

PORADNIK

UPRAWY WYBRANYCH GRZYBÓW LEŚNYCH

Prof. dr hab. Bożena Muszyńska

Dr Katarzyna Kała

Dr hab. Katarzyna Sułkowska-Ziaja

Katedra Botaniki Farmaceutycznej UJCM

Konrad Sadowski

Gospodarstwo Rolnicze



KRAKÓW 2023

ISBN 978-83-970054-0-2

Poradnik

Uprawy wybranych grzybów leśnych

opracowanie przygotowano w wyniku realizacji projektu: „Uprawy polowe metodami ekologicznymi: badania w zakresie ekologicznej uprawy jadalnych grzybów leśnych” – dotacja Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi dla Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum (decyzja o udzieleniu finansowania z dnia 5.04.2023 r.)

Prof. dr hab. Bożena Muszyńska

Dr Katarzyna Kała

Dr hab. Katarzyna Sułkowska-Ziaja

Katedra Botaniki Farmaceutycznej UJ CM

Konrad Sadowski

Gospodarstwo Rolnicze

Kraków 2023

Wydawnictwo PERYSKOP 31-279 Kraków, ul. Władysława Łokietka 59/24

skład, łamanie i projekt okładki

Spis treści

I. WSTĘP.....	3
II. CEL WPROWADZENIA NOWYCH GATUNKÓW DO UPRAW.....	12
III. INSTRUKCJA PROWADZENIA METODAMI EKOLOGICZNYMI UPRAW WYBRANYCH GATUNKÓW GRZYBÓW LEŚNYCH.....	13
1. Pozyskanie grzybni matecznej wybranych gatunków grzybów jadalnych/dziko- rosnących w postaci kultury mycelialnej – charakterystyka metody.....	13
1.1. Kultury mycelialne wybranych gatunków grzybów w systemie zamkniętym.....	29
1.2. Kultury w bioreaktorach z systemem air–lift.....	30
1.3. Otrzymywanie grzybni na ziarnie do inokulowania balotów uprawowych.....	30
1.4. Otrzymanie podłoża oraz technologia upraw wybranych pięciu gatunków grzybów (<i>Armillaria mellea</i> , <i>Cyclocybe aegerita</i> , <i>Flammulina velutipes</i> , <i>Hericiium erinaceus</i> , <i>Laetiporus sulphureus</i>).....	31
2. Uprawy.....	32
3. Analiza porównawcza zawartości związków biologicznie aktywnych w grzybni, owocnikach ze stanu naturalnego oraz z pozyskanych w projekcie.....	43
IV. PODSUMOWANIE.....	47
V. PIŚMIENNICTWO.....	48

I. WSTĘP

Obecnie grzyby uprawne są uznawane za żywność funkcjonalną, czyli taką która, oprócz dostarczania niezbędnych składników odżywczych, korzystnie wpływa na zdrowie człowieka dzięki ich naturalnej zdolności do gromadzenia substancji o potencjale prozdrowotnym. Technologie upraw grzybów są ciągle udoskonalane, a najwięcej grzybów uprawia się i spożywa w Chinach – ponad 90% światowej produkcji. Polska jest europejskim liderem w produkcji pieczarki, rośnie również produkcja bocznika ostrygowatego, natomiast uprawa innych gatunków grzybów jest obecnie w Polsce śladowa.

W zrealizowanym projekcie, w wyniku którego powstał niniejszy poradnik, dotyczącym ekologicznych upraw grzybów leśnych, nadrzędnym celem było opracowanie metody ich otrzymywania w warunkach komercyjnych i uniezależnienie firm od ich czasowego występowania w środowisku naturalnym oraz rozszerzenie oferty pełnowartościowej żywności dla konsumentów. Zmienność w występowaniu określonych gatunków grzybów leśnych w różnych latach bardzo często prowadzi do wahan cen oraz problemów z realizacją podjętych zobowiązań. Sezonowość występowania owocników może prowadzić do wycofywania się firm z działalności w sektorze rolnictwa ekologicznego ze względu na wysokie ryzyko jej prowadzenia. Warto podkreślić, że grzyby zostały wprowadzone do uprawy znacznie później niż rośliny, a pierwsze półnaturalne plantacje były zakładane od X wieku w Chinach. Technologie upraw grzybów w skali wielkotowarowej zostały opracowane dopiero w drugiej połowie XX wieku, natomiast obecnie można zaobserwować dynamiczny rozwój tego sektora ogrodnictwa, dotyczący nie tylko powierzchni upraw, ale także różnorodności gatunkowej i odmianowej. Według danych FAO, w 2020 roku światowa produkcja grzybów wyniosła ponad 40 mln ton, a wartość ta podwoiła się w ciągu ostatnich dwóch lat [1]. Większość upraw zlokalizowana jest w Chinach, dlatego dokładne oszacowanie ich powierzchni oraz składu gatunkowego jest trudne, ze względu na brak precyzyjnego monitoringu. Zgodnie z dostępnymi danymi w 2013 roku najpowszechniej uprawianym gatunkiem grzyba był twardnik japoński *Lentinula edodes* – stanowiący 22% globalnej produkcji, kolejno gatunki z rodzaju bocznik *Pleurotus* spp. – 19% globalnej produkcji oraz gatunki z rodzaju uszak *Auricularia* spp. – 18% globalnej produkcji. Z kolei najbardziej znana w Europie i Ameryce Północnej pieczarka dwuzarodnikowa *Agaricus bisporus* znalazła się dopiero na 4 miejscu. Jednak mając na uwadze dynamiczny wzrost

produkcji grzybów, wartości te ciągle ulegają zmianie, a niestety dane w dostępnym piśmiennictwie naukowym nie są aktualizowane [1,2].

Obecnie istnieje duże zainteresowanie żywnością, która oprócz dostarczania podstawowych wartości odżywczych ma pozytywny wpływ na funkcjonowanie organizmu człowieka i stanowi profilaktykę zdrowotną, dlatego otrzymywanie grzybów w uprawach i ich dostępność dla konsumentów jest niezwykle istotna [3,4]. Należy podkreślić, że wciąż wiele gatunków grzybów jest uprawianych w niewielkich ilościach lub pozyskiwanych jedynie ze stanowisk naturalnych [1–3]. Za jadalne uznaje się około 3000 gatunków grzybów, z czego około 100 z nich pozyskuje się komercyjnie, a tylko 10 gatunków pozyskuje się na skalę przemysłową. Na podstawie badań naukowych udowodniono wiele prozdrowotnych właściwości grzybów. Są to między innymi właściwości przeciwzapalne, immunomodulujące, przeciwcukrzycowe, antyoksydacyjne, hepatoprotekcyjne, przeciwnowotworowe, przeciwmiażdżycowe, przeciwwirusowe, przeciwbakteryjne i przeciwgrzybicze [5–8]. Grzyby są bogatym źródłem różnorodnych związków, a do najcenniejszych z nich należą polisacharydy, terpenoidy, związki fenolowe, związki indolowe, karotenoidy, flawonoidy, sterole, witaminy, lowastatyna, ergotioneina oraz biopierwiastki [3–8].

W publikowanych badaniach i obserwacjach populacyjnych wykazano, że konsumenci bardzo dużą wagę przywiązują do sposobu produkcji i wpływu tej produkcji na środowisko naturalne i klimat. Nie tylko poszukują żywności ze względu na skład, ale również ze względu na ekologiczny rodzaj produkcji. W zrealizowanym projekcie podjęto się opracowania nowego sposobu ekologicznej produkcji pięciu gatunków grzybów występujących w środowisku naturalnym, a także mających znaczenie w profilaktyce wielu chorób cywilizacyjnych.

W zrealizowanym projekcie założono ekologiczne uprawy następujących gatunków grzybów:

1. **Opieńka miodowa** *Armillaria mellea* (Vahl) P. Kumm. to gatunek grzybów z rodziny obrzękowcowatych (*Physalacriaceae*), a także nazwa zbiorowa dla kompleksu drobnych gatunków („kompleks opieńkowy” *Armillaria mellea* sensu lato) wyodrębnionych w latach 70. XX wieku z wcześniej szeroko ujmowanego gatunku (Fot. 1.).



Fot. 1. Owocniki opieńki (fotografia Bożena Muszyńska)

Kapelusz, o średnicy 3–13 cm, początkowo jest półkulisty, z wiekiem spłaszczony. Młode owocniki są barwy miodowożółtej, dojrzałe zmieniają zabarwienie na oliwkowobrązowe. Powierzchnia kapelusza jest pokryta drobnymi czerwonoróżowymi, brązowymi lub czarnymi łuskami, o największej koncentracji w centrum. Blaszki początkowo białawe, z czasem robią się beżoworóżowawe, z brązowymi plamami. Trzon osiąga 8–18 cm wysokości i 0,5–2,5 cm grubości, żółtawy, czerwonoróżowy lub czarnoróżowy w górnej części, z błoniastym złotożółtym pierścieniem. Miąższ trzonu jest biały. Wysyp zarodników jest biały, zarodniki są elipsoidalne i gładkie.

Opieńka miodowa występuje na wszystkich kontynentach, z wyjątkiem Antarktydy i Ameryki Południowej. W Europie Środkowej i w Polsce jest powszechna. Owocuje najczęściej jesienią, od września do listopada. Zwykle rośnie gromadnie, czasami bardzo licznie. Bytuje na drewnie (pnie, pniaki, gałęzie, korzenie) gatunków drzew liściastych w lasach, ogrodach, parkach i sadach. Surowe opieńki są w smaku początkowo łagodne, natomiast pozostawiają cierpki posmak. Zapach mają słaby, ale przyjemny. Są smaczne,

twarde, o łykowanym, mniej wykorzystywanym do konsumpcji trzonie. Do spożycia używa się najczęściej młode kapelusze.

Badania składu chemicznego owocników wykazały obecność β -glukanu z częścią peptydową o właściwościach przeciwnowotworowych. Nowsze badania udowodniły występowanie polisacharydów o innej strukturze – α -glukanów. Polisacharydy obecne w owocnikach reprezentowane są również przez glikogen oraz składniki niepodlegające trawieniu, takie jak celuloza, chityna i mannany. Związki te obniżają stężenie frakcji LDL cholesterolu (w krwi i w wątrobie) oraz triacylogliceroli w surowicy, zmniejszając w ten sposób ryzyko powstania chorób układu krążenia. Chityna i glukany wpływają na układ immunologiczny, obniżają ciśnienie krwi, mają działanie hipoglikemiczne, przeciwbakteryjne, przeciwwirusowe i przeciwzapalne. Z kolei sterole reprezentowane są przez ergosterol oraz nadtlenek ergosterolu, wykazujący właściwości przeciwnowotworowe. Spośród związków indolowych potwierdzono obecność tryptaminy, serotoniny, tryptofanu i melatoniny [9].

2. **Płomiennica zimowa** *Flammulina velutipes* (Curtis) Singer to gatunek grzyba z rodziny obrzękowcowatych (*Physalacriaceae*) (Fot. 2.).



Fot. 2. Owocniki płomiennicy zimowej (fotografia Bożena Muszyńska)

Kapelusz owocnika ma średnicę od 1 do 7 cm, jest półkulisty u młodych egzemplarzy, staje się płaski u starszych, o kolorze żółtopomarańczowym, pomarańczowym lub żółto-brązowym. Staje się śliski i błyszczący w wilgotnych warunkach. Blaszki są początkowo białe, później zmieniają się na ochrowo-żółte, są rzadkie i wypukłe. Trzon osiąga 5–10 cm wysokości, jest cylindryczny, często zakrzywiony, czarno-brązowy u góry i pokryty brązowym zamszem u dołu. Nie posiada pierścienia. Miąższ jest elastyczny, biały lub kremowy, nie zmienia koloru po przekrojeniu. Wysyp zarodników jest biały, a zarodniki cylindryczne i bezbarwne.

Płomiennica zimowa występuje na całej półkuli północnej, głównie w regionach o umiarkowanym klimacie. W Polsce jest gatunkiem bardzo pospolitym. Owocuje od października do grudnia, a w trakcie łagodnego okresu zimowego może kontynuować wzrost nawet do marca. Jest odporna na mróz i nie ulega gniciu. Jej naturalne siedlisko to pnie drzew liściastych. Rośnie zazwyczaj w kępach, zarówno na martwych, jak i żywych drzewach, nawet na znacznej wysokości nad ziemią. Można ją znaleźć zarówno w lasach liściastych i mieszanych, jak i w parkach, a nawet ogrodach. Występuje na różnych gatunkach drzew liściastych, takich jak bez czarny, brzoza brodawkowata, buk, dąb, grab, głóg, klon, lipa, topola, wierzba i wiąz. Jest grzybem jadalnym, charakteryzującym się smacznym miąższem, który nadaje się do przyrządzania zup i marynowania. Grzyb ten jest zarówno saprotrofem (rozkłada martwą materię organiczną) jak i pasożytem.

Płomiennica zimowa jest źródłem selenu, fosforu, żelaza, potasu, siarki, polisacharydów (w tym β -glukanów), steroli oraz kwasu linolowego. Zawiera około 2–3 gramów białka na 100 gramów. Jest także bogatym źródłem witamin z grupy B, takich jak tiamina, ryboflawina i niacyna, a także witaminy D, zwłaszcza jeśli jest wystawiona na działanie promieni słonecznych. W jej składzie znajdują się przeciwutleniacze, w tym ergotioneina i glutation. Zawiera mniej niż 1 gram tłuszczu na 100 gramów, co sprawia, że jest odpowiednia w diecie niskotłuszczowej. Składniki płomiennicy zimowej wykazują zdolność wzmacniania układu odpornościowego, posiadają silne właściwości przeciwutleniające, przeciwzapalne, antymutagenne oraz hepatoprotective. Dodatkowo, wpływają na regulację poziomu cholesterolu całkowitego, wpływają na metabolizm, szczególnie tłuszczów, wspierają perystaltykę jelit oraz promują rozwój flory bakteryjnej. Ponadto, mają działanie spowalniające procesy neurodegeneracyjne, wpływają korzystnie na pracę i rozwój mózgu, zwiększają pamięć i zdolność koncentracji, wykazują właściwości przeciwwirusowe i

przeciwbakteryjne, mogą ograniczać nasilenie objawów alergii, zmniejszać ryzyko wystąpienia anemii oraz poprawiać funkcjonowanie układu sercowo–naczyniowego [10].

3. **Polówka wiązkowa** *Cyclocybe aegerita* (Brig.) Kühner to gatunek grzybów z rodziny pierścieniakowatych (*Strophariaceae*) (Fot. 3.).



Fot. 3. Owocniki polówki wiązkowej (Wikimedia Commons)

Kapelusz owocników o średnicy od 8 do 200 mm, na początku jest wypukły do półkolistego, w miarę wzrostu staje się spłaszczony. Jest barwy brunatnej, ciemniejszy w centrum i jaśniejszy na brzegach. W stadium primordium, czyli w początkowej fazie rozwoju owocnika, zawiązek kapelusza jest ciemnobrązowy. Powierzchnia kapelusza bywa gładka, choć u niektórych osobników może mieć bruzdy. Blaszki są początkowo białe lub szarawe, w miarę dojrzewania owocnika stają się koloru czekoladowobrązowego. Są średnio szerokie, ciasno osadzone, mogą być zrosnięte z trzonem, wygięte w stronę trzonu lub zbiegające, o brzegach gładkich lub delikatnie drobno karbowanych. Trzon jest biały lub jasnobrązowy, posiada wyraźny pierścień w górnej części, jest okrągły w przekroju, ma długość od 10 do 150 mm i grubość od 2 do 25 mm. Miąższ barwy białej, ma przyjemny zapach. Zarodniki są ciemnobrązowe, wydłużone, gładkie, a niektóre z nich wydzielają olejopodobne kropelki.

Polówka wiązkowa występuje na wszystkich kontynentach. W krajach Europy Środkowej i Północnej oraz w północnej części Stanów Zjednoczonych grzyb ten spotykany jest rzadziej. Rośnie zwykle w skupiskach, na starych lub martwych pniakach i gałęziach topoli, wierzby, wiązów, jesionów, bzu czarnego, robinii. Młode owocniki posiadają delikatny smak. Nadają się do suszenia, podczas którego zyskują intensywny grzybowy aromat.

Ten gatunek wyróżnia się wysoką zawartością białka wynoszącą od 39,0% do 46,8% w przeliczeniu na suchą masę. W owocnikach obecne są ponadto β -glukany, związki fenolowe, sterole, triterpenoidy. Ekstrakty z owocników wykazują działanie antyoksydacyjne, przeciwnowotworowe, sedatywne (uspokajające) oraz przeciwgrzybicze. Wykazują także zdolność do obniżania poziomu trójglicerydów i cholesterolu we krwi. Ekstrakty z polówki mogą odgrywać rolę w profilaktyce nowotworów, ponieważ działają antymutagennie, zawierają ponadto substancje o działaniu antybiotycznym [11].

4. **Soplówka jeżowata** *Hericum erinaceus* (Bull.) Pers. to gatunek grzybów należący do rodziny soplówkowatych (*Hericiaceae*) (Fot. 4.).



Fot. 4. Owocnik soplówki jeżowatej (fotografia Bożena Muszyńska)

Owocnik jest kulisty lub poduchowaty, czasami strzechowaty, wielkości od 8–20 cm, ale dorastający nawet do 30 cm. Początkowo jest biały, następnie białokremowy, żółtosiny, dojrzwały – ochrowobrązowawy. Przyrasta do drzewa bokiem lub bulwiastą częścią, która w starszych okazach drewnieje. Jest gęsto pokryty kolcami o długości 2–6 cm i o grubości (przy podstawie) 1,5–2 mm. Kolce za młodu są białawożółte, z czasem przybierają kolor od żółtopomarańczowego do siwobrązowawego. Miąższ barwy białej jest zwarty, elastyczny, włóknisty o słodkawym smaku. Zarodniki są barwy białej.

Występuje w Ameryce Północnej, Europie i Azji. W Polsce to gatunek rzadki. Jest grzybem saprotroficznym rozwijającym się na martwym drewnie lub pasożytem zasiedlającym żywe, starsze lub osłabione drzewa. Rośnie w lasach liściastych ze starym drzewostanem, głównie na pniach starszych drzew w ich dolnej części, do wysokości kilku metrów na pniach buków i dębów. W Polsce od 1995 r. podlega ochronie ścisłej bez możliwości zastosowania wyłączeń spod ochrony uzasadnionych względami gospodarki rolnej, leśnej lub rybackiej.

Soplówka jeżowata akumuluje liczne związki bioaktywne, do najważniejszych zaliczamy: erinacyny, związki wpływające na pracę mózgu i wytwarzanie komórek nerwowych; hericenony, związki wspomagające produkcję czynnika wzrostu nerwów (NGF); polisacharydy (w tym β -glukany); aminokwasy; kwasy tłuszczowe; liczne pierwiastki (fosfor, potas, cynk, german, żelazo, selen); witaminę D. Ekstrakty z soplówki jeżowatej aktywnie stymulują pracę układu nerwowego poprzez wspomaganie wytwarzania komórek nerwowych; poprawiają funkcjonowanie mózgu, zwłaszcza w obszarze koncentracji i pamięci; zapobiegają rozwojowi demencji; zmniejszają skutki choroby Parkinsona i Alzheimera. Polisacharydy oraz związki o strukturze terpenów stymulują również układ odpornościowy, a z tym działaniem związana jest też aktywność przeciwnowotworowa. Potwierdzono, że ekstrakty lub pojedyncze wyizolowane związki działają hipoglikemicznie, hipotensyjnie, hipolipidemicznie oraz zmniejszają ryzyko rozwoju choroby wrzodowej. Ponadto związki zawarte w owocnikach wpływają na przyspieszanie procesu gojenia się ran [12].

5. **Żółciak siarkowy** *Laetiporus sulphureus* (Bull.) Murrill to gatunek grzybów z rodziny *Laetiporaceae* (Fot. 5.).



Fot. 5. Owocniki żółciaka siarkowego na robinii pseudoakcji (fotografia Bożena Muszyńska)

Owocnik nie ma typowego trzonu, rośnie bezpośrednio na pniu drzewa osiągając średnicę 10–40 cm, często występuje warstwowo. Młode okazy mogą być bulwowate, a starsze stają się wachlarzowate, półkuliste lub nieregularnie zdeformowane. Górna powierzchnia kapelusza jest nierówna, siarkowożółta z odcieniami pomarańczowymi. Brzeg kapelusza jest nieregularny, falisty, czasem cytrynowy. Hymenofor jest rurkowaty, z krótkimi rurkami o długości 1,5–5 mm, początkowo siarkowożółty, później ochrowożółty. Miąższ jest białawy lub kremowy, miękki i soczysty u młodych owocników, a u starszych staje się kruchy i zbitý. Wysyp zarodników jasnożółty, zarodniki bezbarwne, gładkie, o kształcie od jajowatego do owalnego. Żółciak siarkowy jest gatunkiem kosmopolitycznym, występującym na wszystkich kontynentach poza Antarktydą. Jest rozpowszechniony na półkuli północnej, zwłaszcza w Ameryce Północnej i Europie. Występuje powszechnie również w Polsce.

Rośnie jako jednoroczny owocnik od kwietnia do października, głównie wiosną. Często można go znaleźć w parkach, na drzewach przydrożnych, w sadach i ogrodach. W lasach występuje znacznie rzadziej. Żółciak siarkowy rozwija się głównie na drzewach liściastych, a sporadycznie na drzewach iglastych. Młode owocniki żółciaka siarkowego są jadalne po przetworzeniu. Starsze owocniki są niejadalne ze względu na bardzo zbitą teksturę.

W analizach składu chemicznego owocników wykazano, że w owocnikach dominują węglowodany oraz proteiny, a niska jest zawartość tłuszczów. Dzięki małej wartości kalorycznej (375 kcal w 100 g) grzyb ten z powodzeniem może być stosowany w dietach niskokalorycznych. Zawartość białka w tym gatunku może wynosić od 10% do 30% suchej masy, a zawartość węglowodanów około 40–50% suchej masy. W żółciaku siarkowym obecne są witaminy z grupy B (np. niacyna, ryboflawina i kwas pantotenowy) oraz pierwiastki takie jak potas i miedź. Występuje w nim trehaloza, mannitol, ponadto obecne są tokoferole α , γ - i δ -tokoferol. Polisacharydy reprezentowane są głównie przez β -glukany, które posiadają właściwości immunostymulujące, przeciwnowotworowe, przeciwzapalne, przeciwwirusowe, hipoglikemiczne i antyoksydacyjne. W gatunku tym występują także lektyny działające hemaglutynująco i hemolitycznie, kwasy tłuszczowe (palmitynowy, oleinowy, linolowy), korzystne w chorobach sercowo-naczyniowych, triterpeny, głównie typu lanostanu (kwasy: eburikowy, sulfurenowy, acetyloeburikowy, acetylotrametenolowy, 15 α -hydroksytriametenolowy, 3-oksosulfurenowy) wykazujące działanie przeciwnowotworowe i cytotoksyczne, ponadto związki fenolowe (kwas *p*-kumarowy, kwercetyna, kemferol, kwas kawowy, (+)-katechina, kwas galusowy oraz kwas 5-kawoilochinowy). Wodne wyciągi z żółciaka siarkowego działają przeciwdrobnoustrojowo wobec licznych patogenów powodujących psucie się żywności [13].

Wybór ww. gatunków grzybów do upraw poprzedzony był konsultacjami z firmami działającymi w branży zbioru i uprawy grzybów, w tym również z innymi firmami z branży produkcji ekologicznej. Analizowały one, na jakie gatunki wytwarzane w sposób ekologiczny jest zapotrzebowanie i jakie gatunki są poszukiwane na rynku. Jednocześnie firmy te wyraziły zainteresowanie wdrożeniem wypracowanych technologii. Firmy te są również uwzględnione w działaniach związanych z rozpowszechnianiem wyników projektu.

II. CEL WPROWADZENIA NOWYCH GATUNKÓW DO UPRAW

Związki bioaktywne pozyskane z owocników lub grzybni wybranych gatunków, takich jak *Armillaria mellea*, *Cyclocybe aegerita*, *Flammulina velutipes*, *Hericiium erinaceus* czy *Laetiporus sulphureus*, odgrywają istotną rolę w prewencji chorób związanych z rozwojem cywilizacji. Może to skutkować wzrostem zapotrzebowania na te konkretne gatunki grzybów. Przy właściwej i zoptymalizowanej technice pozyskiwania owocników, możliwe będzie wprowadzenie tych gatunków do upraw przez rodzimych producentów.

W związku z tym, celem rozpoczęcia upraw było opracowanie, po raz pierwszy, własnej metody ekologicznej uprawy wybranych gatunków grzybów leśnych.

Głównym celem było wyeliminowanie konieczności polegania na sezonowym występowaniu tych grzybów w środowisku naturalnym, co w konsekwencji może spowodować zwiększenie dostępności tych gatunków dla konsumentów.

Celem zrealizowanego projektu było również rozszerzenie oferty gatunków uprawowych i możliwe wprowadzenie do obrotu jadalnych grzybów leśnych otrzymywanych w ekologicznych uprawach. W ramach tych działań, prowadzono proces certyfikacji upraw zgodnie z przepisami dotyczącymi rolnictwa ekologicznego (określone są w części I – Przepisy dotyczące produkcji roślinnej załącznika II do rozporządzenia Parlamentu Europejskiego i Rady (UE) 2018/848 z dnia 30 maja 2018 r. *w sprawie produkcji ekologicznej i znakowania produktów ekologicznych i uchylającego rozporządzenie Rady (WE) nr 834/2007*. Zgodnie z tymi przepisami:

W przypadku produkcji grzybów dopuszczalne jest stosowanie podłoży, które zawierają wyłącznie poniższe części składowe:

- b) produkty pochodzenia rolnego inne niż te, o których mowa w lit. a), pochodzące z ekologicznych jednostek produkcyjnych;*
- c) torf niepoddany obróbce chemicznej;*
- d) drewno nieimpregnowane środkami chemicznymi po ścięciu;*
- e) produkty mineralne, o których mowa w pkt 1.9.3, woda i gleba).*

Produkcja podłoża każdorazowo wymaga zatem specjalistycznej wiedzy, natomiast sama uprawa grzybów na przygotowanych kostkach może być prowadzona w mniej wymagających warunkach – uprawowym tunelu klimatycznym, co może zostać odtworzone po odpowiednim przeszkoleniu osób, które zajmą się ekologiczną produkcją owocników grzybów.

Nadrzędnym rezultatem zrealizowanego projektu jest opracowanie kompleksowej technologii upraw grzybów dla gospodarstw – od otrzymania kostki uprawowej po zbiór owocników, co szczegółowo opisano poniżej i co stanowić będzie podstawę dla gospodarstw decydujących się na ekologiczną produkcję grzybów leśnych.

III. INSTRUKCJA PROWADZENIA UPRAW WYBRANYCH GATUNKÓW GRZYBÓW LEŚNYCH METODAMI EKOLOGICZNYMI

1. Pozyskanie grzybni matecznej wybranych gatunków grzybów jadalnych/dzikorosnących w postaci kultury mycelialnej – charakterystyka metody

Kultury mycelialne odgrywają kluczową rolę w uprawie grzybów, służą one do zaszczepiania podłoża stałych, takich jak zboże lub inne materiały bogate w składniki odżywcze. Jest to metoda bardziej precyzyjna w porównaniu do inokulacji zarodnikami i przyspiesza kolonizację podłoża przez grzybnie. W produkcji grzybów na masową skalę często wykorzystuje się grzybnie mateczną w postaci kultury płynnej. Umożliwia ona zaszczepienie dużych ilości podłoża stałych i usprawnia proces wytwarzania owocników. Kultury mycelialne stanowią ważny element nowoczesnej biotechnologii i służą nie tylko masowemu rozmnażaniu owocników, ale także ich doskonaleniu (hodowli nowych odmian) lub pozyskiwaniu z nich cennych metabolitów np. do produkcji leków czy kosmetyków [14,15].

Kultura mycelialna to hodowla grzybni prowadzona na syntetycznym podłożu, przy zapewnieniu sterylnych warunków [16].

Kultury mycelialne – podstawowe terminy

Poniżej zebrano podstawowe terminy nawiązujące do opisywanej metody:

KULTURA MYCELIALNA – hodowla grzybni (mycelium), prowadzona w naczyniach szklanych lub plastikowych, na specjalnie dobranych pożywkach, w kontrolowanych, sterylnych warunkach.

MYCELIUM, grzybnia – wegetatywna część grzyba składająca się z sieci rozgałęzionych strzępek. Jest odpowiedzialna za wchłanianie składników odżywczych i służy jako podstawa do wzrostu i rozwoju kolonii grzybów. U grzybów można wyróżnić następujące stopnie organizacji budowy: pojedyncza komórka ⇒ strzępka ⇒ grzybnia ⇒ owocnik lub przetrwalnik.

Wyróżnia się dwa rodzaje grzybni:

- grzybnia substratowa, zwana też grzybnią wegetatywną, wewnętrzną, wglębną, podłożową lub pożywkową – grzybnia wnikająca w podłoże i pobierająca z niego wodę i składniki odżywcze
- grzybnia powietrzna, zwana też grzybnią rozrodczą, zewnętrzną, powierzchniową – rozwijająca się na powierzchni podłoża, często w postaci puchu. Służy do oddychania i rozmnażania.

STRZĘPKI – nitkowate struktury, z których zbudowana jest grzybnia, czyli organizm grzyba. Strzępki mają postać prostych lub poskręcanych rurek wypełnionych cytoplazmą, w której znajdują się organella komórkowe. Mogą składać się z komórek jednojądrowych lub

wielojądrowych zwanych komórczakami. U większości grzybów ściana komórkowa zawiera chitynę. W strzępkach grzybów brak jest plastydów, nie zawierają one skrobi, występuje natomiast glikogen oraz substancje tłuszczowe. Obecne są liczne wakuole. Strzępki mogą zawierać barwniki. Długość strzępki jest nieokreślona, cechuje ją bowiem nieograniczony wzrost. Grubość strzępek wynosi od 1 do 30 μm , najczęściej 5–10 μm .

EKSPLANTAT – wyodrębniony fragment owocnika (np. warstwa zarodnikotwórcza, fragment kapelusza, trzonu) użyty, jako materiał wyjściowy do założenia kultury mycelialnej na podłożu stałym.

INOKULUM – zawiesina zarodników grzyba (czasem fragmentów strzępek) przygotowana w celu założenia kultury mycelialnej, stanowi ono materiał wyjściowy do założenia płynnej kultury mycelialnej.

PASAŻOWANIE – przeniesienie komórek ze starego naczynia hodowlanego do nowych naczyń, zawierających świeżą pożywkę.

STERYLIZACJA – proces eliminowania obecności mikroorganizmów, takich jak bakterie i konkurencyjne grzyby, w pożywce hodowlanej. Sterylizacja ma kluczowe znaczenie dla utrzymania warunków aseptycznych i zapobiegania zanieczyszczeniu kultur grzybni.

OWOCNIK – karpofor, sporofor, sporokarp – zbita część grzybni, w której na zewnątrz lub wewnątrz powstają zarodniki płciowe. Owocniki występują głównie u grzybów wyższych: workowców i podstawczaków. Ich budowa jest charakterystyczna dla różnych grup grzybów. Wyróżnia się w nich dwa rodzaje grzybni: płonną – hamatecjum, stanowiącą rusztowanie – i zarodniośną – hymenium (obłocznę), w której wytwarzane są zarodniki.

Podłoża stosowane w kulturach mycelialnych

Warunkiem wzrostu kultury mycelialnej jest zaspokojenie potrzeb pokarmowych danego gatunku. Eksplantaty i rozwijające się kultury mycelialne wymagają odpowiednich podłoży hodowlanych. Skład chemiczny pożywki jest jednym z najważniejszych czynników determinujących rozwój mycelium w kulturach mycelialnych. Rozbudowany aparat enzymatyczny pozwala grzybom wykorzystywać źródła składników odżywczych o różnym stopniu złożoności. Z pożywką należy dostarczyć źródło węgla, źródło azotu, makro- i mikroelementy, opcjonalnie można dodać niektóre witaminy [17,18].

Źródło węgla

Grzyby są organizmami heterotroficznymi, co oznacza, że pozyskują węgiel ze związków organicznych, a nie bezpośrednio z dwutlenku węgla w atmosferze. Można stosować różne

źródła węgla w zależności od gatunku grzyba i pożądanego wyniku hodowli grzybni. Źródło węgla stanowią najczęściej są cukry proste, głównie glukoza i fruktoza. Rzadziej stosowane są disacharydy – sacharoza, maltoza, laktoza czy polisacharydy (skrobia). Można również wykorzystać materiały naturalne bogate w węglowodany, takie jak melasa, ekstrakt słodowy czy syrop kukurydziany. Gatunki, które mają zdolność rozkładania materiałów ligno-celulozowych – grzyby rozkładające drewno – mogą wykorzystywać celulozę, hemicelulozę i ligninę, jako źródła węgla. Przykłady materiałów lignocelulozowych stosowanych w kulturach mycelialnych obejmują trociny, wióry drzewne, słomę i odpady rolnicze. Wybór źródła węgla zależy od wymagań żywieniowych gatunku, pożądanego tempa wzrostu oraz połączonych metabolitów lub produktów, które mają być otrzymane z grzybni [19,20].

Źródło azotu

Azot stanowi drugi kluczowy pierwiastek istotny dla wzrostu grzybni. W organizmach grzybów azot występuje w formie zredukowanej. Jony amonowe są łatwo przyswajalne, ale wysokie stężenie tych jonów w środowisku może być toksyczne dla grzybów. Azot pobierany przez grzyby w postaci azotanów jest redukowany do amoniaku przed wbudowaniem do struktur komórkowych lub włączeniem do dalszych przemian. W pożywkach azot najczęściej występuje w formie soli azotanowych lub amonowych. Można go dostarczać również w postaci azotanu amonu. Podawanie azotu w tej ostatniej formie zapewnia dodatkowe buforowanie pożywki. Źródłem azotu są często związki organiczne, np. aminokwasy (asparagina, adenina), hydrolizat kazeiny czy pepton [19,20].

Makroelementy

Do prawidłowego rozwoju grzybni konieczny jest dodatek makroelementów. Do niezbędnych makroelementów należą: fosfor, wapń, magnez, potas i sód dodawane w postaci soli nieorganicznych. Spośród mikroelementów dodaje się sole miedzi, żelaza, manganu, molibdenu, cynku i fluoru. Zapotrzebowanie grzybni na makro i mikroelementy wynosi od mikro do miligramów na litr pożywki płynnej.

W pożywkach stosowanych w kulturach mycelialnych fosfor występuje najczęściej w formie soli fosforanowych. Jony fosforanowe są wykorzystywane, jako ortofosforany do syntezy licznych związków w grzybach.

Potas w grzybach występuje w postaci jonów potasu. Wpływa na potencjał membranowy i utrzymuje równowagę elektryczną w komórkach grzybów – nie może być zastąpiony przez inne pierwiastki. Potas pełni również istotną rolę w regulacji odczynu pH oraz jest

kofaktorem enzymów. W warunkach niedoboru potasu, transportowany jest on w pierwszej kolejności do obszarów aktywnie rosnących, takich jak wydłużające się części strzępek grzybów. Jednocześnie, nadmierna ilość potasu w pożywce może zaburzyć pobieranie jonów magnezu przez grzyby. Odpowiednie ilości potasu w pożywkach są niezbędne dla prawidłowego wzrostu i funkcjonowania grzybów.

W podłożach stosowanych w kulturach mycelialnych magnez dodawany jest w postaci soli, na przykład siarczanu magnezu. Magnez służy do odżywiania komórek. Ważne jest, aby stężenie magnezu w pożywce było w równowadze z innymi jonami, zwłaszcza z wapniem. Nadmiar magnezu może mieć toksyczne działanie.

W kulturach mycelialnych wapń dostarczany jest w postaci soli takich jak chlorek wapnia czy azotan wapnia. Wapń jest ważny dla utrzymania struktury błon plazmatycznych, a jego brak może prowadzić do zakłócenia funkcjonowania komórek i struktur błonowych [21,22].

Mikroelementy

Cynk, miedź, mangan działają jako kofaktory enzymów, aktywując je. Niedobór cynku może hamować syntezę tryptofanu. Molibden jest kofaktorem enzymów, które odgrywają ważną rolę w asymilacji azotu i metabolizmie azotanów. Kobalt jest składnikiem witaminy B₁₂. W połączeniu z molibdenem może zastąpić magnez, który jest niezbędny do działania polimerazy DNA i RNA.

Witaminy

Do witamin dodawanych do pożywek należą witamina B₁ (tiamina), witamina B₂ (ryboflawina) (składnik koenzymów FMN i FAD), nikotynamid (składnik koenzymów NAD i NADP), witamina B₆ (pirydoksyna), witamina B₇ (biotyna). Witaminy rozpuszczalne w tłuszczach na ogół nie są składnikami podłoża, natomiast witamina C dodawana jest wyłącznie jako związek redukujący, niemający wpływu na wzrost grzybni.

Woda

Woda stanowi od 70 do 98% składu grzybni. W organizmach wielokomórkowych pełni funkcję rozpuszczalnika, substratu oraz produktu licznych reakcji, które przebiegają w cytoplazmie oraz czynnika umożliwiającego transport i wymianę substancji między komórkami. Woda ma również zasadnicze znaczenie dla aktywności enzymów.

Inne składniki podłoży

Zapotrzebowanie na organiczne czynniki wzrostowe może być zaspokajane przez dodanie do podłoża pojedynczych substancji lub też surowców kompleksowych jak np. wyciągu ziemniaczanego, drożdżowego czy kukurydzianego. Dla grzybów mikorytycznych korzystny jest dodatek wyciągów z korzeni drzew, z którymi współegzystują (sosna, świerk, dąb) do podłoża hodowlanego.

Sposób przygotowania podłoża

Do sporządzenia podłoży używa się wody redestylowanej i odczynników o wysokim stopniu czystości. Makro i mikroelementy dodaje się w postaci roztworów stężonych, przechowywanych w temperaturze 4 °C. Podłoża sporządza się dodając najpierw sole mineralne, a następnie składniki organiczne. Po ich rozpuszczeniu mierzy się wartość pH roztworu i ustala na odpowiednim poziomie. Następnie podłoża poddaje się procesowi sterylizacji (opisano w „Stosowanie sterylizacji do zapewnienia czystości i skuteczności metody”).

Przegląd podłoży (pożywek) hodowlanych najczęściej stosowanych w kulturach mycelialnych

W kulturach mycelialnych stosuje się różne rodzaje pożywek, w zależności od specyficznych wymagań gatunku grzyba i celów hodowli. Wśród powszechnie używanych na uwagę zasługują:

Podłoże wg Oddoux – zastosowane w projekcie. Źródło węgla stanowi glukoza oraz ekstrakt słodowy, natomiast źródło azotu stanowi hydrolizat kazeiny. Medium to jest powszechnie stosowane do hodowli grzybów zarówno ektomikoryzowych, jak i nadrewnowych.

Potato Dextrose Agar (PDA) podłoże zawierające ekstrakt ziemniaczany i dekstrozę (cukier), uzupełnione agarem. PDA jest szeroko stosowany do izolacji i prowadzenia kultur mycelialnych.

Malt Extract Agar (MEA) podłoże składające się z ekstraktu słodowego, peptonu i agaru. MEA jest powszechnie stosowane do hodowli szerokiej gamy grzybów i jest szczególnie przydatne do sporulacji (proces wytwarzania spor, czyli przetrwalników).

Yeast Extract Peptone Dextrose Agar (YPD) podłoże zawierające ekstrakt drożdżowy, pepton, dekstrozę i agar. YPD to uniwersalne podłoże odpowiednie do hodowli grzybów wyższych.

Richard's Synthetic Medium podłoże powszechnie stosowane do hodowli grzybów ektomikoryzowych. Zawiera pepton, glukozę, azotan amonu i biopierwiastki wspomagające wzrost grzybów mikoryzowych.

Wybór podłoża zależy od specyficznych potrzeb hodowanego grzyba, pożądanego wyniku i dostępnych zasobów. Należy zauważyć, że różne grzyby mogą mieć różne wymagania żywieniowe, więc wybór podłoża powinien opierać się na konkretnych gatunkach grzybów i celach hodowli.

Warunki prowadzenia kultur mycelialnych

Warunki fizyczne odgrywają kluczową rolę w kulturach mycelialnych i mogą znacznie wpływać na wzrost, rozwój i produktywność grzybni.

Grzyby mają określone wymagania temperaturowe dla optymalnego wzrostu. Zakres temperatur może się różnić w zależności od gatunku grzyba. Niektóre grzyby preferują niższe temperatury (około 15–20 °C), podczas gdy inne rozwijają się w wyższych temperaturach (25–30 °C lub nawet wyższych). Utrzymanie odpowiedniej temperatury jest niezbędne do promowania wzrostu grzybni i zapobiegania niepożądanym skutkom, takim jak np. powolny wzrost.

Bardzo ważnym czynnikiem, który należy wziąć pod uwagę przy opracowaniu składu pożywki, jest odczyn pH. Grzybom sprzyja odczyn kwaśny, a optymalna kwasowość zależy od uprawianego gatunku. Dla większości gatunków optymalne pH mieści się w przedziale 4–6. Odczyn pH podłoża reguluje się przez dodanie związków buforujących. Monitorowanie i odpowiednie dostosowywanie pH pożywki może pomóc w utrzymaniu optymalnych warunków dla wzrostu grzybni [23].

Grzyby na ogół nie są zależne od światła i mogą być hodowane przy jego braku. W rzeczywistości ekspozycja na światło może czasami hamować wzrost niektórych grzybów. Niemniej jednak, w pewnych przypadkach, aby wywołać owocowanie lub produkcję specyficznych związków u niektórych grzybów, mogą być wymagane określone warunki oświetleniowe, takie jak zmiana intensywność światła czy zastosowanie fotoperiodu.

W sytuacji, gdy brak jest substancji żelujących w pożywce, a organizm hodowlany jest zanurzony w płynnej pożywce, konieczne jest nieustanne napowietrzanie hodowli, w przeciwnym razie komórki mogą ulec zanieczyszczeniu produktami fermentacji. Najczęściej hodowle na płynnych pożywkach są przeprowadzane w kolbach stożkowych, a napowietrzanie pożywki uzyskuje się poprzez szybkie wstrząsanie kolb na specjalnych urządzeniach. Jeśli eksplantat użyty do takiej hodowli składa się z luźnego skupiska komórek, wstrząsanie kultury może spowodować jego rozpadnięcie na pojedyncze komórki i drobne skupiska komórek.

Ponadto mieszanie lub wytrząsanie kultury sprzyja rozprowadzaniu składników odżywczych, zapobiega zbrylaniu się grzybni, co prowadzi do lepszego wzrostu i produktywności.

Optymalne warunki fizyczne mogą się różnić w zależności od gatunku grzyba, ponieważ różne grzyby mają specyficzne wymagania [24,25].

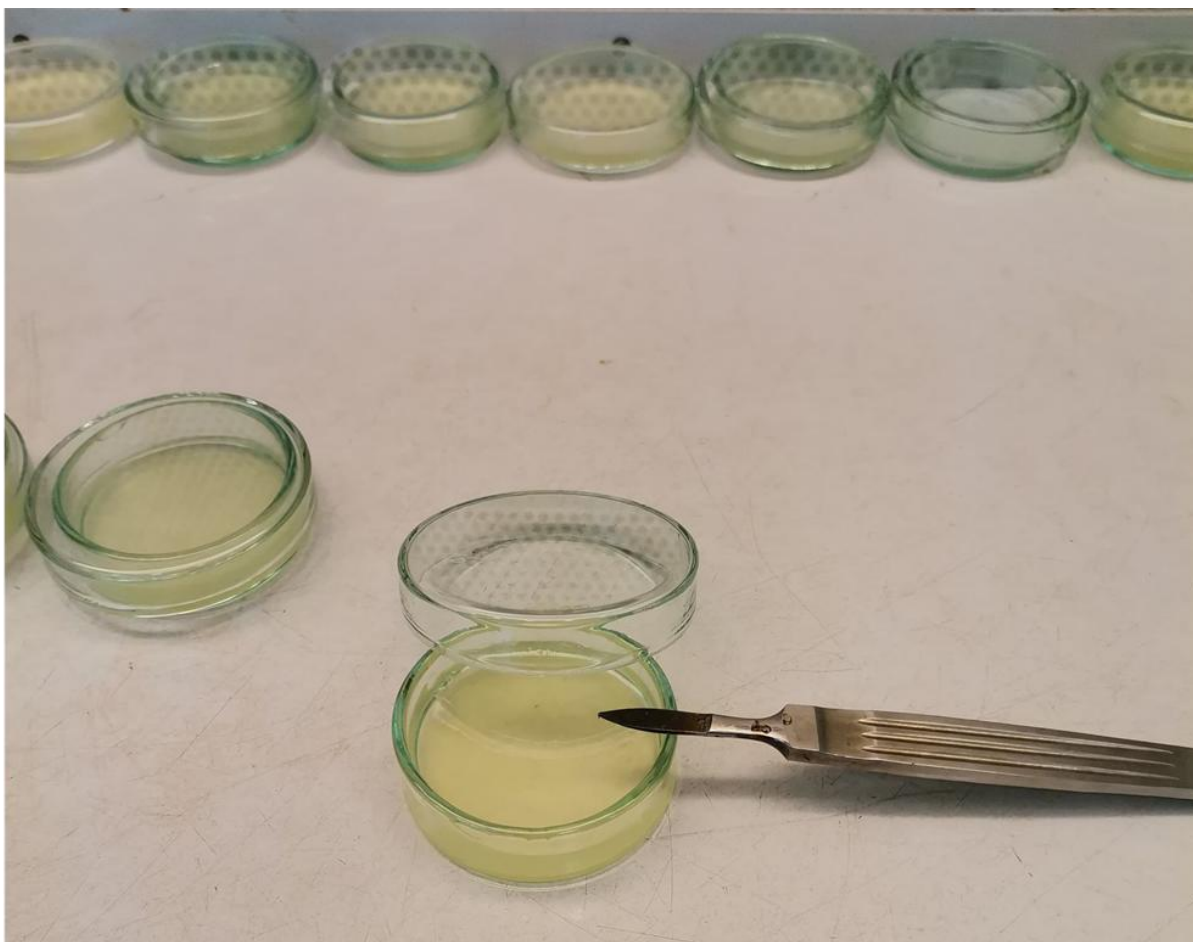
Otrzymywanie kultury macierzystej – etapy w ujęciu praktycznym

Pierwszym krokiem do otrzymania kultury macierzystej jest jej zainicjowanie. Najpowszechniejszym sposobem zakładania kultury mycelialnej jest izolacja fragmentu owocnika z trzonu lub warstwy hymenialnej. Przy wyborze owocnika, z którego jest pobierany eksplantat należy brać pod uwagę jego wiek, należy także uwzględnić jego lokalizację w organie oraz kondycję owocnika, z której pochodzi. Z owocników przeznaczonych do hodowli usuwa się części zeschnięte, resztki ziemi i inne Zanieczyszczenia. Następnie eksplantat należy poddać dezynfekcji. Stężenie środka użytego do dezynfekcji i jego czas działania powinny być tak dobrane, aby nie zniszczyć odtwarzanego materiału a jednocześnie usunąć całą florę mikrobiologiczną zarówno z powierzchni jak i wnętrza eksplantatu. Odkazanie materiału grzybowego odbywa się wstępnie przez zanurzenie na określony czas fragmentu owocnika w roztworze odkażającym, którym może być 70% etanol, a następnie kilkukrotne płukanie w sterylnej wodzie redestylowanej. W większości przypadków czas potrzebny do odkazania wynosi 1 min, jednak dla każdego materiału należy określić ten czas eksperymentalnie.

Penetracja środków odkażających jest głównie powierzchniowa, a więc źródłem zakażeń kultur są często mikroorganizmy znajdujące się wewnątrz eksplantatów. Szczególnie uciążliwe są bakterie latentne, których obecność ujawnia się dopiero po dłuższym okresie hodowli.

Innym sposobem inicjacji kultur mycelialnych jest wykiełkowanie wysterylizowanych zarodników (spor), które otrzymuje się przez wysyp z warstwy hymenialnej lub przez roztarcie wysuszonego hymenium z wodą.

Odkazony eksplantat umieszcza się na wysterylizowanej pożywce zestalonej agarą, na płycie Petriego (Fot. 6.), którą zabezpiecza się parafilmem, a następnie inkubuje w szafie hodowlanej w opisanych powyżej warunkach (Fot. 7.).



Fot. 6. Przygotowane podłoże agarowe służące do pasażowania kultur agarowych (fotografia Katarzyna Sułkowska-Ziaja)



Fot. 7. Inkubacja kultur agarowych w szafie hodowlanej (fotografia Katarzyna Kała)

Zatem pierwszym krokiem do otrzymania kultury macierzystej jest otrzymanie czystego gatunkowo mycelium na podłożu stałym, zestalonym agarem. Mycelium rośnie i rozprzestrzenia się po powierzchni agaru, co pozwala na obserwację i izolację poszczególnych kolonii grzybów. Na Fot. 8.–12. można zaobserwować otrzymane na potrzeby projektu kultury agarowe.



Fot. 8. Kultura agarowa płomiennicy zimowej (fotografia Katarzyna Sułkowska-Ziaja)



Fot. 9. Kultura agarowa polówki wiązkowej (fotografia Katarzyna Sułkowska-Ziaja)



Fot. 10. Kultura agarowa żółciaka siarkowego (fotografia Katarzyna Sułkowska-Ziaja)



Fot. 11. Kultura agarowa soplówki jeżowatej (fotografia Katarzyna Sułkowska-Ziaja)



Fot. 12. Kultura agarowa opieńki miodowej (fotografia Katarzyna Sułkowska-Ziaja)

Składniki pożywki są zużywane przez mycelium w różnym tempie, zależnie od rodzaju kultury, szybkości wzrostu i temperatury. Wynika z tego konieczność pasażowania kultur w pewnych odstępach czasu, zwykle co 4–6 tygodni. Polega to na zaszczerpieniu nowo przygotowanego podłoża agarowego fragmentem grzybni z kultury inicjalnej.

Kolejnym etapem jest otrzymanie kultur płynnych. W tym celu fragmenty grzybni o wymiarach 2×2 mm rosnące na pożywce agarowej przenosi na uprzednio przygotowane sterylne podłoże płynne, bez dodatku agaru (Fot. 13.). Kultury te określamy jako kultury płynne. Są one prowadzone w kolbach Erlenmayera o różnej pojemności 300 mL, 500 mL.



Fot. 13. Przygotowanie do etapu przenoszenia kultury agarowej na podłoże płynne (fotografia Katarzyna Sułkowska-Ziaja)

Po przeniesieniu fragmentu grzybni na podłoże płynne wlot kolby zabezpiecza się folią aluminiową oraz dodatkowo parafilmem a następnie umieszcza się na wytrząsarce rotacyjnej (Fot. 14.). Dynamiczne wytrząsanie kolb zapewnia napowietrzanie oraz równomierny dostęp składników odżywczych do formujących się strzępek.



Fot. 14. Kultury płynne umieszczone na wytrząsarce orbitalnej/obrotowej (fotografia Katarzyna Kała)

Kultury płynne, wytrząsane określane są jako kultury wgłębne. Prowadzi się je ok. 3 tygodnie i po tym czasie należy je pasażować w warunkach sterylnych na nowo przygotowane podłoże.

Na tym etapie otrzymana kultura mycelialna może stanowić grzybnię mateczną służącą do uprawy owocników na mniejszą skalę. Na Fot. 15. i 16. przedstawiono przykładowe kultury wytrząsane prowadzone w ramach projektu. W celu intensyfikacji przyrostów biomasy do otrzymania dużej ilości biomasy stosuje się bioreaktory [26].



Fot. 15. Wytrząsane kultury mycelialne płomiennicy zimowej (fotografia Katarzyna Sułkowska-Ziaja)



Fot. 16. Wytrząsane kultury mycelialne żółciaka siarkowego (fotografia Katarzyna Sułkowska-Ziaja)

Kultury wielkoskalowe odnoszą się do hodowli grzybni w kontrolowanym systemie bioreaktora. Zapewniają one precyzyjną kontrolę warunków środowiskowych, takich jak temperatura, pH, dostępność składników odżywczych i poziom tlenu, zapewniają także sterylne warunki. Naczynie i powiązane elementy, takie jak filtry powietrza, są sterylizowane przed użyciem.

Bioreaktory oferują skalowalność, umożliwiając uprawę grzybni na małą skalę laboratoryjną lub na większą skalę do produkcji przemysłowej. Rozmiar i konfigurację zbiornika można dostosować w zależności od pożądanej wielkości produkcji.

Zastosowanie bioreaktorów zapewnia lepszą kontrolę nad warunkami wzrostu, a także powtarzalność i skalowalność w porównaniu z tradycyjnymi kulturami kolbowymi lub płytkowymi. Technologia ta odgrywa istotną rolę w komercyjnej produkcji grzybni do różnych zastosowań, w tym do produkcji grzybów jadalnych, związków bioaktywnych, enzymów i biofarmaceutyków [27].

Stosowanie sterylizacji do zapewnienia czystości i skuteczności metody

Sterylność jest kluczowa dla zapewnienia wzrostu czystych kultur i uniknięcia wprowadzenia konkurencyjnych organizmów. Właściwa sterylizacja sprzętu, naczyń hodowlanych i pożywek, a także przestrzeganie sterylnych technik podczas inokulacji i przeszczepiania, są niezbędne do zapewnienia sukcesu hodowli. Sterylizacja polega na zniszczeniu wszystkich, zarówno wegetatywnych, jak i przetrwalnikowych oraz zarodnikowych form mikroorganizmów. Sterylizacji można dokonać mechanicznie, fizycznie bądź chemicznie, najczęściej używa się metod fizycznych. Prawidłowo wysterylizowany materiał jest jałowy – nie zawiera żadnych żywych drobnoustrojów (także wirusów) oraz ich form przetrwalnikowych.

Najczęściej stosowane metody sterylizacji to metoda termiczna mokra oraz metoda termiczna sucha. W przypadku pożywek, narzędzi oraz naczyń hodowlanych stosuje się metodę termiczną mokrą w której wykorzystuje się autoklaw. Autoklaw to hermetycznie zamykany zbiornik stalowy, w którym przeprowadza się proces sterylizacji. Jałowienie pożywek nie ulegających rozkładowi odbywa się w temperaturze powyżej 100 °C w parze nasyconej i pod ciśnieniem 1 atm (0.1 Mpa), dzięki któremu możliwe jest osiągnięcie temperatury wrzenia wody wynoszącej 121 °C. Czas trwania sterylizacji wynosi ok. 20 minut. W przypadku dodatków składników termowrażliwych do podłoża dodaje się je w komorze z laminarnym przepływem powietrza, po sterylizacji pożywki w autoklawie po uprzednim przefiltrowaniu przez filtry jałowe.

Steryлизację na sucho – przeprowadza się przez wyżarzanie – wyjaławianie narzędzi przez zanurzenie w alkoholu i opalenie w płomieniu palnika (opalenie wlotu próbówek i kolbek, opalenie narzędzi) lub z wykorzystaniem wyżarzacza parowego. Pomieszczenia w których prowadzi się kultury mycelialne można sterylizować z zastosowaniem promieniowania UV. Działanie dezynfekcyjne promieniami UV można uzyskać przy zastosowaniu fali poniżej 220 nm, a także fali w przedziale 250 a 270 nm [28].

Wszystkie czynności dotyczące zakładania (inicjowania), pasażowania przeprowadza się w loży z poziomym nawiewem jałowego powietrza (Fot. 17.).



Fot. 17. Loża laminarna (fot. Katarzyna Sułkowska-Ziaja)

Przechowywanie kultur mycelialnych

Istnieje kilka powszechnie stosowanych metod przechowywania grzybni. Jedną z nich jest przechowywanie kultur na skosach agarowych. Skosy agarowe przygotowuje się przez zaszczerpienie wysterylizowanego podłoża agarowego małym fragmentem aktywnie rosnącej grzybni. Następnie skosy inkubuje się, aż grzybnia całkowicie skolonizuje pożywkę. Skosy zamyka się sterylną nasadką i przechowuje w temperaturze około 4 ° C (w zależności od gatunku) (Fot. 18).



Fot. 18. Skosy agarowe służące do przechowywania kultur mycelialnych (fotografia Katarzyna Sułkowska-Ziaja)

Kultury można również przechowywać na płytkach agarowych. Podobnie jak w przypadku skosów agarowych, grzybnie wysiewa się na wysterylizowaną pożywkę agarową i pozostawia do wzrostu. Gdy grzybnia skolonizuje płytkę, można ją uszczelnić parafilmem lub innym odpowiednim materiałem i przechowywać w chłodnym środowisku.

Kriokonserwacja polega na zamrażaniu grzybni w bardzo niskich temperaturach, aby zachować ich żywotność przez długi czas. Grzybnie zazwyczaj zawiesza się w roztworze kriochronnym, takim jak glicerol lub sulfotlenek dimetylu (DMSO), przed zamrożeniem. Kultury można przechowywać w ciekłym azocie -196°C lub w głębokiej zamrażarce w temperaturze poniżej -80°C . Wybór metody przechowywania zależy od takich czynników, jak czas przechowywania, dostępne zasoby i specyficzne wymagania gatunku grzyba. Zaleca się okresowe sprawdzanie żywotności przechowywanych kultur i odświeżanie ich poprzez przeniesienie do świeżych pożywek lub ponowną hodowlę w razie potrzeby.

1.1. Kultury mycelialne wybranych gatunków grzybów w systemie zamkniętym

W pierwszym etapie badań zrealizowanych w ramach wykonanych zadań projektowych opracowano sposób pozyskiwania grzybni z owocników pięciu gatunków grzybów jadalnych/leczniczych: *Armillaria mellea*, *Cyclocybe aegerita*, *Flammulina velutipes*, *Hericiium erinaceus*, *Laetiporus sulphureus*. Owocniki badanych gatunków pozyskano ze stanu naturalnego i posłużyły one do inicjacji kultur na podłożu stałym (zgodnie z metodyką opisaną powyżej). Uzyskana grzybnia została przekazana gospodarstwu rolniczemu – Konrad Sadowski (32-608 Osiek) w celu zaszczepienia ziaren pszenicy i w konsekwencji uzyskania owocników.

Grzybnia mączna na podłożu stałym posłużyła do otrzymania kultur wytrząsanych na zmodyfikowanym podłożu płynnym wg Oddoux, w układzie zamkniętym (bez dopływu świeżego powietrza). W celu zainicjowania kultur mycelialnych, w warunkach sterylnych, w łożu z nawiewem jałowego powietrza, fragmenty grzybni pobrane z kultur stałych zostały przeniesione do kolb Erlenmayera zawierających podłoże płynne. Tak przygotowane kultury umieszczano na wytrząsarce rotacyjnej.

1.2. Kultury w bioreaktorach z systemem air–lift

Po dwóch tygodniach od założenia kultur płynnych otrzymaną biomasę przeniesiono do bioreaktorów zapewniających ciągły sposób mieszania. Ten rodzaj prowadzenia kultur w bioreaktorach napowietrzanych (skonstruowanych autorsko) pozwolił na otrzymanie wystarczającej ilości grzybni kontrolnej do analiz (Fot. 19.).



Fot. 19. Biorektor air–lift skonstruowany w Katedrze Botaniki Farmaceutycznej UJ CM
(fotografia Bożena Muszyńska)

1.3. Otrzymywanie grzybni na ziarnie do inokulowania balotów uprawowych

Grzybnię pozyskaną w punkcie 1.1 i 1.2 można zastosować do produkcji grzybni ziarnistej, służącej do szczepienia docelowego podłoża na bazie produktów spełniających wymagania określone w przepisach rozporządzenia Parlamentu Europejskiego i Rady (UE) 2018/848 z dnia 30 maja 2018 r. *w sprawie produkcji ekologicznej i znakowania produktów ekologicznych i uchylającego rozporządzenie Rady (WE) nr 834/2007*.

1.4. Otrzymanie podłoża oraz technologia upraw wybranych pięciu gatunków grzybów (*Armillaria mellea*, *Cyclocybe aegerita*, *Flammulina velutipes*, *Hericium erinaceus*, *Laetiporus sulphureus*)

W ramach współpracy z gospodarstwem rolniczym Konrada Sadowskiego w Osieku opracowano technologię otrzymywania kostki uprawowej ww. gatunków grzybów. Skład kostki opracowano na bazie dostępnego piśmiennictwa naukowego, a także dostępnych produktów spełniających wymagania określone w przepisach rozporządzenia Parlamentu Europejskiego i Rady (UE) 2018/848 z dnia 30 maja 2018 r. *w sprawie produkcji ekologicznej i znakowania produktów ekologicznych i uchylającego rozporządzenie Rady (WE) nr 834/2007*.

Po przeprowadzeniu doświadczeń oceniających przydatność produktów ubocznych rolnictwa i ogrodnictwa ekologicznego w uprawie grzybów zostało opracowane optymalne podłoże dla każdego z badanych gatunków. W ramach współpracy z gospodarstwem rolniczym zostały przeprowadzone cykle uprawowe dla każdego z gatunków grzybów. Wszystkie uprawy prowadzone były zgodnie z przepisami dotyczącymi rolnictwa ekologicznego. Proces prowadzono w specjalnie dostosowanym tunelu uprawowym z wymuszonym ciągiem powietrza i kontrolowaną wilgotnością (Fot. 20.).



Fot. 20. Tunel uprawowy (fotografia Konrad Sadowski)

W trakcie upraw precyzyjnie monitorowano temperaturę i wilgotność powietrza, termin pojawienia się zawiązków grzybowych oraz wszystkie inne niezbędne parametry, które były konieczne do opracowania skutecznej metody uprawy.

2. Uprawy

Poniżej przedstawiono opis wykonanych upraw pięciu gatunków grzybów wraz z szczegółową instrukcją postępowania. Dla każdego z gatunków przetestowano podłoża uprawowe o różnym składzie będące surowcami ubocznymi ekologicznej produkcji rolnej. Wszystkie surowce do sporządzenia w/w podłoży uprawowych zakupiono w Polsce.

W wyniku zrealizowanego projektu opracowano ekologiczne metody uprawy czterech z pięciu opisanych w projekcie gatunków grzybów. Uprawy *Armillaria mellea* były jedynymi, które się nie powiodły przypuszczalnie ze względu na krótki czas trwania projektu, co również może być bezpośrednio związane z biologicznymi uwarunkowaniami tego gatunku. Jego owocnikowanie w stanie naturalnym to przełom miesięcy jesiennych – najczęściej października i listopada, czyli czas przypadający na zakończenie realizacji projektu. Dodatkowym czynnikiem, który utrudniał uprawy tego gatunku były bardzo wysokie temperatury panujące w okresie letnim, które przekładały się na warunki w tunelu uprawowym, ale również na pierwszy etap otrzymywania grzybni matecznej, a następnie jej przerost substratu wyjściowego. Pozostałe gatunki *Cyclocybe aegerita*, *Flammulina velutipes*, *Hericium erinaceus* oraz *Laetiporus sulphureus* otrzymano na każdym z trzech zaplanowanych podłoży uprawowych. W przypadku gatunku *Flammulina velutipes* (płomiennica zimowa) konieczne było wymuszenie owocnikowania, a jako czynnik stresowy dla grzybni zastosowano znaczne obniżenie temperatury przez włożenie balotów do chłodziarki (temperatura 4 °C). Zabieg ten może stanowić alternatywę do nastrzykiwania zimnej wody do kostek uprawowych, co jest popularnym zabiegiem w krajach azjatyckich. Znaczące obniżenie temperatury okazało się przynieść doskonałe efekty i uzyskano kilka rzutów owocników płomienicy zimowej, niemniej jednak w przypadku opieńki miodowej nie przyniosło zamierzonych skutków.

Skład podłoży uprawowych opracowano we współpracy z gospodarstwem rolniczym w Osieku, na podstawie wiedzy własnej, ale również dostępnych danych z piśmiennictwa naukowego [29–32]. Cykl uprawowy trwał 3 miesiące (należy podkreślić, że ostateczny czas otrzymania owocników jest zależny od uprawianego gatunku i może się różnić o 2-4 tygodnie). W pierwszym kroku otrzymuję się grzybnię mateczną (co opisano powyżej), a z jej

wykorzystaniem należy zaszczerpić uwodnione i wysterylizowane ekologiczne ziarna pszenicy (Fot. 21. i 22.).



Fot. 21. Proces uwadniania ziaren pszenicy (fotografia Konrad Sadowski)



Fot. 22. Uwodnione i wysterylizowane ziarna pszenicy (fotografia Konrad Sadowski)

Wilgotność ziarna przed zaszczerpieniem grzybnią powinna wynosić ok. 55% (jest to istotne dla odpowiedniego przerostu ziarna). Zaszczerpienie ziarno przechowuje się w workach polipropylenowych z mikrofiltrami (0,2 μm , Unicorn Bags-Type 3, USA), ale także w odpowiednio przygotowanych słoikach szklanych z wbudowanymi mikrofiltrami (0,2 μm) czy specjalnych pojemnikach z polipropylenu (Fot. 23.–26.).



Fot. 23. Zaszczepione grzybnią matczyną ziarna pszenicy (fotografia Konrad Sadowski)



Fot. 24. Przerośnięte grzybnią ziarna pszenicy (fotografia Konrad Sadowski)



Fot. 25. Przerośnięte grzybnią gatunku *Flammulina velutipes* ziarna pszenicy (fotografia Konrad Sadowski)



Fot. 26. Przerośnięte grzybnią gatunku *Hericium erinaceus* ziarna pszenicy (fotografia Konrad Sadowski)

Przygotowano trzy rodzaje podłoży do upraw eksperymentalnych, w których podstawowe składniki stanowiły trociny bukowe i otręby pszenne w zmiennych proporcjach. Ze względu na istotny wpływ składu podłoża uprawowego na jakość owocników przeprowadzono analizę zawartości biopierwiastków w podłożach używanych do uzyskania owocników (jest to procedura istotna ze względu na potencjalną akumulację z podłoża i późniejsze oznaczenia w grzybni). Uśrednione zawartości biopierwiastków były następujące: Mg = 131 mg/100 g suchej masy (s.m.), Ca = 60 mg/100 g s.m., Fe = 12 mg/100 g s.m., Zn = 2 mg/100 g s.m., Cu = 0,4 mg/100 g s.m., Mn = 7 mg/100 g s.m., K = 238 mg/100 g s.m., Na = 4,3 mg/100 g s.m.

Przygotowane podłoża składają się odpowiednio z 70% trocin bukowych i 30% otrębów pszennych (podłoże 1), 55% trocin bukowych i 45% otrębów pszennych (podłoże 2), a także 70% trocin bukowych, 20% otrębów pszennych i 10% słomy rzepakowej (podłoże 3) (Tabela 1).

Tabela 1. Skład podłoży uprawowych w przeliczeniu na 15 worków doświadczalnych o masie 2,5 kg.

Typ surowca Rodzaj podłoża	Trociny bukowe	Otręby pszenne	Słoma rzepakowa	Woda
Podłoże nr 1 (wilgotność 55%)	70% (14,7 kg)	30% (6,3 kg)	-	16,5 L
Podłoże nr 2 (wilgotność 55%)	55% (11,55 kg)	45% (9,45 kg)	-	16,5 L
Podłoże nr 3 (wilgotność 55%)	70% (14,7 kg)	20% (4,2 kg)	10% (2,1 kg)	16,5 L

Wilgotność wyjściowa substratów używanych do przygotowania podłoża wynosi ok. 10% (obliczono to poddając składniki podłoża suszeniu przez 12 godzin w temperaturze 70 °C i licząc powstały w ten sposób ubytek wody). W przypadku trocin bukowych w naważce 0,98 kg – 0,88 kg stanowi masa sucha, a 98 mL woda, w otrębach pszennych w naważce 0,28 kg – 0,25 kg to masa sucha, a 28 mL woda, natomiast w słomie rzepakowej w 0,14 kg – 0,126 kg to masa sucha, a 14 mL woda. Wszystkie z przygotowywanych podłoży nawadnia się do wilgotności względnej 55% (10% wyjściowej wilgotności plus 45% dodatku wody zgodnie z Tabelą 1), miesza w mieszadle/mieszalniku (Fot. 27.) i przenosi się do specjalnych worków uprawowych z mikrofiltrami (2,5 kg podłoża w każdym worku doświadczalnym/balocie).



Fot. 27. Wymieszane podłoże uprawowe (fotografia Konrad Sadowski)

Następnie worki doświadczalne zawierające podłoże poddaje się sterylizacji parowej (H+P Varioklav 400E, HP Labortechnik, Berlin, Niemcy) przez 2 godziny (121 °C/1 atm) (Fot. 28. i 29.).



Fot. 28. Podłoże przygotowane do sterylizacji (fotografia Konrad Sadowski)



Fot. 29. Podłoże po sterylizacji (fotografia Konrad Sadowski)

Po schłodzeniu podłoże szczepi się wcześniej przygotowaną grzybnią ziarnistą (ziarna pszenicy przerośnięte grzybnią) (Fot. 30.) w stosunku 5% grzybni na 2,5 kg podłoża i przechowuje się w pomieszczeniu inkubacyjnym.



Fot. 30. Podłoże przygotowane do zaszczepienia przerośniętym ziarnem (fotografia Konrad Sadowski)

Całkowity przerost podłoża trwa do 3 tygodni (w przypadku opisanych gatunków). Worki doświadczalne inkubuje się w temperaturze 23–26 °C bez dostępu światła do momentu, aż grzybnia całkowicie przerośnie podłoże (Fot. 31.).



Fot. 31. Grzybnia przerastająca podłoże (fotografia Konrad Sadowski)

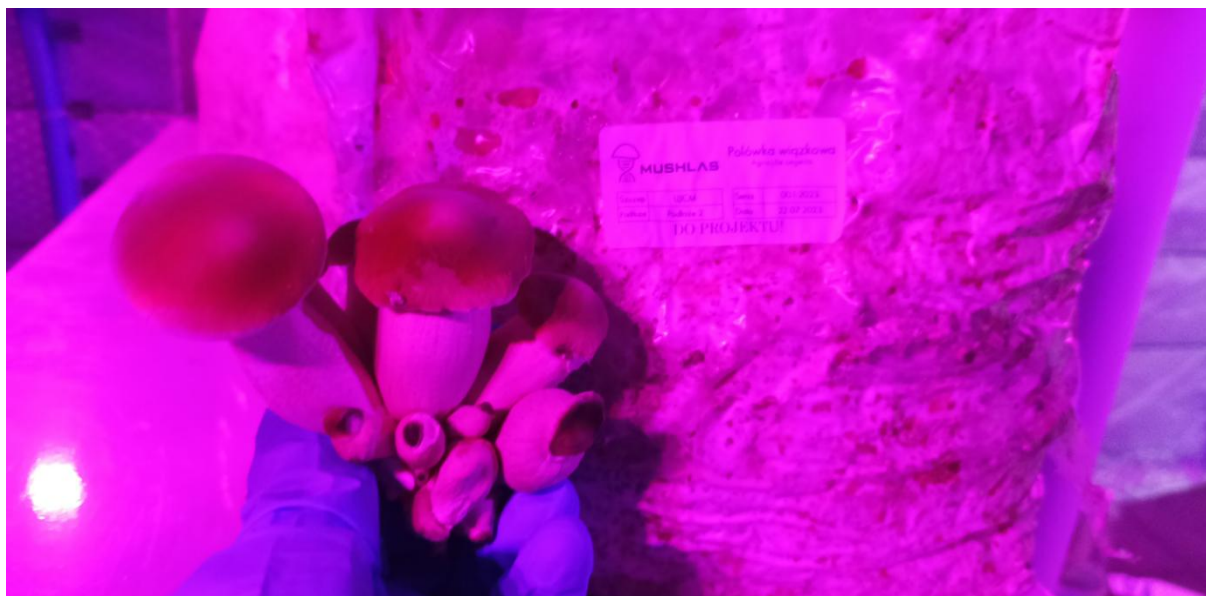
W przypadku płomiennicy zimowej należy zastosować chłodzenie w temperaturze 4 °C, aby zainicjować owocnikowanie, co jest szczególnie istotne gdy temperatura otoczenia wpływa na warunki uprawy – wiosna/lato (Fot. 32.).



Fot. 32. Proces chłodzenia balotów (fotografia Konrad Sadowski)

Po całkowitym przerośnięciu worki/baloty rozcina się i przenosi do uprawowego tunelu klimatycznego. W tunelu utrzymuje się temperaturę 21–25 °C (maksymalna temperatura w trakcie realizacji projektu wynosiła 28 °C, co miało związek z warunkami pogodowymi w lipcu i sierpniu), stały przepływ powietrza, wilgotność względną 85–90% i oświetlenie typu

dzień/noc o natężeniu 100–500 luksów. Około 3 tygodnie po umieszczeniu balotów w uprawowym tunelu klimatycznym zbiera się pierwsze owocniki (Fot. 33.–36.).



Fot. 33. Owocnikujący gatunek *Cyclocybe aegerita* (fotografia Konrad Sadowski)



Fot. 34. Owocnikujący gatunek *Flammulina velutipes* (fotografia Konrad Sadowski)



Fot. 35. Owocnikujący gatunek *Herichium erinaceus* (fotografia Konrad Sadowski)



Fot. 36. Owocnikujący gatunek *Laetiporus sulphureus* (fotografia Konrad Sadowski)

Kolejne 2-3 tygodnie później zbiera się drugi rzut owocników. W przypadku płomiennicy zimowej najlepszym cyklem uprawowym jest cykl jesienny, ze względu na panujące niższe temperatury otoczenia.

Oba rzuty dojrzałych owocników pozyskanych w ramach realizacji projektu zostały zebrane, zamrożone, a następnie zliofilizowane w temperaturze $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ (liofilizator Labconco Freezone 4.5, Kansas City, USA) w celu wykonania ekstraktów, a następnie analiz mykochemicznych w Katedrze Botaniki Farmaceutycznej UJ CM w Krakowie. Pobrano również próbki podłoża (Fot. 37.).



Fot. 37. Zebrane owocniki i próbki podłoża (fotografia Konrad Sadowski)

Warto podkreślić, że w ramach realizowanego projektu podjęto również próbę uprawy grzybów w warunkach półnaturalnych, zaszczepiając podłoże na terenie częściowo zalesionym grzybnią płynną, jednak ze względu na biologię owocnikowania, plon w postaci owocników jest spodziewany najszybciej w następnym roku 2024, a być może nawet w ciągu kilku najbliższych lat.

Założeniem projektu było otrzymanie owocników w sposób ekologiczny na różnych rodzajach podłoży (minimum trzech), co powiodło się i zostało szczegółowo opisane dla 4 gatunków. W ramach zrealizowanego projektu udowodniono, że najlepszy wzrost, a co za tym idzie plon płomiennicy zimowej, polówki wiązkowej, soplówki jeżowatej, a także żółciaka siarkowego można uzyskać z podłoża nr 2 (55% trocin bukowych i 45% otrębów pszennych). W przypadku soplówki jeżowatej dobrym rodzajem podłoża okazuje się również mieszanka trocin bukowych i otrębów pszennych w stosunku 70:30. Jest to niezwykle istotne ze względu na potencjalne rozpoczęcie ekologicznych upraw wielkoskalowych opisanych owocników, co będzie również korzystne dla konsumentów, tak aby otrzymać dobry jakościowo owocnik w możliwie najniższej cenie.

Dzięki pozytywnym wynikom eksperymentu, w przypadku czterech z pięciu wybranych gatunków grzybów (*Cyclocybe aegerita*, *Flammulina velutipes*, *Hericium erinaceus*, *Laetiporus sulphureus*), metoda ekologicznej uprawy grzybów leśnych będzie mogła stanowić rozwiązanie pozwalające firmom zajmującym się pozyskiwaniem grzybów ze stanu naturalnego na uniezależnienie się od okresowego występowania owocników w środowisku naturalnym. Dodatkowo, *H. erinaceus* w Polsce jest to gatunek w stanie naturalnym objęty

ściłą ochroną od 1995 r., bez możliwości zastosowania wyłączenia spod ochrony w przypadkach uzasadnionych względami gospodarki rolnej, leśnej lub rybackiej. Jest zagrożony z powodu braku ciągłości naturalnych drzewostanów zawierających buki i dęby, gdzie występowały drzewa obumierające, stare lub martwe oraz z powodu zmian klimatycznych, stąd uprawy komercyjne są jedyną możliwością na wprowadzenie tego unikalnego pod względem leczniczym gatunku do codziennej diety konsumentów w Polsce. Jest to bardzo ważne również ze względów gospodarczo-ekonomicznych, ponieważ stosowanie tego gatunku, jak i innych opisanych powyżej może być istotne ze względu na profilaktykę depresji, chorób neurodegeneracyjnych, a także innych chorób cywilizacyjnych, co dodatkowo potwierdza wzrastające zapotrzebowanie na te gatunki [12].

3. Analiza porównawcza zawartości związków biologicznie aktywnych w grzybni, owocnikach ze stanu naturalnego oraz z pozyskanych w projekcie

W celu oceny przydatności i jakości otrzymanych w projekcie owocników oraz grzybni wykonano analizy porównawcze składu ilościowego i jakościowego substancji biologicznie aktywnych opracowanymi i zwalidowanymi metodami analitycznymi. Jest to istotne, gdyż dodatkowo podkreśla wartość zrealizowanego projektu i opracowanych w nim metod upraw. Niniejszy opis będzie skupiał się na metodzie ekstrakcji i późniejszych analizach wybranych substancji bioaktywnych.

Pozyskane owocniki oraz grzybnię maticzną liofilizowano, rozdrabniano w moździerzu agatowym i poddawano ekstrakcji rozpuszczalnikami polarnymi w łaźni ultradźwiękowej z częstotliwością 40 kHz (Sonic-2, Polsonic). Ekstrakcję powtarzano dziewięciokrotnie dla każdego z badanych gatunków, zarówno kultur mycelialnych jak i owocników. Następnie uzyskiwane ekstrakty łączono (300 mL) i odparowywano. Odparowane ekstrakty rozpuszczano ilościowo w rozpuszczalniku o czystości do HPLC, a następnie przesączano przy użyciu filtrów membranowych (Millex, Millipore Corporation, USA). Otrzymane ekstrakty po przefiltrowaniu poddawano analizie metodą RP-HPLC z detekcją DAD (związki organiczne: indolowe, fenolowe, sterole, lowastatyna, ergotioneina itp.), F-ASA (biopierwiastki) oraz spektrofotometrycznymi (np. testy antyoksydacyjne, całkowita zawartość glukanów czy związków fenolowych). Analizy te przeprowadzano w celu porównania potencjału chemiczno-biologicznego, a co za tym idzie prozdrowotnego owocników pozyskanych z ekologicznych upraw (w projekcie) oraz tych sprowadzanych z

Chin bądź ze stanowisk naturalnych (*Flammulina velutipes*, *Armillaria mellea*), ale także grzybni matecznej wszystkich badanych gatunków.

Należy zwrócić uwagę na potencjał prozdrowotny oznaczanych substancji i ich znaczenie w profilaktyce wielu chorób. Bardzo istotna grupa analizowanych związków to niehalucynogenne pochodne indolu. Substancje te znane są ze swoich właściwości przeciwdepresyjnych, prokognitywnych, regulujących rytm dobowy – sen i czuwanie, przeciwutleniających i neuroprotekcyjnych [33,34]. Wśród nich szczególnie istotne znaczenie ma 5-hydroksy-L-tryptofan, który jest obecnie przedmiotem licznych eksperymentów w modelach zwierzęcych, ale analizuje się również jego skuteczność przeciwdepresyjną i neuroochronną w badaniach klinicznych [33]. Oznaczone związki fenolowe, w tym np. kwas *p*-hydroksybenzoesowy jest substancją o aktywności antyoksydacyjnej i przeciwzapalnej [35]. Sterole grzybowe, w szczególności ergosterol, w obecności promieni UV przekształcane są w witaminę D₂, która odgrywa istotną rolę w profilaktyce różnego rodzaju nowotworów oraz reguluje funkcje immunomodulacyjne organizmu człowieka [36,37]. Ponadto ergosterol jest odpowiedzialny za ułatwianie wchłaniania niezbędnych biopierwiastków, takich jak P i Ca, które przyczyniają się do prawidłowego funkcjonowania układu kostnego i przeciwdziałają osteoporozie [36,37]. Lowastatyna jest jedną ze statyn, które są inhibitorami reduktazy 3-hydroksy-3-metyloglutarylo-koenzymu A (HMG-CoA), kluczowego enzymu regulującego produkcję cholesterolu. Obniżając poziom cholesterolu całkowitego i jego frakcji lipoprotein o niskiej gęstości (LDL), statyny okazały się skuteczne w zapobieganiu chorobie miażdżycowej i wykazują właściwości przeciwutleniające i przeciwzapalne [38,39]. Ergotioneina jest również substancją o silnej aktywności przeciwutleniającej. Autorzy analizują jej związek z opóźnionym procesem starzenia organizmu człowieka, a także ogólnym wydłużeniem przeżycia. Ergotioneina jest niezwykle istotna ze względu na swoją obecność w grzybach, w tym w znacznych ilościach w soplówce jeżowatej [40]. Warto wspomnieć również o glukanach grzybowych. Glukany, zwłaszcza β -glukany występują w owocnikach i grzybni wszystkich grzybów z taksonu Basidiomycota. Są to substancje, które działają jako modyfikatory odpowiedzi biologicznej ze względu na swoje szerokie spektrum działania w układzie odpornościowym. Związki te są również znane ze swoich silnych właściwości przeciwutleniających – mogą przeciwdziałać uszkodzeniom DNA i niszczyć rakotwórcze metabolity [41]. Wpływ β -glukanów na zdrowie został szeroko zbadany i wielokrotnie opisany, ze szczególnym uwzględnieniem ich roli w modulowaniu układu odpornościowego, a także ich działania metabolicznego i bezpośredniego w przewodzie

pokarmowym [41]. Oczywiście optymalna zawartość biopierwiastków w grzybach jest istotna dla zachowania dobrostanu i równowagi w organizmie człowieka.

Spośród analizowanych owocników na szczególną uwagę zasługuje otrzymanie owocników *Hericium erinaceus* (soplówki jeżowatej – gatunku zagrożonego wyginięciem o szczególnych właściwościach ochronnych względem ośrodkowego układu nerwowego) o wysokiej zawartości związków bioaktywnych, takich jak: lowastatyna, ergotioneina, 5-hydroksy-L-tryptofan, L-tryptofan, 5-metylotryptamina, L-feniloalanina, ergosterol, glukany czy wykazujących znaczącą aktywność antyoksydacyjną potwierdzoną m.in. metodą DPPH. W przypadku lowastatyny – substancji o aktywności hipocholesterolemicznej, grzybnia mateczna soplówki jeżowatej okazała się jej bogatszym źródłem – oznaczono 5,81 mg/100 g s.m. w grzybni i 0,37 – 3,14 mg/100 g s.m. w owocnikach tego gatunku. Interesująca jest oznaczona zawartość bardzo silnego antyoksydantu jakim jest ergotioneina. Owocniki otrzymane w uprawach ekologicznych zawierają od 4 do niemal 7 razy więcej (207 – 315 mg/100 g s.m.) tej substancji w porównaniu do grzybni matecznej. Ilości te są również wyższe w porównaniu z owocnikami otrzymywanymi z upraw chińskich, co wskazuje na lepszą jakość otrzymanych w projekcie owocników. Innym ważnym antyoksydantem oznaczonym w soplówce jeżowatej jest ergosterol posiadający również aktywność immunomodulującą i przeciwnowotworową. Każdorazowo w analizowanym materiale jego ilości wynosiły >100 mg/100 g s.m., a najwyższą zawartością charakteryzował się pierwszy rzut owocników otrzymanych w uprawie ekologicznej w projekcie (161 mg/100 g s.m.). W odniesieniu do działania neuroochronnego jakie przypisuje się temu gatunkowi istotna jest także zawartość między innymi L-tryptofanu (wyższa w owocnikach 35,1 mg/100 g s.m.) i 5-hydroksy-L-tryptofanu (wyższa w grzybni matecznej – 131 mg/100 g s.m.). W przypadku tych substancji o aktywności neuroochronnej i prokognitywnej zarówno uprawy własne – owocniki pozyskane z gospodarstwa rolniczego w Osieku, ale również te pozyskane w sposób komercyjny były niemal równocenne. Soplówka jeżowata okazała się również gatunkiem o znacznej zawartości glukanów, będących jednymi z najważniejszych bioaktywnych metabolitów grzybowych (owocniki zawierały średnio około 30 g/100 g s.m. glukanów). W gatunku tym oznaczono również szereg biopierwiastków: Zn, Fe, Ca, Cu, Mg, K, Mn i Na, których równowaga w organizmie człowieka przekłada się również na jego dobrostan. Biorąc pod uwagę oczekiwania konsumentów dotyczące jakości spożywanej żywności ciekawa wydaje się analiza potencjału antyoksydacyjnego w dwóch kolejnych rzutach owocników soplówki jeżowatej. Okazuje się, że najsilniejszy potencjał antyoksydacyjny wykazuje grzybnia mateczna (1132 mg/g s.m. TE – ekwiwalentu troloksu), a następnie pierwszy rzut

owocników (888 mg/g s.m. TE). Drugi rzut owocników biorąc pod uwagę analizę potencjału antyoksydacyjnego wydaje się mniej wartościowy dla konsumentów, jednak należy podkreślić, że część z analizowanych substancji o charakterze prozdrowotnym np. L-tryptofan czy lowastatyna występowała w większej ilości właśnie w drugim rzucie owocników.

Istotna jest również analiza wyników uzyskanych dla pozostałych opisanych w projekcie gatunków – płomiennicy zimowej, polówki wiązkowej, żółciaka siarkowego, ale także grzybni matecznej opieńki miodowej. Wszystkie z analizowanych gatunków okazały się być dobrym źródłem pochodnych indolu np. L-tryptofanu czy 5-hydroksy-L-tryptofanu. Średnie zawartości oznaczonego tryptofanu wynosiły około 20 mg/100 g s.m., przy czym płomiennica zimowa zarówno ta pozyskana z upraw w projekcie, jak i owocniki pozyskane ze stanu naturalnego z lasu były jej najlepszym źródłem (zawartości tryptofanu wynosiły aż do 48,4 mg/100 g s.m.). Co ciekawe, grzybnia mateczna płomiennicy zimowej zawierała jedynie śladowe ilości tego niezwykle cennego aminokwasu, co podkreśla jak ważny jest sposób otrzymywania materiału grzybowego, a także rodzaj zastosowanego podłoża kierującego odpowiednio metabolizm grzyba na produkcję określonych substancji. Spośród analizowanych gatunków, to żółciak siarkowy (pozyskany z lasu i z upraw, ale również w postaci grzybni) był gatunkiem, w którym oznaczono najmniejsze zawartości L-tryptofanu utrzymujące się w granicach 10 mg/100 g s.m. Należy podkreślić, że gatunek ten mimo oznaczenia niższych zawartości L-tryptofanu okazał się najbogatszym źródłem lowastatyny (14,9 – 15,4 mg/100 g s.m.) oraz ergosterolu (170 – 808 mg/100 g s.m.), co podkreśla jego znaczenie prozdrowotne, ze szczególnym uwzględnieniem potencjału antyoksydacyjnego oraz aktywności hipocholesterolemicznej. Opieńka miodowa, której nie udało się otrzymać w postaci owocników, w formie grzybni matecznej okazuje się być źródłem: L-tryptofanu, kwasu *p*-hydroksybenzoesowego, lowastatyny, a także ergosterolu. W gatunku tym nie udało się natomiast oznaczyć L-fenylalaniny, która w znacznych ilościach występowała w kulturach mycelialnych pozostałych analizowanych w zrealizowanym projekcie gatunków. Spośród otrzymanych w projekcie ekologicznych owocników grzybów, to w płomiennicy zimowej i soplówce jeżowatej oznaczono najwyższe zawartości L-fenylalaniny (odpowiednio 183 i 190 mg/100 g s.m.).

W zrealizowanym projekcie udowodniono, że materiał grzybowy w postaci grzybni matecznej, ale przede wszystkim owocników pozyskanych z upraw ekologicznych może stanowić źródło wielu substancji o znaczeniu prozdrowotnym dla organizmu. W dobie poszukiwania wartościowej żywności analiza zawartości tak ważnych substancji bioaktywnych jak np. ergotioneina, lowastatyna, ergosterol, pochodne indolowe czy

biopierwiastki wydaje się być szczególnie istotna, tym bardziej, że w wielu przypadkach to właśnie owocniki pozyskane z upraw okazywały się być najbardziej wartościowe pod względem jakościowym. Otrzymane w projekcie wyniki zawartości substancji bioaktywnych w analizowanych gatunkach grzybów stanowią niezwykle istotne źródło informacji dotyczące bezpośredniego wpływu zastosowanego podłoża, ale także stadium wzrostowego – postaci grzybni matecznej i owocników oraz ich poszczególnych rzutów na jakość produktu końcowego trafiającego do konsumenta. Opisana w niniejszym poradniku uprawa grzybów w sposób ekologiczny i zrównoważony może stanowić impuls do rozpoczęcia produkcji wielkoskalowej.

IV. PODSUMOWANIE

Wprowadzenie na rynek gatunków grzybów z upraw ekologicznych ma zwiększyć zainteresowanie potencjalnych konsumentów produkcją ekologiczną jak i produktami o określonym wpływie na zdrowie.

Otrzymanie grzybów w uprawach, a następnie ich analiza mykochemiczna może stanowić pierwszy krok w dążeniu do rozwoju rolnictwa ekologicznego w zakresie produkcji grzybów uprawnych. Ponadto, należy podkreślić, że rozpoczęcie upraw grzybów leśnych łączy rozwijanie technik produkcji ekologicznej z wprowadzaniem na rynek produktów o korzystnym wpływie na zdrowie. Istotnym celem długofalowym będzie zwiększenie efektywności ekonomicznej przedsiębiorstw oraz małych gospodarstw ekologicznych, które zajmują się zbieraniem grzybów leśnych. Może to być osiągnięte poprzez wprowadzenie na rynek upraw wymienionych wcześniej gatunków jadalnych grzybów, które to zostały dokładnie opisane w niniejszym poradniku. Dzięki temu przedsiębiorstwa będą mniej zależne od sezonowego występowania określonych gatunków grzybów w środowisku naturalnym oraz rozszerzą swoją ofertę produktową.

Dodatkowo należy mieć na uwadze, iż proponowane rozwiązania bezpośrednio wpisują się w realizację Europejskiego Zielonego Ładu oraz w szczególności Strategii od Pola do Stołu (Farm to Fork/F2F) (*Strategia „od pola do stołu” na rzecz sprawiedliwego, zdrowego i przyjaznego dla środowiska systemu żywnościowego*). Strategia ta zakłada m.in. osiągnięcie na poziomie całej UE do 2030 r. pięciu głównych wskaźników – z czego jeden odnosi się wprost do rolnictwa ekologicznego: wzrost poziomu udziału powierzchni objętej systemem rolnictwa ekologicznego do 25%. Rozwój uprawy grzybów ekologicznych wpływa wprost na

ten wskaźnik, jak i również pośrednio poprzez wzrost popytu na ekologiczne surowce pochodzenia rolniczego wykorzystywane do przygotowania podłoży do uprawy.

Jednocześnie komercyjne uzyskiwanie grzybów, ze względu na swoją specyfikę, doskonale wpisują się w koncepcję zrównoważonych systemów żywnościowych, a ich uprawa zwiększa dostępność żywności pozytywnie wpływającej na zdrowie. Rozwinięcie ekologicznych metod uprawy grzybów stanowi także wdrożenie Planu Działań dotyczącego Rozwoju Produkcji Ekologicznej, który został przedstawiony przez Komisję Europejską w dokumencie COM(2021) 141 final.

V. PIŚMIENNICTWO

1. Zięba, P., Sękara, A., Sułkowska-Ziaja, K., Muszyńska, B. (2020). Culinary and medicinal mushrooms: Insight into growing technologies. *Acta Mycologica*, 55(2), 1086.
2. Royse, D.J., Baars, J., Tan, Q. (2017). Current overview of mushroom production in the world. W: D.C. Zied, A. Pardo-Giménez (Eds.), *Edible and medicinal mushrooms: Technology and applications* (pp. 5–13). John Wiley & Sons.
3. Cheung, P.C.K. (2010). The nutritional and health benefits of mushrooms. *Nutrition Bulletin*, 35(4), 292–299.
4. Rizzo, G., Goggi, S., Giampieri, F., Baroni, L. (2021). A review of mushrooms in human nutrition and health. *Trends in Food Science & Technology*, 117, 60–73.
5. Podkowa, A., Kryczyk-Poprawa, A., Opoka, W., Muszyńska, B. (2021). Culinary–medicinal mushrooms: A review of organic compounds and bioelements with antioxidant activity. *European Food Research and Technology*, 247, 513–533.
6. Muszyńska, B., Grzywacz-Kisielewska, A., Kała, K., Gdula-Argasińska, J. (2018). Anti-inflammatory properties of edible mushrooms: A review. *Food Chemistry*, 243(3), 373–381.
7. Muszyńska, B., Łojewski, M., Rojowski, J., Opoka, W., Sułkowska-Ziaja, K. (2015). Natural products relevance in the prevention and supportive treatment of depression. *Psychiatria Polska*, 49(3), 435–453.
8. Kała, K., Kryczyk-Poprawa, A., Rzewińska, A., Muszyńska, B. (2020). Fruiting bodies of selected edible mushrooms as a potential source of lovastatin. *European Food Research and Technology*, 246(22), 713–722.

9. Ren, S., Gao, Y., Li, H., Ma, H., Han, X., Yang, Z., Chen, W. (2023). Research status and application prospects of the medicinal mushroom *Armillaria mellea*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 195(5), 3491–3507.
10. Fukushima-Sakuno, E. (2020). Bioactive small secondary metabolites from the mushrooms *Lentinula edodes* and *Flammulina velutipes*. *The Journal of Antibiotics*, 73(10), 687–696.
11. Lo, K.M., Cheung, P.C.K. (2005). Antioxidant activity of extracts from the fruiting bodies of *Agrocybe aegerita* var. *alba*. *Food Chemistry*, 89(4), 533–539.
12. Friedman, M. (2015). Chemistry, nutrition, and health-promoting properties of *Hericium erinaceus* (Lion's Mane) mushroom fruiting bodies and mycelia and their bioactive compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(32), 7108–7123.
13. Grienke, U., Zöll, M., Peintner, U., Rollinger, J.M. (2014). European medicinal polypores-a modern view on traditional uses. *Journal of Ethnopharmacology*, 154(3), 564–583.
14. Bennett, J.W. (1998). Mycotechnology: The role of fungi in biotechnology. *Journal of Biotechnology*, 66(2–3), 101–107.
15. Trepá, M., Sułkowska-Ziaja, K., Kała, K., Muszyńska, B. (2022). Mycelial cultures as a model to study the accumulation of medicinal compounds – historical perspective. *Medicina Internacia Revuo*, 30(119), 50–63.
16. Papagianni, M. (2004). Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes. *Biotechnology Advances*, 22(3), 189–259.
17. Zervakis, G., Philippoussis, A., Ioannidou, S. (2001). Mycelium growth kinetics and optimal temperature conditions for the cultivation of edible mushroom species on lignocellulosic substrates. *Folia Microbiologica*, 46, 231–234.
18. Braun, S., Susan, E., Vecht–Lifshitz, S.E. (1991). Mycelial morphology and metabolite production. *Trends in Biotechnology*, 9(1), 63–68.
19. Peksen, A., Kibar, B., Yakupoglu, G. (2013). Favourable culture conditions for mycelial growth of *Hydnum repandum*, a medicinal mushroom. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 10(6), 431–434.
20. Daza, A., Manjon, J.L., Camacho, M., Romero De La Osa, L., Aguilar, A., Santamaria, C. (2006). Effect of carbon and nitrogen sources, pH and temperature on *in vitro* culture of several isolates of *Amanita caesarea*. *Mycorrhiza*, 16, 133–136.

21. Jarstfer, A., Farmer–Koppenol, P., Sylvia, D. (1998). Tissue magnesium and calcium affect arbuscular mycorrhiza development and fungal reproduction. *Mycorrhiza*, 7, 237–242.
22. Mendoza, L., Karuppayil, S.M, Szaniszlo, P.J. (1993). Calcium regulates *in vitro* dimorphism in chromoblastomycotic fungi: Calcium reguliert *in vitro* den Dimorphismus von Chromoblastomykose-Erregern. *Mycoses*, 36(5-6), 157–164.
23. Zervakis, G., Philippoussis, A., Ioannidou, S., Diamantopoulou P. (2001). Mycelium growth kinetics and optimal temperature conditions for the cultivation of edible mushroom species on lignocellulosic substrates. *Folia Microbiologica*, 46, 231–234.
24. Tanner, R.S., Hurst, C.J., Crawford, R.L., Garland, J.L., Lipson, D.A., Mills, A.L., Stetzenbach, L.D. (2007). Cultivation of bacteria and fungi. *Manual of Environmental Microbiology*, 6, 69–78.
25. De Araujo, A.A., Roussos, A. (2002). A technique for mycelial development of ectomycorrhizal fungi on agar media. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 98, 311–318.
26. Musoni, M., Destain, J., Thonart, P., Bahama, J.B., Delvigne, F. (2015). Bioreactor design and implementation strategies for the cultivation of filamentous fungi and the production of fungal metabolites: From traditional methods to engineered systems. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, 19(4), 430–442.
27. Lu, H., Lou, H., Hu, J., Liu, Z., Chen, Q. (2020). Macrofungi: A review of cultivation strategies, bioactivity, and application of mushrooms. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 19(5), 2333–2356.
28. Rutala, W.A., David, J.W. (2001). New disinfection and sterilization methods. *Emerging Infectious Diseases*, 7(2), 348–353.
29. Gonkhom, D., Luangharn, T., Hyde, K. D., Stadler, M., Thongklang, N. (2022). Optimal conditions for mycelial growth of medicinal mushrooms belonging to the genus *Hericium*. *Mycological Progress*, 21(9), 82.
30. Philippoussis, A., Zervakis, G., Diamantopoulou, P. (2001). Bioconversion of agricultural lignocellulosic wastes through the cultivation of the edible mushrooms *Agrocybe aegerita*, *Volvariella volvacea* and *Pleurotus* spp. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 17(2), 191–200.
31. Sánchez, C. (2010). Cultivation of *Pleurotus ostreatus* and other edible mushrooms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85(5), 1321–1337.

32. Sokół, S., Gola-Siwulska, I., Sobieralski, K., Siwulski, M., Górka, K. (2015). Biology, cultivation, and medicinal functions of the mushroom *Hericium erinaceum*. *Acta Mycologica*, 50(2), 1–18.
33. Maffei, M.E. (2020). 5-Hydroxytryptophan (5-HTP): Natural occurrence, analysis, biosynthesis, biotechnology, physiology and toxicology. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(1), 181.
34. Muszyńska, B., Komendacki, P., Kała, K., Opoka, W., Rojowski, J. (2014). L-Tryptophan and its derivatives in edible mushrooms species. *Medicina Internacia Revuo*, 26, 82–88.
35. Nowacka, N., Nowak, R., Drozd, M., Olech, M., Los, R., Malm, A. (2014). Analysis of phenolic constituents, antiradical and antimicrobial activity of edible mushrooms growing wild in Poland. *LWT – Food Science and Technology*, 59(2) Part 1: 689–694.
36. Joradon, P., Rungsardthong, V., Ruktanonchai, U., Suttisintong, K., Iempridee, T., Thumthanaruk, B., Vatanyoopaisarn, S., Sumonsiri, N., Uttapap, D. (2022). *Ergosterol content and antioxidant activity in Lion's Mane mushroom (Hericium erinaceus) and its induction to vitamin D₂ by UVC-irradiation*. W: X. Feng (Ed.), *Proceedings of the 8th International Conference on Agricultural and Biological Sciences (ABS 2022)* (Vol. 1, str. 19–28).
37. Sułkowska-Ziaja, K., Hałaszk, P., Mastej, M., Piechaczek, M., Muszyńska, B. (2016). Mycosterols—Characteristics and biological importance. *Medicina Internacia Revuo*, 27, 26–34.
38. Dicks L., Ellinger S. (2020). Effect of the intake of oyster mushrooms (*Pleurotus ostreatus*) on cardiometabolic parameters – a systematic review of clinical trials. *Nutrients*, 12(4), 1134.
39. Walther, U., Emmrich, K., Ramer, R., Mittag, N., Hinz, B. (2016). Lovastatin lactone elicits human lung cancer cell apoptosis via a COX-2/PPAR γ -dependent pathway. *Oncotarget*, 7(9), 10345–10362.
40. Roda, E., Ratto, D., De Luca, F., Desiderio, A., Ramieri, M., Goppa, L., Savino, E., Bottone, M. G., Locatelli, C. A., Rossi, P. (2022). Searching for a longevity food, we bump into *Hericium erinaceus* primordium rich in ergothioneine: The "longevity vitamin" improves locomotor performances during aging. *Nutrients*, 14(6), 1177.
41. Cerletti, C., Esposito, S., Iacoviello, L. (2021). Edible mushrooms and beta-glucans: Impact on human health. *Nutrients*, 13(7), 2195.