medzi B6 a F6 substrátom. Prídavok otrúb pre *Pleurotus ostreatus* môže slúžiť ako kompenzácia pri použití menej vhodného substrátu.

Pleurotus ostreatus v oboch prípadoch P0 a P20 dosiahlo najvyšší denný prírastok mycélia pri kolonizácii substrátu. Podľa Elisashvili et al. (2008) sa jedná o prispôsobivú hubu,

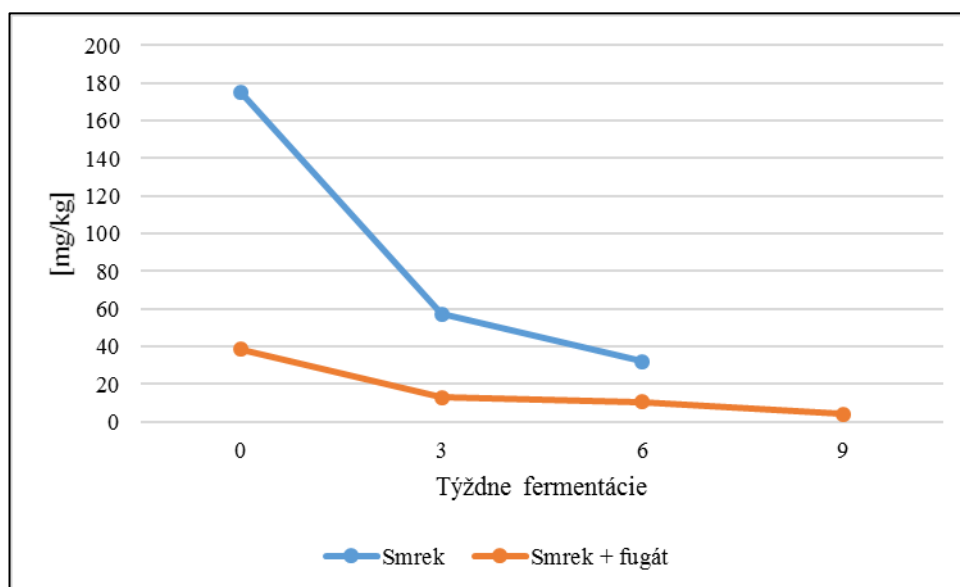
ktorá je schopná úspešne kolonizovať rozličné ligninolytické materiály, čo potvrdzujú aj denné prírastky v grafe 8.

Prídavok 20 % pšeničných otrúb u *Ganoderma lucidum* v každej variante substrátu znamenal štatisticky lepší denný prírastok mycélia na deň (viď graf 8).

Stamets (1996) uvádza, že *Pleurotus eryngii* je menej prispôsobivá k rozličným substrátom a prídavok ľahko rozložiteľného organického materiálu ako sú otruby v obsahu 5 – 10 % má najväčší vplyv na zlepšenie rastu huby. Najlepšie sa v pokuse (viď graf 10) *Pleurotus eryngii* darilo na bukových obohatených pilinách.

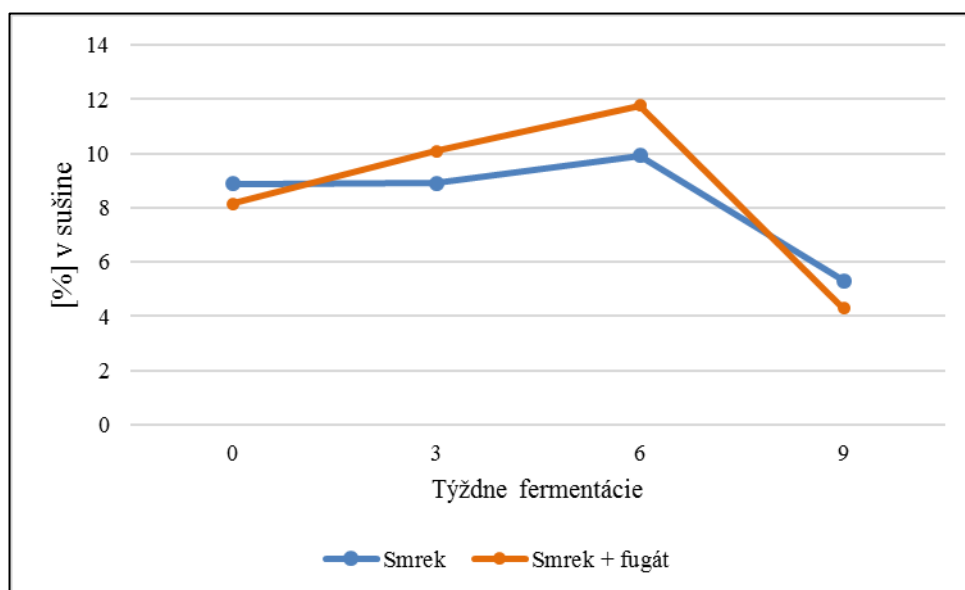
Mierne rozdiely denného prírastku [mm] na variante BUK v grafoch 6 a 7 sú spôsobené rozdielnou dobou kultivácie substrátu a pri pokuse, ktorý znázorňuje graf 7 pomáhali autorovi iné osoby s meraním prírastku mycélia. Uvedené rozdiely sú v rámci presnosti merania a sú spôsobené ľudským faktorom. Je nutné však podotknúť, že jeden druh huby vždy merala tá istá osoba a namerané hodnoty možno považovať za dostatočne presné.

6.3 Zmena obsahu prchavých organických látok v smrekových pilinách počas fermentácie



Graf 9 - Zmeny obsahu prchavých organických látok v sušine [mg/kg] fermentovaných pilín (0., 3., 6., 9. týždeň odberu)

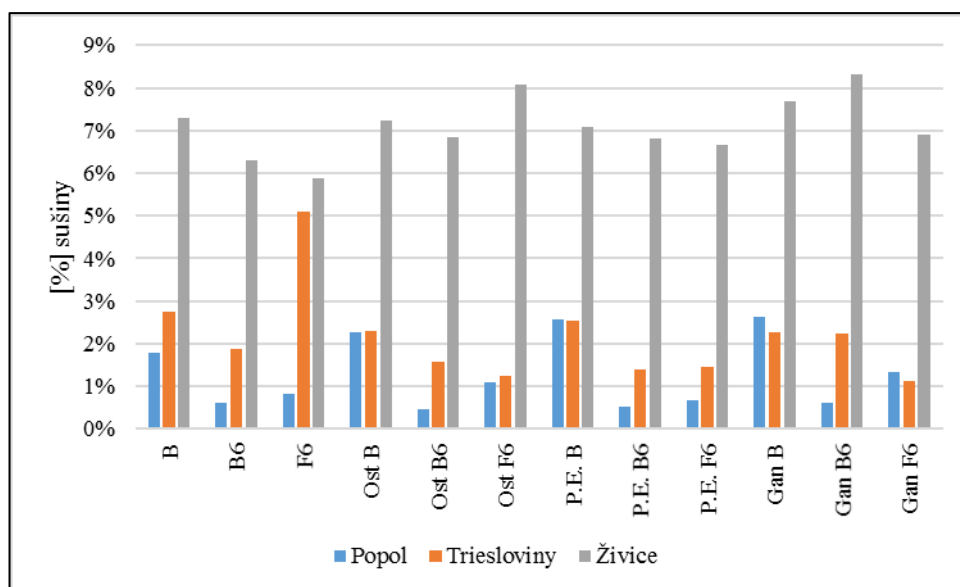
Croan (2004) a Van Beek et al. (2007) ošetrovali ihličnaté piliny mikroorganizmami, ktoré boli schopné za určitý čas odbúravať látky inhibujúce rast húb na týchto substrátoch. Martinez-Inigo et al. (1999) preukázali, že extraktívne látky ihličnatých druhov stromov sú toxické pre viaceré druhy húb bielej hniloby. Z tohto dôvodu je dodatočná úprava tohto substrátu potrebná.



Graf 10 - Zmeny v relatívnom obsahu živíc v sušine [%] fermentovaných pilín (0., 3., 6., 9. týždeň odberu)

V experimente diplomovej práce boli smrekové piliny fermentované po rôznu dobu (viď graf 9). Jedna varianta bola obohatená o 5 % fugátu, čo malo za následok zvýšenie mikrobiálnej aktivity pre urýchlenie rozkladu prchavých organických látok v smrekových pilinách. Podiel prchavých organických látok sa znižoval a k výraznému úbytku prchavých organických látok došlo už po 3 týždňoch fermentácie. Po 6 týždňoch fermentácie obsah prchavých organických látok ďalej klesal. Zmeny v obsahu prchavých organických látok však nekorešpondovali s intenzitou rastu mycélia sledovaných húb, ktorá bola najvyššia v pilinách po 6 týždňoch fermentácie (viď graf 7). Prídavok fugátu zlepšil odbúravanie prchavých organických látok v smrekových pilinách, po 6 týždňoch mali obohatené piliny fugátom obsah prchavých organických látok 10,47 [mg/kg] pričom smrekové piliny po šiestich týždňoch bez prídavku fugátu obsah prchavých organických látok 30,86 mg/kg. Fermentácia s 5 % prídavkom fugátu po dobu 6 týždňov sa javí ako vhodný spôsob úpravy smrekových pilín pre úspešnú kultiváciu jedlých a liečivých húb.

V grafe 10 je vidieť zmenu relatívneho obsahu [%] živíc, pričom najväčší úbytok nastal až po 6. týždni fermentácie. Je možné tvrdiť, že hlavným inhibitorom rastu húb na smrekových pilinách sú prchavé organické látky, ktorých obsah sa výrazne znížil už 3. týždeň fermentácie (viď graf 9), ale najlepší rast bol zaznamenaný na pilinách po 6. týždňoch fermentácie s prídavkom fugátu (viď graf 7). V 6. týždni fermentácie bol materiál zbavený väčšiny prchavých organických látok, ale zároveň bol vhodne rozložený procesom fermentácie pre ľahšiu kolonizáciu hubami.



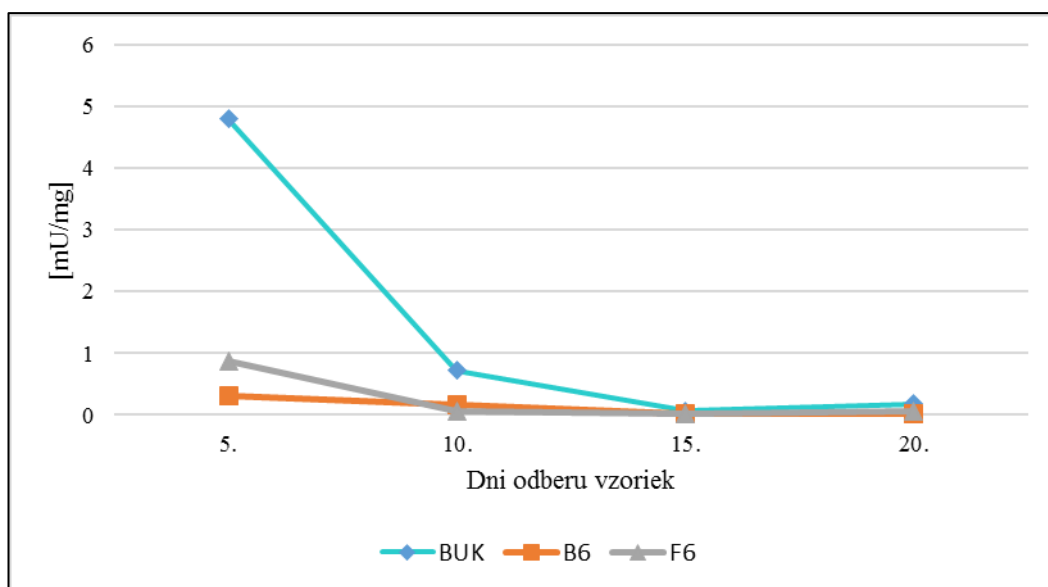
Graf 11 - Zmeny v relatívnom obsahu popola, trieslovín a živíc [%] v sušine počas kolonizácie substrátov hubami. P. O. – *Pleurotus ostreatus*, P. E. – *Pleurotus eryngii*, G. O. – *Ganoderma lucidum*. Substráty – BUK, B6, F6 (viď tabuľka 7, str. 35)

Prchavé organické látky aj v malej koncentrácii [mg/kg] sú schopné výrazne inhibovať rast húb. Sú to látky s krátkym uhlíkovým reťazcom Yang and Jakkola (2011) a v porovnaní so živicami sú menej stabilné. Naopak živice aj pri 10^3 vyššom obsahu v smrekových pilinách nepotláčali rast húb na tomto substráte.

V grafe 11 je uvádzany relatívny obsah popola, trieslovín a živíc v substrátoch BUK, B6 a F6 a po 20 dňovej kolonizácii hubami bielej hniloby. Huby bielej hniloby nemali vplyv na zmenu obsahu živíc, ale obsah trieslovín klesol. Zároveň tento graf slúži ako kontrola správnosti stanovenia živíc, nakoľko v oboch prípadoch (viď grafy 10 a 11) bola využitá rovnaká metóda stanovenia obsahu [%] v substráte.

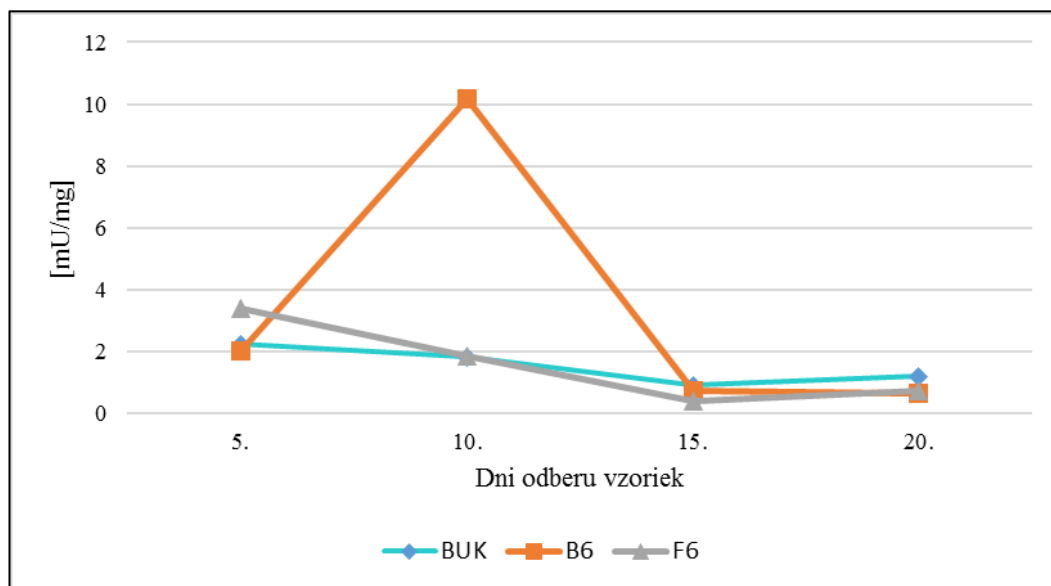
6.4 Aktivita ligninolytických enzýmov na jednotlivých substrátoch

Boli stanovené aktivity ligninolytických enzýmov lakázy, mangán dependentnej peroxidázy a lignín peroxidázy. V tejto práci sú prezentované výsledky iba zo stanovenia lakázy za použitia roztoku ABTS v tekutých a pevných vzorkách, nakoľko sa jedná o najreprezentatívnejšie analýzy enzymatickej aktivity u skúmaných druhov jedlých a liečivých húb.



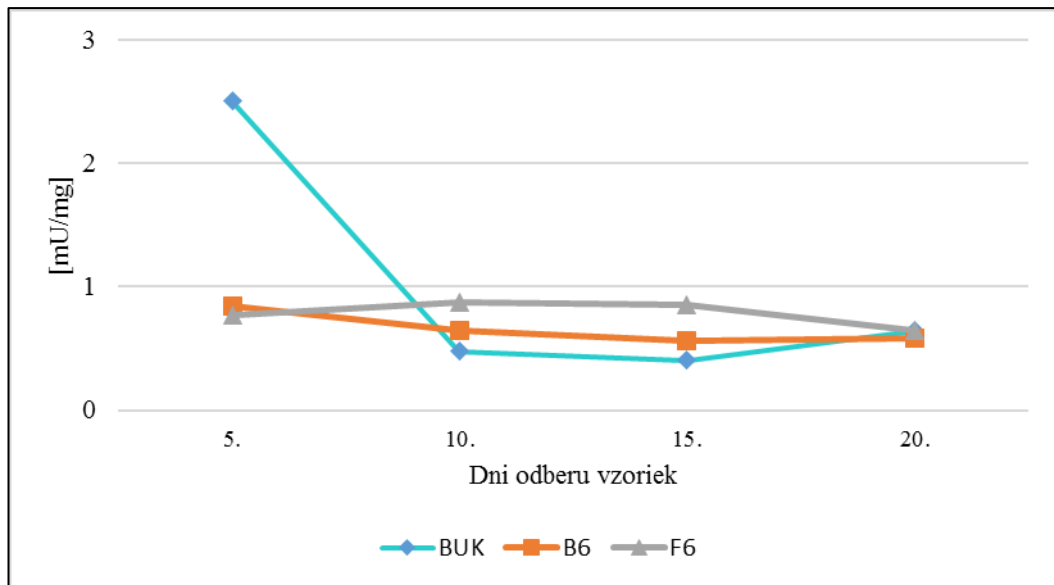
Graf 12 - Aktivita lakázy [mU/mg] v tekutých vzorkách u *Pleurotus ostreatus*. Substráty – BUK, B6, F6 (viď tabuľka 7, str. 35)

V grafe 12 je zreteľne vidieť priebeh pôsobenia enzýmu lakázy u huby *Pleurotus ostreatus*. Bola nameraná najvyššia hodnota 4,80 mU/mg u bukového substrátu hneď na začiatku vegetatívneho štádia, teda 5. deň odberu po inokulácii substrátu. Substráty B6 a F6 mali aktivitu v 5. deň odberu pod 1 mU/mg a po zvyšok kolonizácie substrátu bola ich aktivita skoro nulová.



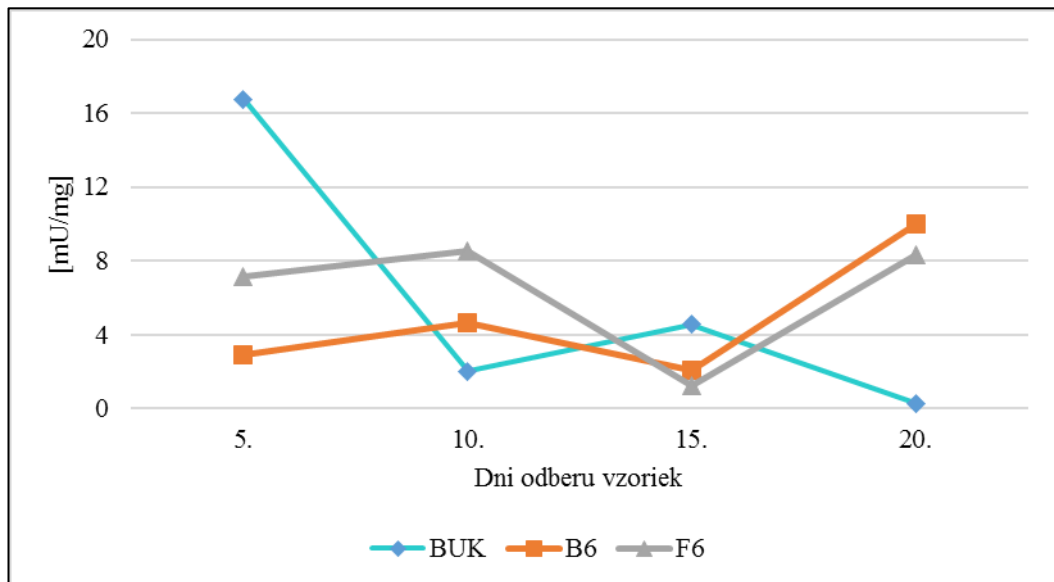
Graf 13 - Aktivita lakázy [mU/mg] v pevných vzorkách u *Pleurotus ostreatus*. Substráty – BUK, B6, F6 (viď tabuľka 7, str. 35)

Vysoká hodnota enzymatickej aktivity 10. deň odberu u varianty B6 v grafe 13 je pravdepodobne spôsobená chybou merania, nakoľko krivka nekorešponduje s grafom 12.



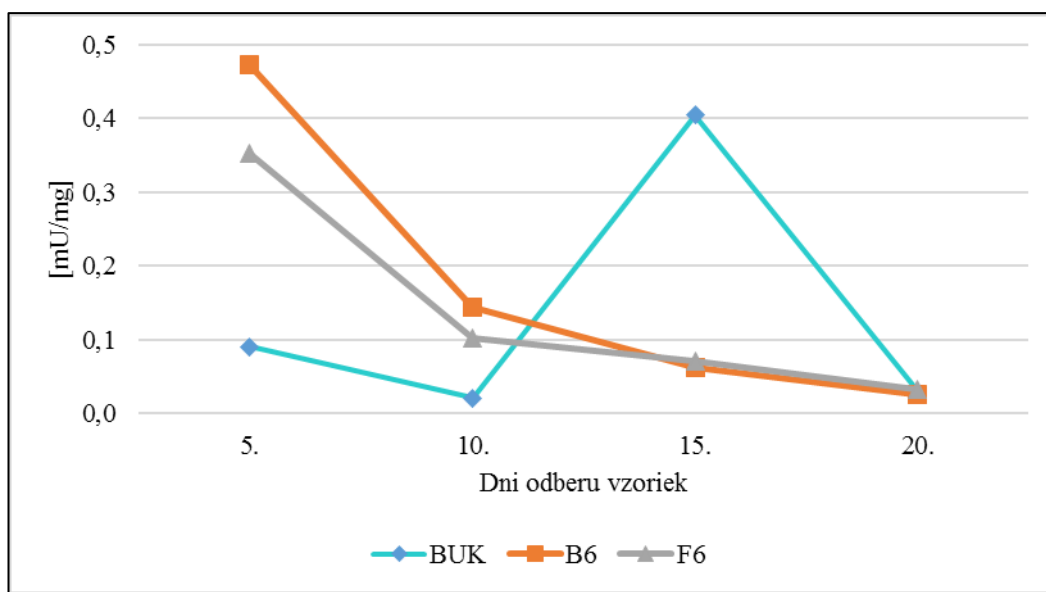
Graf 14 - Aktivita lakázy [mU/mg] v tekutých vzorkách u *Pleurotus eryngii*. Substráty – BUK, B6, F6 (viď tabuľka 7, str. 35)

Ako u *Pleurotus ostreatus*, tak aj *Pleurotus eryngii* mala najvyššiu aktivitu (viď graf 14) lakázy na začiatku vegetatívneho štádia, teda v 5. deň odberu pri variante s bukovými pilinami. Najvyššia nameraná hodnota bola 2,50 mU/mg, substráty B6 a F6 mali počas celej kolonizácie hodnoty enzymatickej aktivity nižšie ako 1,0 mU/mg.

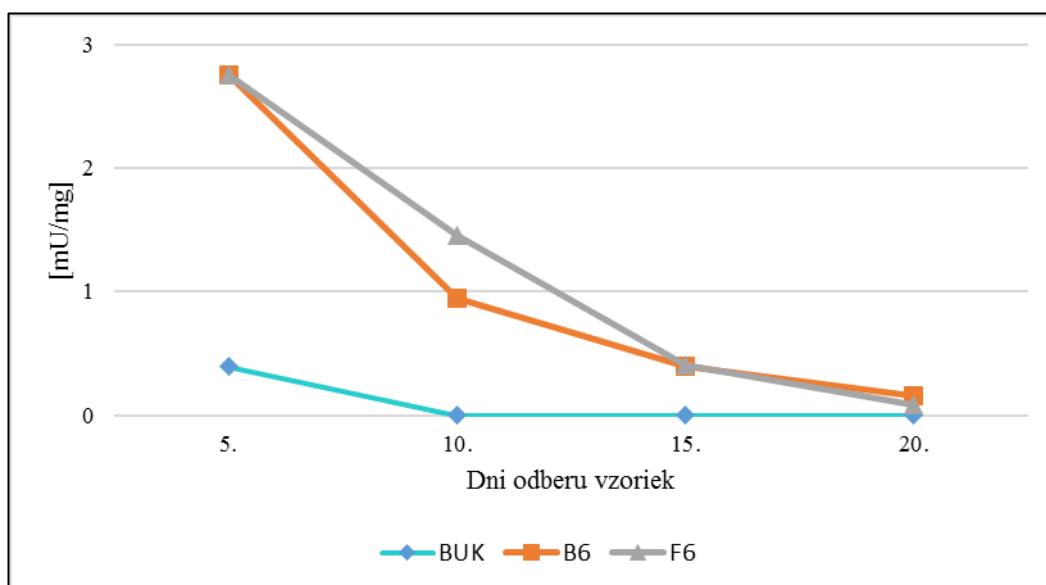


Graf 15 - Aktivita lakázy [mU/mg] v pevných vzorkách u *Pleurotus eryngii*. Substráty – BUK, B6, F6 (viď tabuľka 7, str. 35)

Mnohonásobne vyššia aktivita lakázy u všetkých substrátoch (BUK, B6, F6) bola zaznamenaná u *Pleurotus eryngii* v pevných vzorkách (viď graf 15) v porovnaní s nameranými hodnotami v tekutých vzorkách (viď graf 14). Pri metóde extrakcie z pevných vzoriek (Matsumura et al., 1986) je supernatant, z ktorého sú aktivity stanovené, koncentrovanejší. Z tohto dôvodu sú namerané hodnoty vyššie. Priebeh aktivity u *Pleurotus eryngii* v pevných vzorkách (viď graf 15) korešpondoval s priebehom aktivít v tekutých vzorkách (viď graf 14).



Graf 16 - Aktivita lakázy [mU/mg] v tekutých vzorkách u *Ganoderma lucidum*. Substráty – BUK, B6, F6 (viď tabuľka 7, str. 35)



Graf 17 - Aktivita lakázy [mU/mg] v pevných vzorkách u *Ganoderma lucidum*. Substráty – BUK, B6, F6 (viď tabuľka 7, str. 35)

U *Ganoderma lucidum* boli najvyššie hodnoty namerané u pevných vzoriek (vid' graf 17). Pri oboch metódach extrakcie mali B6 a F6 varianty substrátov vyššie aktivity ako bukové piliny, ale najvyššie hodnoty boli namerané na začiatku vegetatívneho štádia, teda 5. deň odberu, u B6 2,76 mU/mg a u F6 2,75 mU/mg. Nízke aktivity ligninolýtických enzýmov u *Ganoderma lucidum* boli popísané v Knežević et al. (2013), rôzne kmene *Ganoderma lucidum* mali rozdielne izoformy ligninolýtických enzýmov, čo je pripisované k vnútrošpecifickej rozdielnosti v produkcii týchto enzýmov.

Tabuľka 8 vyjadruje relatívny podiel [%] tekutej vzorky ku pevnej vzorke. Týmto spôsobom je možné vyjadriť, do akej miery bola extrakcia do tekutého pufu efektívna, v porovnaní s extrakciou u pevných vzoriek do supernatantu. Aktivity lakázy v pevných vzorkách boli u všetkých troch húb (*Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus eryngii* a *Ganoderma lucidum*) vyššie a to z dôvodu vyššej koncentrácie supernatantu oproti extrakčnému pufu.

Varianta	Dni kolonizácie	Substrát	ABTS t. v. Lakáza mU/mg	ABTS p. v. Lakáza mU/mg	Relatívny podiel t.v. ABTS/p.v.ABTS*100
P.O.	5	BUK	4,795	2,239	214%
P.O.	5	B6	0,315	2,030	16%
P.O.	5	F6	0,868	3,386	26%
P.E.	5	BUK	2,500	16,742	15%
P.E.	5	B6	0,839	2,909	29%
P.E.	5	F6	0,772	7,136	11%
G.L.	5	BUK	0,091	0,392	23%
G.L.	5	B6	0,473	2,756	17%
G.L.	5	F6	0,352	2,749	13%
P.O.	10	BUK	0,722	1,819	40%
P.O.	10	B6	0,176	10,161	2%
P.O.	10	F6	0,065	1,868	4%
P.E.	10	BUK	0,476	1,989	24%
P.E.	10	B6	0,647	4,665	14%
P.E.	10	F6	0,877	8,508	10%
G.L.	10	BUK	0,021	0,000	0%
G.L.	10	B6	0,144	0,951	15%
G.L.	10	F6	0,102	1,454	7%
P.O.	15	BUK	0,063	0,913	7%
P.O.	15	B6	0,019	0,751	2%
P.O.	15	F6	0,021	0,406	5%
P.E.	15	BUK	0,404	4,562	9%
P.E.	15	B6	0,566	2,090	27%
P.E.	15	F6	0,854	1,230	69%
G.L.	15	BUK	0,404	0,000	0%
G.L.	15	B6	0,063	0,399	16%
G.L.	15	F6	0,070	0,411	17%
P.O.	20	BUK	0,185	1,211	15%
P.O.	20	B6	0,028	0,659	4%
P.O.	20	F6	0,070	0,750	9%
P.E.	20	BUK	0,643	0,280	230%
P.E.	20	B6	0,578	9,991	6%
P.E.	20	F6	0,643	8,297	8%
G.L.	20	BUK	0,030	0,000	0%
G.L.	20	B6	0,025	0,152	17%
G.L.	20	F6	0,032	0,087	37%

Tabuľka 8 - Pomer vyextrahovaného enzýmu lakázy z pevných vzoriek ku tekutým vzorkám.

P. O. – *Pleurotus ostreatus*, P. E. – *Pleurotus eryngii*, G. O. – *Ganoderma lucidum*.

Substráty – BUK, B6, F6

U väčšiny húb bola najvyššia aktivita zaznamenaná na začiatku vegetatívneho štádia, tak ako popisujú Baldrian & Gabriel (2003); Velázquez-Cedeño et al. (2004); Savoie et al. (2007); Kurt and Buyukalaca (2010); Ruiz-Rodríguez et al. (2011), Bánfi et al. (2015). Vo všeobecnosti najvyššia aktivita bola zaznamenaná na bukových pilinách (vid' grafy 12, 13, 14, 16). Aktivita fermentovaných substrátov bola z veľkej časti minimálna (vid' grafy 12, 13, 14). Nízku enzymatickú aktivitu na ihličnatých pilinách je, s najväčšou pravdepodobnosťou, možné prisúdiť k zbytkovému obsahu prchavých organických látok v substráte, ktoré budú potlačovať aktivitu enzýmov. Fialho et al. (2010) preukázali, že prchavé organické látky produkované kvasinkou *Saccharomyces cerevisiae* sú schopné inhibovať aktivitu lakázy u parazitárnej huby *Guignardia citricarpa*, ktorá spôsobuje hubovú chorobu plodov citrusov. Jedným z dôvodov poklesu aktivity lakázy je krátka životnosť tohto enzýmu na pilinách.

Podľa Bánfi et al. (2015) hlavným dôvodom variability v aktivite enzýmu je nejednotná štruktúra mycélia zahrňujúca nerovnomernú distribúciu špičiek hýf, ktoré sú najaktívnejšou časťou hýfy húb s ohľadom na produkciu enzýmov. Veľké množstvá extracelulárnych enzýmov sú lokalizované v apikálnej časti hýf.

Ďalším dôvodom poklesu aktivity lakázy je to, že po počiatočnej fáze inkubácie enzýmu, produkcia enzýmu klesá, pretože sa lakáza v ďalšej fáze správa ako elektrónový akceptor, pričom vytvára voľné radikály, ktoré pokračujú v rozklade lignínu. Lakáza je schopná detoxifikovať azo farbivá cez vysoko nešpecifický mechanizmus voľných radikálov a zabraňuje formácii toxických aromatických amínov (Chivukula et al., 1995).

Množstvo a distribúcia ligninolytických enzýmov vo vnútri substrátu je takisto ovplyvnená niekoľkými úzko súvisiacimi podmienkami prostredia, ktoré vzájomne pôsobia jeden na druhého. Za prvé sú to všeobecné vlastnosti substrátu – hodnota pH, veľkosť a štruktúra materiálu, utlačenosť a hútnosť materiálu a množstvo použitej sadby na kolonizáciu substrátu. Všetky tieto vlastnosti môžu mať vplyv na produkciu enzýmov (D'Agostini et al., 2011). Za druhé, sú to externé podmienky (teplota, relatívna vlhkosť prostredia, ventilácia, atď.), ktoré takisto určujú životný cyklus huby počas kultivácie. Nakoniec metabolické procesy huby a mikroorganizmov regulujú vnútornú teplotu, hodnotu pH, relatívnu vlhkosť, CO₂ a O₂ obsah v substráte. Napriek striktnej kontrole vonkajších podmienok, homogénna distribúcia fyzikálno-chemických parametrov nemôže byť plne dosiahnutá vo vnútri substrátu ako sú piliny alebo slama (Bánfi et al., 2015).

Faktory uvedené vyššie prispievajú k rôznej produkcii lakázy na pilinách a vysvetľujú relatívne nízke aktivity enzýmu lakázy na týchto materiáloch, nakoľko prostredie a materiál sú vhodné pre úspešnú kolonizáciu substrátu, ale zároveň nedostatočné pre kontrolovanú produkciu ligninolytických enzýmov. Namerané hodnoty sú orientačné a korešpondujú s predpokladom, že prchavé látky v smrekových pilinách inhibujú produkciu týchto enzýmov.

6.5 Obsah C a N, pomer C : N

Vzorky	Obsah N	SD N	Obsah C	SD C	C : N	SD C : N
Fugát	3,46	0,08	34,19	0,12	8	3
Piliny čisté buk	0,11		47,18		423	
Piliny čisté smrek	0,07	0,01	46,11	0,31	701	78
Piliny smrekové nefermentované bez fugátu	0,06	0,01	46,29	0,07	516	110
Piliny smrekové nefermentované s fugátom	0,13	0,05	46,06	0,24	368	65
Piliny smrekové fermentované 3 týždne bez fugátu	0,07	0,02	46,21	0,09	684	174
Piliny smrekové fermentované 3 týždne s fugátom	0,13	0,01	45,85	0,24	361	33
Piliny smrekové fermentované 6 týždňov bez fugátu	0,10	0,02	46,11	0,07	490	96
Piliny smrekové fermentované 6 týždňov s fugátom	0,11	0,02	46,13	0,04	409	63
Piliny smrekové fermentované 9 týždňov bez fugátu	0,08	0,04	46,15	0,10	658	230
Piliny smrekové fermentované 9 týždňov s fugátom	0,11	0,03	46,63	0,09	388	31

Tabuľka 9 – Priemerný obsah N a C a pomer C : N v jednotlivých substrátoch

V tabuľke 9 je vidieť navýšenie obsahu dusíku v substrátoch obohatených o fugát, čo je dôkazom rovnomerného zapracovania fugátu do substrátu v príprave na fermentáciu. Zároveň toto navýšenie nebolo tak veľké aby významne zúžilo pomer C : N v substráte. Obsah dusíku vo fugáte je nízky, tak ako uvádza Kolář et al. (2009).

Rôzna doba fermentácie nezmenila obsah C v smrekových pilinách. Materiál teda nebol fermentáciou dodatočne rozložený. Na základe tohto údaju sa dá tvrdiť, že fermentácia je šetrný spôsob ako upraviť smrekové piliny pre kultiváciu jedlými a liečivými hubami bez toho aby sa materiál rozložil, čo by mohlo byť nežiadúce pre kultiváciu húb ako sú *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus eryngii* a *Ganoderma lucidum*.

Drevné pletivo obsahuje 0,03 až 1,0 % dusíku. Pomer C : N vo väčšine drevín je 350 - 500 : 1, pričom huby bielej hniloby sú schopné metabolizovať veľké množstvá uhl'ovodíkov počítajúc lignín v prítomnosti veľmi nízkeho obsahu dusíku v materiále (Oh et al., 2004).

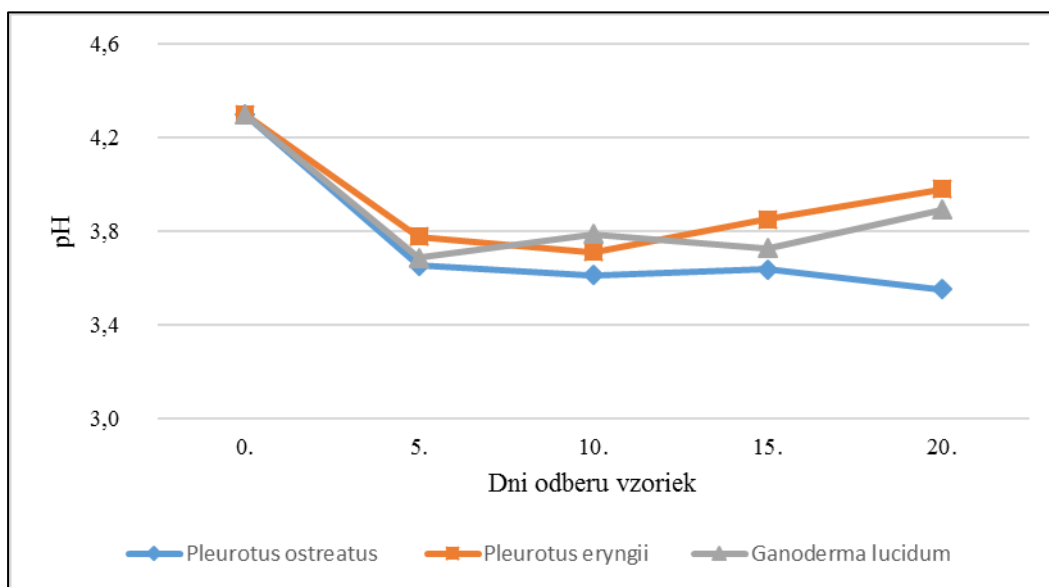
Extrémne úzky pomer C : N ako 5 : 1 znamená vyššiu produkciu enzýmu lakázy, ale redukovaný rast mycélia u *Pleurotus ostreatus*, čo predurčuje túto hubu byť hodnotnou pri rozklade organických zbytkov rastlín s vyšším obsahom lignínu (D'Agostini et al., 2011).

6.6 Zmena hodnoty pH substrátu počas kolonizácie substrátu jedlými a liečivými hubami

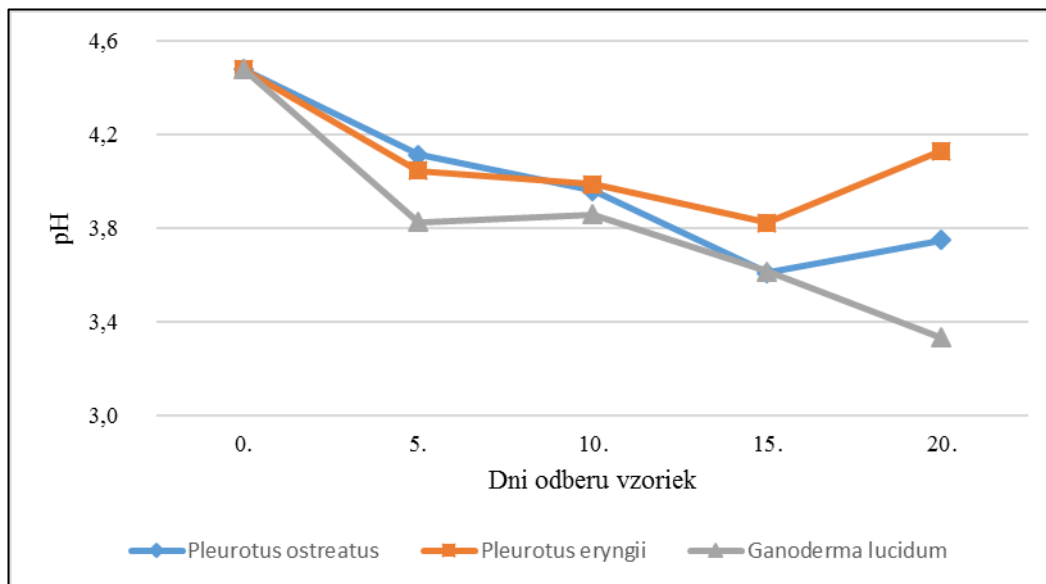
Ako poukazuje Stamets (1996) hodnota pH sa znižovala počas kolonizácie substrátu hubami. Relatívne malé zníženie hodnôt pH (viď grafy 18, 19, 20) počas celej kultivácie je možné pripísať ku krátkej dobe kolonizácie substrátu. Mierne zvýšenie hodnôt pH pri 20. dni odberu je pripisované neistote merania. Najväčší pokles hodnoty pH je možné pozorovať

pri všetkých variantách (vid'. grafy 18, 19, 20) na začiatku kultivácie, čiže od očkovania po 5. deň odberu. Toto korešponduje s aktivitami lakázy kultivovaných húb v jednotlivých substrátoch (vid' grafy 12, 13, 14, 15, 16).

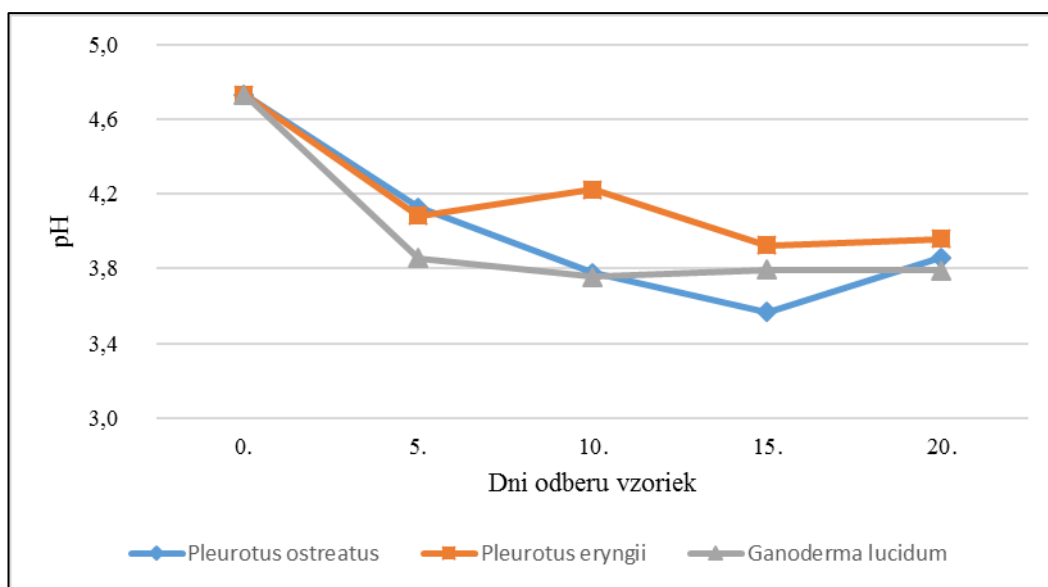
Ako uvádza Baldrián (2006), jednotlivé huby majú optimálnu hodnotu pH, pri ktorej produkujú enzým lakázu. Pre každú hubu je táto hodnota špecifická. U väčšiny húb je to kyslá hodnota pH. Pri oxidácii ABTS je hodnota pH u *Pleurotus ostreatus* 4.0 a *Pleurotus eryngii* 4.5.



Graf 18 - Zmena hodnoty pH počas kolonizácie bukových pilín po dobu 20 dní



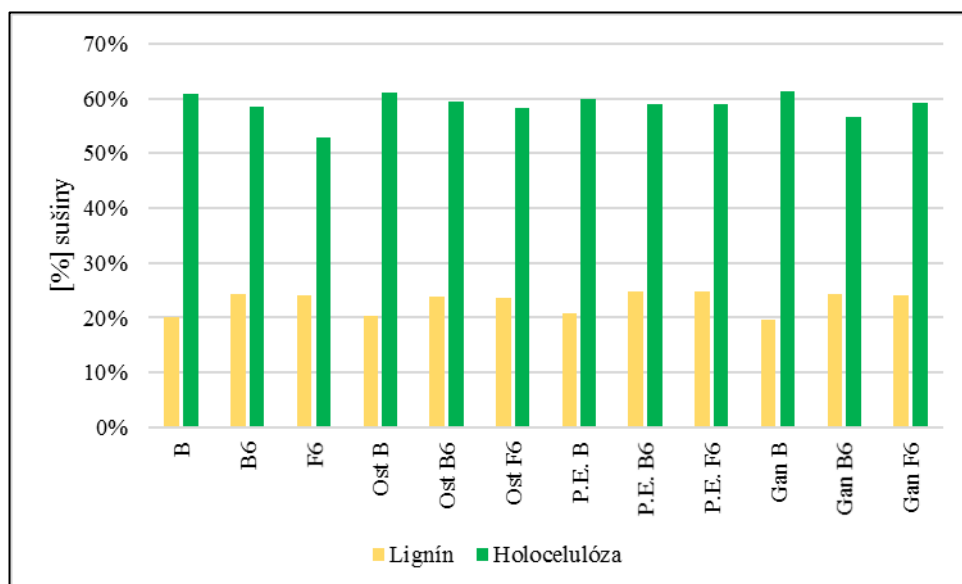
Graf 19 - Zmena hodnoty pH počas kolonizácie B6 (vid' tabuľka 7, str. 35) substrátu po dobu 20 dní



Graf 20 - Zmena hodnoty pH počas kolonizácie F6 (viď tabuľka 7, str. 35) substrátu po dobu 20 dní

6.7 Zmena obsahu lignínu počas kolonizácie substrátu jedlými a liečivými hubami

Obsah lignínu a holocelulózy sa počas 20 dňovej kolonizácie substrátu hubami výrazne nezmenil (viď graf 21). Toto je pripisované, ako v prípade hodnôt pH, ku krátkej dobe kolonizácie substrátu hubami.



Graf 21 - Relatívny obsah v sušine [%] lignínu a holocelulózy v substrátoch pred kolonizáciou a po 20 dňovej kolonizácii jedlými a liečivými hubami. P. O. – *Pleurotus ostreatus*, P. E. – *Pleurotus eryngii*, G. O. – *Ganoderma lucidum*. Substráty - BUK, B6, F6

Kerem et al. (1992) sledovali zmenu obsahu lignínu pri kultivácii húb *Pleurotus ostreatus* a *Phanerochaete chrysosporium*. *Phanerochaete chrysosporium* rástla intenzívne, čo vyústilo v rapidnú a neselektívnu degradáciu 55 % organických komponentov bavlníkových obalov semien v priebehu 15 dní. Naopak *Pleurotus ostreatus* rástla pomalšie s jasnou selektivitou pri rozklade lignínu, pričom rozklad bol iba 20 % organických komponentov po 30 dňoch.

Knežević et al. (2013) preukázali, že rozklad lignínu nekorešpondoval s aktivitou lignolytických enzýmov pri kultivácii *Pleurotus ostreatus* a *Pleurotus eryngii* na slame. Najvyššie hodnoty týchto enzýmov boli zaznamenané na začiatku vegetatívneho štádia, ale signifikantný rozklad lignínu bol zaznamenaný až po 40 dňoch kolonizácie substrátu.

Stanovenie celkového obsahu lignínu u Kerem et al. (1992) a Knežević et al. (2013) prebiehalo ako v diplomovej práci podľa Klasona.

7 Záver

Huby bielej hniloby sú ekologicky zaujímavé mikroorganizmy schopné konvertovať organické odpady z rôznych odvetví priemyslu v kultivačný substrát, na ktorom sa vyprodukujú plodnice húb, ktoré majú vysokú výživovú hodnotu a sú zdraviu prospešné.

Cieľom diplomovej práce bolo upraviť smrekové piliny fermentáciou a nájsť najvhodnejší substrát pre kultiváciu húb. Ako najlepšia varianta pri troch hubách *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus eryngii* a *Ganoderma lucidum* na základe rastových skúšok boli fermentované smrekové piliny po dobu 6 týždňov s prídavkom 5 % fugátu (F6) zo všetkých testovaných variant. Kolonizácia substrátu hubami bola štatisticky preukázateľne lepšia u tejto varianty ako u zvyšných a vo väčšine prípadov sa zhodovala s intenzitou kolonizácie u bukových pilín, ktoré slúžili ako kontrola. Na základe tohto tvrdenia je možné usúdiť, že výnosový potenciál plodníc F6 substrátu bude obdobný ako je tomu u bukových pilín.

Napriek tomu, že F6 substrát bol kolonizovaný hubami rovnako rýchlo ako bukové piliny, tak zväčša vykazoval nižšiu aktivitu lakázy, enzýmu schopného degradovať lignín, ako spomínané bukové piliny. Príčinou je pravdepodobne nedokonalé odbúranie prchavých organických látok počas fermentácie, ktoré sú schopné inhibovať aktivitu ligninolytických enzýmov. V tekutých vzorkách najvyššia aktivita 4,80 mU/mg lakázy bola zaznamenaná u *Pleurotus ostreatus* na bukových pilinách na začiatku vegetatívneho štádia rastu huby. V pevných vzorkách najvyššia aktivita 16,74 mU/mg bola zaznamenaná u *Pleurotus eryngii* na bukových pilinách takisto na začiatku vegetatívneho štádia rastu huby.

Bolo potvrdené, že fermentáciou smrekových pilín s 5 % prídavkom fugátu je možné upraviť smrekové piliny tak, aby boli úspešne kolonizované jedlými a liečivými hubami. Vysoký relatívny obsah živíc v substráte po 6. týždni fermentácie nemal vplyv na kolonizáciu substrátu mycéliom húb. Sú to prchavé organické látky inhibujúce rast mycélia húb a fermentáciou sú odbúrané. Pri ošetrení smrekových pilín 5 % fugátu klesol obsah prchavých organických látok z 31,86 mg/kg na 10,47 mg/kg oproti neošetrenej variante v 6. týždni fermentácie. Práve 6. týždeň je na základe rastových skúšok najvhodnejší pre kultiváciu jedlých a liečivých húb.

Dĺžka fermentácie bola skrátená o 3 týždne, čo pre pestovateľov v praxi môže znamenať lepšiu ekonomickú bilanciu pri využití tejto technológie.

Je nutné podotknúť, že sa jedná o pilotnú prácu v oblasti kultivácie jedlých a liečivých húb na smrekových pilinách. Momentálne neexistuje dostatok prác riešiacich túto problematiku. Pre budúci výskum by bolo vhodné stanoviť tzv. „biological efficiency“, čiže výnosový

potenciál substrátu tvorby plodníc jednotlivých húb u bukových pilín a F6 substrátu. Potom bude možné ekonomicky evaluovať účelnosť tejto metódy oproti zaužívaným technológiám. Jedná sa o vhodný spôsob kultivácie pre menšie podniky, ktoré disponujú prístupom k smrekovým pilinám. Český trh sa otvára aj menej známym druhom húb, čo v tomto prípade sú aj *Ganoderma ludicum* a *Pleurotus eryngii*. Pri vhodnom marketingu a dodržaní všetkých podmienok by tento spôsob kultivácie jedlých a liečivých húb mohol byť úspešne zaradený do produkcie ekologickej farmy v rámci diverzifikácie výroby.

Zdroje:

1. Abubaker, J., Risberg, K., Pell, M. 2012. Biogas residues as fertilisers – Effects on wheat growth and soil microbial activities. *Applied Energy*. 99. p. 126–134.
2. Andersson, B. E., T. Henrysson. 1996. Accumulation and degradation of dead-end metabolites during treatment of soil contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons with five strains of white-rot fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 46 (5-6). p. 647-652.
3. Asgher M., Bhatti H. N., Ashraf M., Legge R. L. 2008. Recent developments in biodegradation of industrial pollutants by white rot fungi and their enzyme system. *Biodegradation*. 19. p. 771-783.
4. Baldrian P. 2006. Fungal laccases – occurrence and properties. *FEMS Microbiology Review*, 30. p. 215-242.
5. Baldrian, P., Gabriel J. 2003. Lignocellulose degradation by *Pleurotus ostreatus* in the presence of cadmium. *FEMS Microbiology Letters*. 220. p. 235-240.
6. Bánfi, R., Pohner Z., Kovács J., Luzics S., Nagy A., Dudás M., Tanos P., Márialigeti K., Vajna B. 2015. Characterisation of the large-scale production process of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) with the analysis of succession and spatial heterogeneity of lignocellulolytic enzyme activities. *Fungal Biology*. 119 (12). p. 1354-1363.
7. Barney D. L. 1997. Growing mushrooms commercially - Risks and opportunities. Division of Agricultural Sciences and Natural resources, Oklahoma State University
8. Beetz A., Kustudia M. 2004. Mushroom cultivation and marketing. Horticulture production guide. [cit. 2017-17-3]. Dostupné z < www.attra.ncat.org >

9. Bhattacharjya D. K., Paul R. K., Miah M. N., Ahmed K. U. 2014. Effect of different saw dust substrates on the growth and yield of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) Journal of Agriculture and Veterinary Science. 2014. 7. p. 38-46.
10. Bisaria, R., Madan, M., Vasudevan, P. 1997. Utilization of agro-residues as animal feed through bioconversion. Bioresource Technology. 59. p.5-8.
11. Bishop, K. S., Chi H. J. KAO, Yuanye XU, Glucina M. P., Paterson R. R. M, Ferguson L. R. 2015. From 2000 years of *Ganoderma lucidum* to recent developments in nutraceuticals. Phytochemistry. 114. p. 56-65.
12. Bogan B. W., Lamar R. T. 1996. Polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading capabilities of *Phanerochaete laevis* HHB-1625 and its extracellular ligninolytic enzymes. Applied and Environmental Microbiology 62 (5). p. 1597-1603.
13. Cohen L., Persky Y., Hadar R. 2002. Biotechnological applications and potential of wood-degrading mushrooms of the genus *Pleurotus*. Applied Microbiology and Biotechnology. 58 (5). p. 582-594.
14. Cole, B. 2010, "Extractive Components of Wood", University of Maine, Maine. [cit. 2017-17-3]. Dostupné z <http://chemistry.umeche.maine.edu/Green/Afternoon/Cole.pdf>
15. Cotter, T. 2014. Organic Mushroom Farming and Mycoremediation: Simple to Advanced and Experimental Techniques for Indoor and Outdoor Cultivaiton. Chelsea Green Publishing. 400 p. ISBN 978-1603584555
16. Croan, S. C. 2004. Conversion of Conifer Wastes into Edible and Medicinal Mushrooms. Forest Products Journal. 54 (2). p. 68-76.
17. Český statistický úřad. Lesnictví – 2015. Publikované 24.5.2016. Praha. [cit. 2017-17-3]. Dostupné z < <https://www.czso.cz/csu/czso/lesnictvi-2015> >

18. Chan G., Chan W., Sze D. 2009 The effects of β -glucan on human immune and cancer cells. *Journal of Hematology & Oncology*. 2 (1). p. 25.
19. Chang S. T., Miles P. G. 1984. A new look at cultivated mushroom. *BioScience* 34. p. 358–362.
20. Chivukula M., Spadaro J. T., Renganathan V. 1995. Lignin peroxidase-catalyzed oxidation of sulfonated azo dyes generates novel sulfophenyl hydroperoxides. *Biochemistry* 34. p. 7765-7772.
21. D'Agostini, É. C., Mantovani T. R. D., Valle J. S., Paccola-Meirelles L. D., Colauto N. B., Linde G. A. 2011. Low carbon/nitrogen ratio increases laccase production from basidiomycetes in solid substrate cultivation. *Scientia Agricola*. 68 (3). p. 295-300.
22. Dai Y. J., Wang L. M., Jiang Z. F., Liu W. Z., Cheng C., Nan X. H., Liu X. P. 2014. The effect of cultivation material C/N ratio on the growth and biological conversion rate of *Pleurotus eryngii* mycelium. *Biotechnology, Agriculture, Environment and Energy*. p. 73 -76.
23. Dashtban, M., Schraft, H., Syed, T. A., & Qin, W. 2010. Fungal biodegradation and enzymatic modification of lignin. *International Journal of Biochemistry and Molecular Biology*. 1 (1). p. 36–50.
24. De Jong E., Cazemier A. E., Field J. A., De Bont J. A. M. 1994. Physiological role of chlorinated aryl alcohols biosynthesized de novo by the white rot fungus *Bjerkandera sp. strain BOS55*. *Applied and Environmental Microbiology*. 60. p. 271-277.
25. Donnelly K. C., Chen J. C., Huebner H. J., Brown K. W., Autenrieth R. L., Bonner J. S. 1997. utility of four white-rot fungi for the detoxification of 2,4,6-trinitrotoluene in liquid culture. *Environmental Toxicology Chemistry*. 16. p. 1105-1110.

26. Dorado J., Claassen van Beek F. W. T. A., Lenon G., Wijnberg J. B. P. A., Sierra-Alvarez R.. 2000. Elimination and detoxification of softwood extractives by white rot fungi. *Journal Biotechnology*. 80 (3). p. 231-240.

27. Elisashvili V., Chichua D., Kachlishvili E., Tsiklauri N., Khardziani T. 2003. Lignocellulolytic enzyme activity during growth and fruiting of the edible and medicinal mushroom *Pleurotus ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kumm. (*Agaricomycetideae*). *International Journal of Medicinal Mushrooms*. 5. p. 193–198.

28. Elisashvili V., Penninckx M., Kachlishvili E., Tsiklauri N., Metreveli E., Kharziani T., Kvesitadze G. 2008. *Lentinus edodes* and *Pleurotus* species lignocellulolytic enzymes activity in submerged and solid-state fermentation of lignocellulosic wastes of different composition. *Bioresouce Technology*. 99. p. 457-462.

29. Enguita F. J. 2011. Structural Biology of Fungal Multicopper Oxidases. *Mycofactories*. p. 57-72. ISBN 978-1-60805-309-4.

30. Fernández-Fueyo E., F. J Ruiz-Dueñas T Martínez A. 2014. Engineering a fungal peroxidase that degrades lignin at very acidic pH. *Biotechnology for Biofuels*. 7 (1). p. 114-117.

31. Fezzani, B., Cheikh, R. Ben. 2008. Optimisation of the mesophilic anaerobic co-digestion of olive mill wastewater with olive mill solid waste in a batch digester. *Desalination*. 228 (1-3). p. 159–167.

32. Fialho M. B., Ferreira L. F. R., Monteiro R. T. R., Pascholati S. F. 2010. Antimicrobial volatile organic compounds affect morphogenesis-related enzymes in *Guignardia citricarpa*, causal agent of citrus black spot. *Biocontrol Science and Technology* 21 (7). p. 797-807

33. Gianfreda L. et al. 1999. Laccases: A Useful Group of Oxidoreductive Enzymes. *Bioremediation Journal*. 3. p. 1-25.

34. Im C. H., Kim M. K., Kim K.H., Kim S.Y., Lee S.T., Heo J.Y., Kwon J.H., Kim D.S., Ryu J.S. 2013. Breeding of king oyster mushroom, *Pleurotus eryngii* with a high yield and earliness of harvest trait and its sensory test. Korean Journal Mycology. 41. p. 91-96.
35. Isikhuemhen O. S., Mikiashvilli N. A. 2009. Lignocellulolytic enzyme activity, substrate utilization, and mushroom yield by *Pleurotus ostreatus* cultivated on substrate containing anaerobic digester solids. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology. 36 (11). p. 1353-1362.
36. Habijanac J., Berovic M., Boh B., Plankl M., Wraber B. 2015. Submerged cultivation of *Ganoderma lucidum* and the effects of its polysaccharides on the production of human cytokines TNF- α , IL-12, IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-10 and IL-17. New Biotechnology. 32 (1). p. 85-95.
37. Hatakka, Annele. 1994. Lignin-modifying enzymes from selected white-rot fungi production and role from in lignin degradation. FEMS Microbiology Reviews. 13(2-3). p. 125-135.
38. Jablonský I. a Šašek V. 2006. Jedlé a léčivé houby pěstování a využití. Nakladatelství Brázda, Praha. ISBN 80-209-0341-0
39. Jiang S., Wang S., Sun Y., Zhang Q. 2014. Medicinal properties of *Hericium erinaceus* and its potential to formulate novel mushroom-based pharmaceuticals. Applied Microbiology and Biotechnology. 98 (18). p. 7661-7670.
40. Kerem Z., Friesem D., Hadar Y. 1992. Lignocellulose degradation during solid-state fermentation: *Pleurotus ostreatus* versus *Phanerochaete chrysosporium*
41. Kidd P. M. 2000. The use of mushroom glucans and proteoglycans in cancer treatment Alternative Medicine Review. 5 (1). p. 4-27.

42. Knežević A., Milovanović I., Stajić M., Lončar N., Brčeski I., Vukojević J., Čiledrižić J. 2013. Lignin degradation by selected fungal species. *Biosource Technology*. 138. p. 117-123.
43. Kolář, L., Kužel, S., Peterka, J., Borová-Batt, J. 2010. Agrochemical value of the liquid phase of wastes from fermenters during biogas production. *Plant, Soil and Environment*. 56 (1). p. 23-27.
44. Kolář, L., Vaněk, V., Kužel, S., Štindl, P. 2009. Využití odpadů z bioplynových stanic. Sborník z 15. konference. Racionální použití hnojiv zaměřené na půdní úrodnost, organickou hmotu v půdě a použití statkových a minerálních hnojiv. Česká zemědělská univerzita v Praze. Praha. 151 s. ISBN: 9788021320062.
45. Kumar, S., Mishra, A. 2011. Optimization of laccase production from WRF-1 on groundnut shell and cyanobacterial biomass: By application of Box-Behnken experimental design. *Journal of Microbiology and Biotechnology Resources*. 1. p. 33-53.
46. Kurt S., Buyukalaca S. 2010. Yield performances and changes in enzyme activities of *Pleurotus spp.* (*P. ostreatus* and *P. sajor-caju*) cultivated on different agricultural wastes. *Bioresource Technology*. 101. p. 3164-3169.
47. Laborde J. 1995. Dossier *Pleurote*. INRA, Centre de Recherches de Bordeaux. Station de Recherches sur les Champignons. Bordeaux. p. 17–18.
48. Mantovani, T. R. D., Linde, G. A., Colauto, N. B. 2007. Effect of the addition of nitrogen sources to cassava fiber and carbon-to-nitrogen ratios on *Agaricus brasiliensis* growth. *Canadian Journal of Microbiology*. 53. p. 139-143.

49. Marada, P., Večeřová, V., Kamarád, L., Dundálková, P., Mareček, J. 2008. Příručka pro nakládání s digestátem a fugátem. Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně Institut celoživotního vzdělávání ve spolupráci s Ústavem zemědělské, potravinářské a environmentální techniky. Brno. 30 s.
50. Martínát S., Navrátil J., Dvořák P., Horst D. V. D., Klusáček P., Kunc J., Frantál B. 2016. Where AD plants wildly grow: The spatio-temporal diffusion of agricultural biogas production in the Czech Republic.
51. Martínez A. T., Speranza M., Ruiz-Duenas F. J., Ferreira P., Camarero S., Guillen F., Martínez M. J., Gutierrez A., del Rio J. C. 2005. Biodegradation of lignocellulosics: microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. *International Microbiology*. 8 (3). p. 195-204.
52. Martínez A. T. 2002. Molecular biology and structure-function of lignin-degrading heme peroxidases; *Enzyme and Microbial Technology*. 30 (4). p. 425-444.
53. Martínez-Inigo, M.J., Immerzeel P., Gutierrez A., Carlos del Rio J., Sierra-Alvarez J. 1999. Biodegradability of extractives in sapwood and heartwood from Scots pine by sapstain and white-rot fungi. *Holzforschung*. 53. p. 247-252.
54. Martínez M. J., Ruiz-Duenas F. J., Guillen F., Martínez A. T. 1996. Purification and catalytic properties of two manganese peroxidase isoenzymes from *Pleurotus eryngii* *European Journal Biochemistry*. 237. p. 424-432.
55. Matsumura E, Yamamoto E, Numata A, Kawano T, Shin T, Murao S. 1986. Structures of the laccasecatalysed oxidation products of hydroxybenzoic acids in the presence of ABTS. *Japan society for bioscience, biotechnology and agrochemistry. Agricultural and Biological Chemistry*. 50 (5). p. 1355–1357.

56. McMullan G., Meehan C., Conneely A., Kirby N., Robinson T., Nigam P., Banat I. M., Marchant R., Smyth W. F. 2001. Microbial decolourisation and degradation of textile dyes. *Applied Microbiology Biotechnology*. 56. p. 81-101.
57. Mikiashvili, N., Elisashvili, V., Wasser, S., Nevo, E. 2005. Carbon and nitrogen sources influence the ligninolytic enzyme activity of *Trametes versicolor*. *Biotechnology Letters*. 27. p. 955-959.
58. Mizuno T, Zhuang C. 1995. Maitake, *Grifola frondosa*: Pharmacological effects. *Food Review International (Special Issue)*. 11. p. 135-149.
59. Moldes, D., Gallego, P. P., Rodríguez-Couto, S., Sanroman, A. 2003. Grape seeds: The best lignocellulosic waste to produce laccase by solid state cultures of *Trametes hirsuta*. *Biotechnology Letters*. 25. p. 491-495.
60. Morais M. H., Ramos A. C., Matos N., Santos-Oliveira E. J. 2000. Production of shiitake mushroom (*Lentinus edodes*) on ligninocellulosic residues: note. *Food Science Technology International*. 6. p. 123–128.
61. Moreira P. R., Bouillenne F., Almeida-Vara E., Malcata F. X., Frere J. M., Duarte J. C. 2006. Purification, kinetics and spectral characterisation of a new versatile peroxidase from a *Bjerkandera sp.* isolate. *Enzyme and Microbial Technology*. 38. p. 28-33.
62. Moreira P. R., Duez C., Dehareng D., Antunes A., Almeida-Vara E., Frere J. M., Malcata F. X., Duarte J. C. 2005. Molecular characterisation of a versatile peroxidase from a *Bjerkandera* strain. *Journal of Biotechnology*. 118. p. 339-352.
63. Neifar, M., Kamoun, A., Jaouani, A., EllouzeGhorbel, R., Ellouze-Chaabouni, S. 2011. Application of asymmetrical and Hoke designs for optimization of laccase production by the white-rot fungus *Fomes fomentarius* in solid-state fermentation. *Enzyme Research*.

64. Novák, M. a V. Vetvička. 2008. β -Glucans, History, and the Present: Immunomodulatory Aspects and Mechanisms of Action. *Journal of Immunotoxicology*. 5 (1). p. 47-57.
65. Novotný C., Vyas B. R. M., Erbanová P., Kubatová A., Šašek, V. 1997. Removal of PCBs by various white rotfungi (WRF) in liquid cultures. *Folia Microbiol.* 42. p. 136-140.
66. Odpadový hospodář. 2016. Odpady z lesnické a dřevozpracující výroby. [cit. 2017-17-3] Dostupné z < <http://odpadovy-hospodar.cz/komunalni-odpady/odpady-z-lesnicke-a-drevozpracujici-vyroby>>
67. Oei, P. 2016. Mushroom Cultivation IV - Appropriate technologies for mushroom growers. ECO Consult Foundation. Culemborg. 331 p. ISBN: 9082512904.
68. Oh S. J., Park J. S., Shin P. G., Yoo Y. B., Jhune C. S. 2004. An improved compost using cotton waste and fermented sawdust substrate for cultivation of oyster mushroom. *Mycobiology*. 32 (3). p. 115-118.
69. Paszynski A., Crawford R. L. 1995. Potencial for bioremediation of xenobiotic compounds by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Biotechnology Program* 11, p. 368-379.
70. Patel Y., Naraiian R., Singh V. K. 2012. Medicinal Properties of *Pleurotus* Species (Oyster Mushroom): A Review. *World Journal of Fungal and Plant Biology*. 3 (1). p. 1-12.
71. Philippoussis A., Zervakis G., Diamantopoulou P. 2001. Bioconversion of agricultural lignocellulosic wastes through the cultivation of the edible mushroom *Agrocybe aegerita*, *Volvariella volvacea* and *Pleurotus* spp. *World Journal Microbiology Biotechnology*. 17. p. 191–200.

72. Piontek K., Smith A. T., Blodig W. 2001. Lignin peroxidase structure and function. *Biochemical Society Transactions*. 29. p. 111-116.
73. Pointing S. B. 2001. Feasibility of bioremediation by white-rot fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 57 (1-2). p. 20-33.
74. Rabinovich M. L., Bolobova A. V., Vasilchenko L. G. 2004. Fungal decomposition of natural aromatic structures and xenobiotics. *Applied Biochemistry Microbiology*. 40. p. 1-17.
75. Rajarathnam, S., Bano, Z. 1989. *Pleurotus* Mushrooms. Part III. Biotransformations of natural lignocellulosic wastes: commercial applications and implications. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 28. p. 31-113.
76. Rawte H., Diwan R. 2011. Growth response of *Pleurotus spp.* on different basal media and different pH levels. *Journal of Ecobiotechnology*. 3 (4). p. 10-12.
77. Risdianto, H., Suhardi, S. H., Setiadi, T., Kokugan, T. 2010. The influence of temperature on laccase production in solid state fermentation by using white rot fungus *Marasmius sp.* The 1st international seminar on fundamental and application ISFA ChE 2010 of Chemical Engineering.
78. Royse D. 2002. Influence of spawn rate and commercial delayed release nutrient levels on *Pleurotus cornucopiae* (oyster mushroom) yield, size, and time to production. *Applied Microbiology Biotechnology*. 58. p. 527-531.
79. Royse D. 2007. ICT WebDevelopment. [cit. 2017-17-3]. Dostupné na <<http://www.ppath.cas.psu.edu/FACULTY/royse.htm>>
80. Rühl M, Fischer Ch, Kües U. 2008. Ligninolytic enzyme activities alternate with mushrooms production during industrial cultivation of *Pleurotus ostreatus* on wheat-straw-based substrate. *Current Trends Biotechnology Pharmacy*. 4. p. 478-492.

81. Ruiz-Rodríguez A., Polonia I., Soler-Rivas C., Wichers H. J. 2011. Ligninolytic enzymes activities of oyster mushrooms cultivated on OMW (olive mill waste) supplemented media, spawn and substrates. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 65. p. 285-293.
82. Sánchez C. 2004. Modern aspects of mushrooms culture technology. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 64. p. 756–762.
83. Sánchez, C. 2010 Cultivation of *Pleurotus ostreatus* and other edible mushrooms. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 85 (5). p. 1321-1337.
84. Sarangi I., Ghosh D., Bhutia S. K., Mallick S. K., Maiti T. K. 2006. Anti-tumor and immunomodulating effects of *Pleurotus ostreatus* mycelia-derived proteoglycans. *International Immunopharmacology*. 6 (8). p. 1287-1297.
85. Sarkar S., Martinez A. T., Martinez M. J. 1997. Biochemical and molecular characterization of a manganese peroxidase isoenzyme from *Pleurotus ostreatus*. *Biochimica et Biophysica acta*. 1339. p. 23-30.
86. Savoie J. M., Salmones D., Mata G. 2007. Hydrogen peroxide concentration measured in cultivation substrates during growth and fruiting of the mushrooms *Agaricus bisporus* and *Pleurotus spp* *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 87. p. 1337-1344.
87. Shamtsyan M. M., Konusova V.G., Goloshchev A.M., Maksimova Y.O., Panchenko A.V., Petrishchev N.N., et al. 2004. Immunomodulating and anti-tumor effects of basidiomycetes *Pleurotus ostreatus* (jacq.: fr.) *P. Kumm.* and *P. cornucopiae* (Pau. Ex Pers.) *Rollan Journal of Biological Physics and Chemistry*. 4 (3). p. 157-161.
88. Sharma P. et al. 2007. Bacterial laccases. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. 23. p. 823-832.

89. Schattauer A., Weiland P. 2006. Grundlagen der anaeroben Fermentation. Biogasgewinnung und Nutzung. Institut für Energetik und Umwelt gGmbH. Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e.V. (FNR). p. 25-35. ISBN 3-00-014333-5.
90. Scheibner K., Hofrichter M. 1998. Conversion of aminonitrotoluenes by fungal manganese peroxidases. Journal Basic Microbiology. 38. p. 51-59.
91. Schievano, F. Adani, F. Tambone, G. D'Imporzano, B. Scaglia, P. 2009. Anaerobic Digestion: opportunity for agriculture and environment. Regione Lombardia. Italy, p. 577-583. ISBN 9788890374609.
92. Singer H., Müller S., Tixier C., Pillonel L. 2002. Triclosan: occurrence and fate of a widely used biocide in the aquatic environment: field measurements in wastewater treatment plants, surface waters, and lake sediments. Environmental Science & Technology. 36. p. 4998-5004.
93. Sonnenberg, A.S. M., Baars J. J. P., Gao W., Visser R. G. F. 2017. Developments in breeding of *Agaricus bisporus* var. *bisporus*: progress made and technical and legal hurdles to take. Applied Microbiology and Biotechnology. 101 (5). p. 1819-1829.
94. Stamets, P. 1996. Growing Gourmet and Medicinal Mushrooms. Ten Speed Press. Toronto. 551 p. ISBN: 1-58008.175-4.
95. Stenius, P. 2000. Papermaking science and technology. Book 3. Forest products chemistry. Fapet. Helsinki.
96. Stiborová M., a kol. 1999. Význam cytochromu P450 pro lidské zdraví. Chemické Listy. 93. str. 229.
97. Šušla M. a Svobodová K. 2006. Ligninolytické enzymy jako účinné nástroje pro biodegradaci obtížně rozložitelných organopolutantů. Chemické Listy. 100. str. 889-895.

98. Tesfaw, A., Tadesse A., Kiros G. 2015. Optimization of oyster (*Pleurotus ostreatus*) mushroom cultivation using locally available substrates and materials in Debre Berhan, Ethiopia. *Journal of Applied Biology and Biotechnology*. p. 15-20.
99. Thevasingh M., Wanchai P., Kyung W. C. 2005. Shitake bag cultivation in Thailand. *Mushroom Growers' Handbook 2*. MushWorld. p. 110-120.
100. Van Beek T. A., Kuster B., Chassen F. W., Tienvieri T., Bertaud F., Lenon G., et al. 2007. Fungal biotreatment of spruce wood with *Trametes versicolor* for pitch control: influence of extractive contents, pulping process parameters, paper quality and effluent toxicity. *Bioresource Technology*. 98 (2). p. 302–311.
101. Velázquez-Cedeño M. A., Farnet A. M., Ferré E., Savoie J. M. 2004. Variations of lignocellulosic activities in dual cultures of *Pleurotus ostreatus* and *Trichoderma longibrachiatum* on unsterilized wheat straw *Mycologia*. 96. p. 712-719.
102. Vyas B. R. M., Bakowski S., Sasek V., Matucha M. 1994. Degradation of anthracene by selected white rot fungi. *FEMS Microbiology Ecology*. 14. p. 65–70.
103. Wang H., Gao J., Ng T. B. 2000. A new lectin with highly potent antihepatoma and antisarcoma activities from the oyster mushroom *Pleurotus ostreatus*. *Biochemical Biophysical Research Communications*. 275 (2). p. 810-816.
104. Wasser S. P. Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. 2002. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 60 (3). p. 258-274.
105. Wasser S. P., Weis A. L.. 1999. Therapeutic effect of substances occurring in higher basidiomycetes mushrooms: a modern perspective. *Critical Reviews in Immunology*. 19 (1). p. 65-96.
106. Wei, Hui, Q. Xu, L. E. Taylor, J. O. Baker, M. P. Tucker, S. Ding. 2009. Natural paradigms of plant cell wall degradation. *Current Opinion in Biotechnology*. 20 (3). p. 330-338.

107. Wesenberg D, Kyriakides I, Agathos S. N. 2003. White-rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents. *Biotechnology Advanced*. 22. p. 161-187.
108. Wong D. W. 2009. Structure and action mechanism of ligninolytic enzymes. *Applied Biochemistry Biotechnology*. 157. p. 174-209.
109. Yang G., Jaakkola P. 2011. Wood chemistry and isolation of extractives from wood. Literature study for BIOTULI project. Saimaa University of Applied Sciences, Finland.
110. Zhao C., Sun H., Tong X., Qi Y. 2003 An antitumour lectin from the edible mushroom *Agrocybe aegerita*. *Biochemical Journal*. 374 (2). p. 321-327.

8 Zoznam obrázkov

Obrázok 1 - Kompletná kultivácia a zber húb (Stamets, 1996)	6
Obrázok 2 - <i>Pleurotus ostreatus</i> (Jacq.) P. Kumm. (Foto: Jablonský).....	14
Obrázok 3 - <i>Pleurotus eryngii</i> (DC.) Quél. (Foto: Jablonský)	17
Obrázok 4 - <i>Hericium erinaceus</i> (Bull.) Pers. (Foto: Jablonský).....	19
Obrázok 5 - <i>Ganoderma lucidum</i> (Curtis) P. Carst. (Foto: Jablonský).....	21
Obrázok 6 - Štruktúra lignínu (Stiborová et al., 1999).....	24
Obrázok 7 - Všeobecný reakčný mechanizmus lakáz (Enguita, 2011)	27
Obrázok 8 - Katalytický cyklus lignínperoxidázy (Šušla a Svobodová, 2006).....	29
Obrázok 9 - Katalytický cyklus mangán dependentnej peroxidázy (Šušla a Svobodová, 2006)	30
Obrázok 10 - Spôsob kultivovania húb do komínkov pre stanovenie enzymatickej aktivity (autor).....	40

9 Zoznam grafov

Graf 1 - Vplyv kyslého prostredia na produkciu rôznych peroxidáz produkovaných hubami bielej hniloby (Fernández-Fueyo et al. 2014).....	9
Graf 2 - Vzťah medzi produkciou lakázy huby <i>Pleurotus ostreatus</i> a pomeru C: N kultivovaného média (D'Agostini et al., 2011)	10
Graf 3 - Vzťah medzi rastom mycélia huby <i>Pleurotus ostreatus</i> a pomeru C: N kultivovaného média (D'Agostini et al., 2011).....	11
Graf 4 - Namerané hodnoty enzymatickej aktivity lakázy huby <i>Pleurotus ostreatus</i> v rôznom čase od inokulácie substrátu (Bánfi et al., 2015)	28
Graf 5 - Namerané hodnoty enzymatickej aktivity mangán dependentnej peroxidázy huby <i>Pleurotus ostreatus</i> v rôznom čase od inokulácie substrátu (Bánfi et al., 2015).....	31
Graf 6 - Intenzita rastu mycélia [mm] jednotlivých húb na bukových pilinách	50
Graf 7 - Intenzita rastu mycélia [mm] <i>Pleurotus ostreatus</i> , <i>Pleurotus eryngii</i> , <i>Ganoderma lucidum</i> na substrátoch.....	51
Graf 8 - Intenzita rastu mycélia [mm] <i>Pleurotus ostreatus</i> , <i>Pleurotus eryngii</i> , <i>Ganoderma lucidum</i> na substrátoch obohatených o 20 % pšeničných otrúb (P20) a na neobohatených substrátoch o pšeničné otruby (P0).....	53
Graf 9 - Zmeny obsahu prchavých organických látok v sušine [mg/kg] fermentovaných pilín	54

Graf 10 - Zmeny v relatívnom obsahu živíc v sušine [%] fermentovaných pilín.....	56
Graf 11 - Zmeny v relatívnom obsahu v sušine [%] popola, trieslovín, živíc [%] v sušine počas kolonizácie substrátov hubami.....	56
Graf 12 - Aktivita lakázy [mU/mg] v tekutých vzorkách u <i>Pleurotus ostreatus</i>	57
Graf 13 - Aktivita lakázy [mU/mg] v pevných vzorkách u <i>Pleurotus ostreatus</i>	57
Graf 14 - Aktivita lakázy [mU/mg] v tekutých vzorkách u <i>Pleurotus eryngii</i>	58
Graf 15 - Aktivita lakázy [mU/mg] v pevných vzorkách u <i>Pleurotus eryngii</i>	58
Graf 16 - Aktivita lakázy [mU/mg] v tekutých vzorkách u <i>Ganoderma lucidum</i>	59
Graf 17 - Aktivita lakázy [mU/mg] v pevných vzorkách u <i>Ganoderma lucidum</i>	59
Graf 18 - Zmena hodnoty pH počas kolonizácie bukových pilín po dobu 20 dní.....	64
Graf 19 - Zmena hodnoty pH počas kolonizácie B6 substrátu po dobu 20 dní.....	64
Graf 20 - Zmena hodnoty pH počas kolonizácie F6 substrátu po dobu 20 dní.....	65
Graf 21 - Relatívny obsah v sušine [%] lignínu a holocelulózy v substrátoch pred kolonizáciou a po 20 dňovej kolonizácii.....	65

10 Zoznam tabuliek

Tabuľka 1 - Rozdiel v type dreva a obsahu extraktívnych komponentov (Cole, 2010).....	11
Tabuľka 2 - Klasifikácia hlavných terpenových štruktúr vyskytujúcich sa v dreve (Stenius, 2000).....	12
Tabuľka 3 - Rastové parametre pre <i>Pleurotus ostreatus</i> (Stamets, 1996).....	16
Tabuľka 4 - Rastové parametre pre <i>Pleurotus eryngii</i> (Stamets, 1996).....	18
Tabuľka 5 - Rastové parametre pre <i>Hericium erinaceus</i> (Stamets, 1996).....	20
Tabuľka 6 - Rastové parametre pre <i>Ganoderma lucidum</i> (Stamets, 1996).....	22
Tabuľka 7 - Jednotlivé varianty substrátov používaných pri pokusoch.....	35
Tabuľka 8 - Pomer vyextrahovaného enzýmu lakázy z pevných vzoriek ku tekutým vzorkám.....	61
Tabuľka 9 – Priemerný obsah N a C a pomer C : N v jednotlivých substrátoch.....	63

11 Prílohy

Druh huby	Substrát	Priemerný denný prírastok mycélia [mm]	SD prírastku mycélia [mm]
<i>Pleurotus ostreatus</i>	Buk	5,13	0,42
<i>Pleurotus eryngii</i>	Buk	4,77	0,38
<i>Ganoderma lucidum</i>	Buk	5,07	0,48
<i>Hericium erinaceus</i>	Buk	5,07	0,31

Príloha 1 - Intenzita rastu jednotlivých húb na bukových pilinách. Prepočet prírastku na deň [mm]

Druh huby	Substrát	Priemerný denný prírastok mycélia [mm]	SD prírastku mycélia [mm]
<i>Pleurotus ostreatus</i>	Smrek	5,10	0,20
<i>Pleurotus ostreatus</i>	Buk	5,54	0,10
<i>Pleurotus ostreatus</i>	B3	5,01	0,09
<i>Pleurotus ostreatus</i>	B6	5,13	0,08
<i>Pleurotus ostreatus</i>	B9	5,09	0,07
<i>Pleurotus ostreatus</i>	F3	5,49	0,09
<i>Pleurotus ostreatus</i>	F6	5,64	0,42
<i>Pleurotus ostreatus</i>	F9	5,28	0,09
<i>Pleurotus eryngii</i>	Smrek	3,35	0,04
<i>Pleurotus eryngii</i>	Buk	4,10	0,13
<i>Pleurotus eryngii</i>	B3	3,39	0,14
<i>Pleurotus eryngii</i>	B6	3,60	0,08
<i>Pleurotus eryngii</i>	B9	3,61	0,07
<i>Pleurotus eryngii</i>	F3	3,78	0,08
<i>Pleurotus eryngii</i>	F6	4,19	0,12
<i>Pleurotus eryngii</i>	F9	3,93	0,13
<i>Ganoderma lucidum</i>	Smrek	3,70	0,07
<i>Ganoderma lucidum</i>	Buk	4,55	0,15
<i>Ganoderma lucidum</i>	B3	4,13	0,05
<i>Ganoderma lucidum</i>	B6	3,96	0,07
<i>Ganoderma lucidum</i>	B9	3,71	0,12
<i>Ganoderma lucidum</i>	F3	4,28	0,06
<i>Ganoderma lucidum</i>	F6	4,60	0,09
<i>Ganoderma lucidum</i>	F9	3,51	0,21

Príloha 2 - Intenzita rastu jednotlivých húb na rôznych variantách substrátov – SMREK, BUK, B3, B6, B9, F3, F6, F9 (viď tabuľka 7, str. 35). Prepočet prírastku na deň [mm]

Druh huby	Substrát	Prídavok pšeničných otrúb	Priemerný denný prírastok mycélia [mm]	SD prírastku mycélia [mm]
<i>Pleurotus ostreatus</i>	Smrek	0	5,10	0,20
<i>Pleurotus eryngii</i>	Smrek	0	3,35	0,04
<i>Ganoderma lucidum</i>	Smrek	0	3,70	0,07
<i>Pleurotus ostreatus</i>	Buk	0	5,54	0,10
<i>Pleurotus eryngii</i>	Buk	0	4,10	0,13
<i>Ganoderma lucidum</i>	Buk	0	4,55	0,15
<i>Pleurotus ostreatus</i>	B6	0	5,13	0,08
<i>Pleurotus eryngii</i>	B6	0	3,60	0,08
<i>Ganoderma lucidum</i>	B6	0	3,96	0,07
<i>Pleurotus ostreatus</i>	F6	0	5,64	0,42
<i>Pleurotus eryngii</i>	F6	0	4,19	0,12
<i>Ganoderma lucidum</i>	F6	0	4,60	0,09
<i>Pleurotus ostreatus</i>	Smrek	20	5,43	0,08
<i>Pleurotus eryngii</i>	Smrek	20	3,59	0,07
<i>Ganoderma lucidum</i>	Smrek	20	5,18	0,15
<i>Pleurotus ostreatus</i>	Buk	20	6,18	0,07
<i>Pleurotus eryngii</i>	Buk	20	4,87	0,05
<i>Ganoderma lucidum</i>	Buk	20	5,93	0,01
<i>Pleurotus ostreatus</i>	B6	20	6,19	0,07
<i>Pleurotus eryngii</i>	B6	20	4,53	0,15
<i>Ganoderma lucidum</i>	B6	20	5,16	0,03
<i>Pleurotus ostreatus</i>	F6	20	6,27	0,08
<i>Pleurotus eryngii</i>	F6	20	4,46	0,04
<i>Ganoderma lucidum</i>	F6	20	5,41	0,02

Príloha 3 - Intenzita rastu jednotlivých húb na rôznych variantách substrátov - SMREK, BUK, B6, F6 (viď tabuľka 7, str. 35). Obohatené 20 % prídavkom pšeničných otrúb (P20) alebo bez prídavku pšeničných otrúb (P0), prepočet prírastku na deň [mm]

Druh huby	Prírastok na deň [mm] (Priemer)	a
<i>Pleurotus eryngii</i>	5,32	****
<i>Ganoderma ludicum</i>	5,49	****
<i>Hericium erinaceus</i>	5,50	****
<i>Pleurotus ostreatus</i>	5,64	****

Príloha 4 - Fisherov LSD test, intenzita rastu jednotlivých húb na bukových pilinách, prepočet prírastku na deň [mm]

Druh huby	Substrát	Prírastok na deň [mm]	a	b	c	d	e	f	g	h	i	j	k
<i>Pleurotus eryngii</i>	Smrek	3,35	****										
<i>Pleurotus eryngii</i>	B3	3,39	****										
<i>Ganoderma lucidum</i>	F9	3,51	****	****									
<i>Pleurotus eryngii</i>	B6	3,60	****	****	****								
<i>Pleurotus eryngii</i>	B9	3,61	****	****	****								
<i>Ganoderma lucidum</i>	Smrek	3,70	****	****	****	****							
<i>Ganoderma lucidum</i>	B9	3,71	****	****	****	****							
<i>Pleurotus eryngii</i>	F3	3,78		****	****	****	****						
<i>Pleurotus eryngii</i>	F9	3,93			****	****	****	****					
<i>Ganoderma lucidum</i>	B6	3,96			****	****	****	****					
<i>Pleurotus eryngii</i>	Buk	4,10				****	****	****					
<i>Ganoderma lucidum</i>	B3	4,13					****	****					
<i>Pleurotus eryngii</i>	F6	4,19						****	****				
<i>Ganoderma lucidum</i>	F3	4,28						****	****	****			
<i>Ganoderma lucidum</i>	Buk	4,55							****	****			
<i>Ganoderma lucidum</i>	F6	4,60								****			
<i>Pleurotus ostreatus</i>	B3	5,01									****		
<i>Pleurotus ostreatus</i>	B9	5,09									****		
<i>Pleurotus ostreatus</i>	Smrek	5,10									****	****	
<i>Pleurotus ostreatus</i>	B6	5,13									****	****	
<i>Pleurotus ostreatus</i>	F9	5,28									****	****	****
<i>Pleurotus ostreatus</i>	F3	5,49										****	****
<i>Pleurotus ostreatus</i>	Buk	5,54											****
<i>Pleurotus ostreatus</i>	F6	5,64											****

Príloha 5 – Fisherov LSD test, intenzita rastu jednotlivých húb na rôznych variantách substrátov – SMREK, BUK, B3, B6, B9, F3, F6, F9 (viď tabuľka 7, str. 35). Prepočet prírastku na deň [mm]

Druh huby	Substrát	Prírastok na deň [mm]	a	b	c	d	e	f	g	h	i	j	k
<i>Pleurotus eryngii</i>	Smrek	3,35	****										
<i>Pleurotus eryngii</i>	B3	3,39	****										
<i>Ganoderma lucidum</i>	F9	3,51	****	****									
<i>Pleurotus eryngii</i>	B6	3,60	****	****	****								
<i>Pleurotus eryngii</i>	B9	3,61	****	****	****								
<i>Ganoderma lucidum</i>	Smrek	3,70	****	****	****	****							
<i>Ganoderma lucidum</i>	B9	3,71	****	****	****	****							
<i>Pleurotus eryngii</i>	F3	3,78		****	****	****	****						
<i>Pleurotus eryngii</i>	F9	3,93			****	****	****	****					
<i>Ganoderma lucidum</i>	B6	3,96			****	****	****	****					
<i>Pleurotus eryngii</i>	Buk	4,10				****	****	****					
<i>Ganoderma lucidum</i>	B3	4,13					****	****					
<i>Pleurotus eryngii</i>	F6	4,19						****	****				
<i>Ganoderma lucidum</i>	F3	4,28						****	****	****			
<i>Ganoderma lucidum</i>	Buk	4,55							****	****			
<i>Ganoderma lucidum</i>	F6	4,60								****			
<i>Pleurotus ostreatus</i>	B3	5,01									****		
<i>Pleurotus ostreatus</i>	B9	5,09									****		
<i>Pleurotus ostreatus</i>	Smrek	5,10									****	****	
<i>Pleurotus ostreatus</i>	B6	5,13									****	****	
<i>Pleurotus ostreatus</i>	F9	5,28									****	****	****
<i>Pleurotus ostreatus</i>	F3	5,49										****	****
<i>Pleurotus ostreatus</i>	Buk	5,54											****
<i>Pleurotus ostreatus</i>	F6	5,64											****

Príloha 6 - Fisherov LSD test, intenzita rastu jednotlivých húb na rôznych variantách substrátov - SMREK, BUK, B6, F6 (vid' tabuľka 7, str. 35). Obohatené 20 % prídavkom pšeničných otrúb (P20) alebo bez prídavku pšeničných otrúb (P0), prepočet prírastku na deň [mm]

Varianta	Substrát	Dni kolonizácie	Priemerná hodnota pH	SD pH
<i>Pleurotus ostreatus</i>	BUK	5	3,65	0,087
<i>Pleurotus ostreatus</i>	B6	5	4,11	0,071
<i>Pleurotus ostreatus</i>	F6	5	4,13	0,135
<i>Pleurotus eryngii</i>	BUK	5	3,78	0,031
<i>Pleurotus eryngii</i>	B6	5	4,05	0,081
<i>Pleurotus eryngii</i>	F6	5	4,08	0,023
<i>Ganoderma lucidum</i>	BUK	5	3,69	0,087
<i>Ganoderma lucidum</i>	B6	5	3,83	0,006
<i>Ganoderma lucidum</i>	F6	5	3,86	0,025
<i>Pleurotus ostreatus</i>	BUK	10	3,61	0,020
<i>Pleurotus ostreatus</i>	B6	10	3,96	0,046
<i>Pleurotus ostreatus</i>	F6	10	3,78	0,035
<i>Pleurotus eryngii</i>	BUK	10	3,71	0,078
<i>Pleurotus eryngii</i>	B6	10	3,99	0,012
<i>Pleurotus eryngii</i>	F6	10	4,22	0,216
<i>Ganoderma lucidum</i>	BUK	10	3,79	0,072
<i>Ganoderma lucidum</i>	B6	10	3,86	0,147
<i>Ganoderma lucidum</i>	F6	10	3,76	0,032
<i>Pleurotus ostreatus</i>	BUK	15	3,64	0,091
<i>Pleurotus ostreatus</i>	B6	15	3,61	0,095
<i>Pleurotus ostreatus</i>	F6	15	3,57	0,025
<i>Pleurotus eryngii</i>	BUK	15	3,85	0,104
<i>Pleurotus eryngii</i>	B6	15	3,82	0,032
<i>Pleurotus eryngii</i>	F6	15	3,92	0,119
<i>Ganoderma lucidum</i>	BUK	15	3,73	0,180
<i>Ganoderma lucidum</i>	B6	15	3,61	0,099
<i>Ganoderma lucidum</i>	F6	15	3,79	0,176
<i>Pleurotus ostreatus</i>	BUK	20	3,55	0,000
<i>Pleurotus ostreatus</i>	B6	20	3,75	0,000
<i>Pleurotus ostreatus</i>	F6	20	3,86	0,000
<i>Pleurotus eryngii</i>	BUK	20	3,98	0,000
<i>Pleurotus eryngii</i>	B6	20	4,13	0,000
<i>Pleurotus eryngii</i>	F6	20	3,96	0,000
<i>Ganoderma lucidum</i>	BUK	20	3,89	0,000
<i>Ganoderma lucidum</i>	B6	20	3,33	0,000
<i>Ganoderma lucidum</i>	F6	20	3,79	0,000
BEZ HUBY	BUK	0	4,30	0,000
BEZ HUBY	B6	0	4,48	0,000
BEZ HUBY	F6	0	4,73	0,000

Príloha 7 – zmena hodnoty pH na rôznych variantách substrátov kolonizovaného hubami - SMREK, BUK, B6, F6 (viď tabuľka 7, str. 35)

Priemer	Dni kolonizácie	Substrát	mU/mg	SD
Pleurotus ostreatus	5	BUK	2,239	0,429
Pleurotus ostreatus	5	B6	2,030	0,822
Pleurotus ostreatus	5	F6	3,386	0,500
Pleurotus eryngii	5	BUK	16,742	9,012
Pleurotus eryngii	5	B6	2,909	0,460
Pleurotus eryngii	5	F6	7,136	5,644
Ganoderma lucidum	5	BUK	0,392	0,146
Ganoderma lucidum	5	B6	2,756	0,433
Ganoderma lucidum	5	F6	2,749	0,693
Pleurotus ostreatus	10	BUK	1,819	0,202
Pleurotus ostreatus	10	B6	10,161	5,622
Pleurotus ostreatus	10	F6	1,868	0,415
Pleurotus eryngii	10	BUK	1,989	0,370
Pleurotus eryngii	10	B6	4,665	2,288
Pleurotus eryngii	10	F6	8,508	0,468
Ganoderma lucidum	10	BUK	0,000	0,055
Ganoderma lucidum	10	B6	0,951	0,350
Ganoderma lucidum	10	F6	1,454	0,444
Pleurotus ostreatus	15	BUK	0,913	0,398
Pleurotus ostreatus	15	B6	0,751	0,412
Pleurotus ostreatus	15	F6	0,406	0,120
Pleurotus eryngii	15	BUK	4,562	1,265
Pleurotus eryngii	15	B6	2,090	0,414
Pleurotus eryngii	15	F6	1,230	0,194
Ganoderma lucidum	15	BUK	0,000	0,065
Ganoderma lucidum	15	B6	0,399	0,317
Ganoderma lucidum	15	F6	0,411	0,293
Pleurotus ostreatus	20	BUK	1,211	0,370
Pleurotus ostreatus	20	B6	0,659	0,258
Pleurotus ostreatus	20	F6	0,750	0,252
Pleurotus eryngii	20	BUK	0,280	0,163
Pleurotus eryngii	20	B6	9,991	3,749
Pleurotus eryngii	20	F6	8,297	1,974
Ganoderma lucidum	20	BUK	0,000	0,100
Ganoderma lucidum	20	B6	0,152	0,121
Ganoderma lucidum	20	F6	0,087	0,014

Príloha 8 - Aktivita lakázy [mU/mg] v pevných vzorkách na rôznych variantách substrátov kolonizovaného hubami - SMREK, BUK, B6, F6 (vid' tabuľka 7, str. 35)

Varianta	Substrát	Dni kolonizácie	Enzymatická aktivita [mU/mg]	SD
<i>Pleurotus ostreatus</i>	BUK	5	4,795	1,151
<i>Pleurotus ostreatus</i>	B6	5	0,315	0,039
<i>Pleurotus ostreatus</i>	F6	5	0,868	0,241
<i>Pleurotus eryngii</i>	BUK	5	2,500	0,236
<i>Pleurotus eryngii</i>	B6	5	0,839	0,048
<i>Pleurotus eryngii</i>	F6	5	0,772	0,218
<i>Ganoderma lucidum</i>	BUK	5	0,091	0,046
<i>Ganoderma lucidum</i>	B6	5	0,473	0,049
<i>Ganoderma lucidum</i>	F6	5	0,352	0,060
<i>Pleurotus ostreatus</i>	BUK	10	0,722	0,413
<i>Pleurotus ostreatus</i>	B6	10	0,176	0,049
<i>Pleurotus ostreatus</i>	F6	10	0,065	0,015
<i>Pleurotus eryngii</i>	BUK	10	0,476	0,159
<i>Pleurotus eryngii</i>	B6	10	0,647	0,077
<i>Pleurotus eryngii</i>	F6	10	0,877	0,256
<i>Ganoderma lucidum</i>	BUK	10	0,021	0,012
<i>Ganoderma lucidum</i>	B6	10	0,144	0,059
<i>Ganoderma lucidum</i>	F6	10	0,102	0,062
<i>Pleurotus ostreatus</i>	BUK	15	0,063	0,048
<i>Pleurotus ostreatus</i>	B6	15	0,019	0,008
<i>Pleurotus ostreatus</i>	F6	15	0,021	0,010
<i>Pleurotus eryngii</i>	BUK	15	0,404	0,063
<i>Pleurotus eryngii</i>	B6	15	0,566	0,105
<i>Pleurotus eryngii</i>	F6	15	0,854	0,052
<i>Ganoderma lucidum</i>	BUK	15	0,026	0,015
<i>Ganoderma lucidum</i>	B6	15	0,063	0,027
<i>Ganoderma lucidum</i>	F6	15	0,102	0,042
<i>Pleurotus ostreatus</i>	BUK	20	0,185	0,050
<i>Pleurotus ostreatus</i>	B6	20	0,028	0,009
<i>Pleurotus ostreatus</i>	F6	20	0,070	0,022
<i>Pleurotus eryngii</i>	BUK	20	0,643	0,305
<i>Pleurotus eryngii</i>	B6	20	0,531	0,067
<i>Pleurotus eryngii</i>	F6	20	0,774	0,167
<i>Ganoderma lucidum</i>	BUK	20	0,030	0,016
<i>Ganoderma lucidum</i>	B6	20	0,025	0,014
<i>Ganoderma lucidum</i>	F6	20	0,032	0,018

Príloha 9 - Aktivita lakázy [mU/mg] v tekutých vzorkách na rôznych variantách substrátov kolonizovaného hubami - SMREK, BUK, B6, F6 (vid' tabuľka 7, str. 35)

Substrát	Týždne fermentácie	Prchavé látky [mg/kg]	SD
Smrek	0	174,75	3,48
Smrek	3	57,38	0,16
Smrek	6	31,86	0,02
Smrek	9		
Smrek + fugát	0	39,15	1,19
Smrek + fugát	3	12,54	1,21
Smrek + fugát	6	9,38	1,93
Smrek + fugát	9	4,13	0,15

Príloha 10 - Hodnoty prchavých organických látok [mg/kg] v smrekových pilinách počas fermentácie

Substrát	Týždne fermentácie	Obsah živíc
Smrek	0	8,89%
Smrek	3	8,91%
Smrek	6	9,93%
Smrek	9	5,31%
Smrek + fugát	0	8,16%
Smrek + fugát	3	10,08%
Smrek + fugát	6	11,77%
Smrek + fugát	9	4,29%

Príloha 11 – Hodnoty relatívneho obsahu živíc [%] v smrekových pilinách počas fermentácie

Varianta	Popol	Triesloviny	Živice	Lignín	Holocelulóza
B	2%	3%	7%	20%	61%
B6	1%	2%	6%	24%	59%
F6	1%	5%	6%	24%	53%
Ost B	2%	2%	7%	20%	61%
Ost B6	0%	2%	7%	24%	59%
Ost F6	1%	1%	8%	24%	58%
P.E. B	3%	3%	7%	21%	60%
P.E. B6	1%	1%	7%	25%	59%
P.E. F6	1%	1%	7%	25%	59%
Gan B	3%	2%	8%	20%	61%
Gan B6	1%	2%	8%	24%	57%
Gan F6	1%	1%	7%	24%	59%

Príloha 12 - Hodnoty relatívneho obsahu popola, trieslovín, živíc [%] na rôznych variantách substrátov kolonizovaného hubami. P. O. – *Pleurotus ostreatus*, P. E. – *Pleurotus eryngii*, G. O. – *Ganoderma lucidum*. Substráty – BUK, B6, F6 (viď tabuľka 7, str. 35)



Príloha 13 - Sledovanie intenzity rastu mycélia na bukových pilinách



Príloha 14 - Sledovanie intenzity rastu mycélia na rôznych substrátoch v OMNIA pohároch



Príloha 15 - Očkovanie sadby do "komínkov", kultivácia pre stanovenie enzymatickej aktivity, hodnoty pH, lignínu



Príloha 16 - Zakladanie fermentácie smrekových pilín



Príloha 17 - Príprava vzoriek pre stanovenie enzymatickej aktivity



Príloha 18 - Samotné stanovenie enzymatickej aktivity na spektrofotometri s 96 kvetami