

Sprawozdanie Merytoryczne

„Uprawy polowe metodami ekologicznymi: badania w zakresie ekologicznej uprawy jadalnych grzybów leśnych” – dotacja Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi (zł: sto dziewięćdziesiąt trzy tysiące dziewięćset osiemdziesiąt sześć złotych) dla Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum (decyzja o udzieleniu finansowania z dnia 5.04.2023 r.).

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 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 wahań 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.

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 młodych kapeluszy.

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*).

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 mięszem, 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*).

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 antymutagenne, zawierają ponadto substancje o działaniu antybiotycznym [11].

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

Występuje w Ameryce Północnej, Europie i Azji. W Polsce jest gatunkiem rzadkim. Jest gatunkiem 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*.

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.

Analizy składu chemicznego owocników, wykazały, 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 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 -hydroksytramentenolowy, 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 projektu poprzedzony był konsultacjami z firmami działającymi w branży zbioru i uprawy grzybów, w tym również z innymi firmami z branży produkcji ekologicznej. Firmy te analizowały, 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.

CEL BADAŃ

Związki bioaktywne pozyskane z owocników lub grzybni wybranych gatunków, takich jak *Armillaria mellea*, *Cyclocybe aegerita*, *Flammulina velutipes*, *Hericium erinaceus* czy *Laetiporus sulphureus*, odgrywają istotną rolę w prewencji chorób związanych z rozwojem cywilizacji. To może 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 obecnie prowadzonych badań 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 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 wymagała zatem specjalistycznej wiedzy, natomiast sama uprawa grzybów na przygotowanych kostkach była prowadzona w mniej wymagających warunkach – uprawowym tunelu klimatycznym, co może zostać odtworzone po odpowiednim przeszkoleniu osób, które zajmą się ekologiczną produkcją owocników grzybów opisanych w projekcie.

Nadrzędnym celem projektu było opracowanie kompleksowej technologii upraw grzybów dla gospodarstw – od otrzymania kostki uprawowej po zbiór owocników. Po jego zakończeniu, w stworzonym opracowaniu o charakterze poradnika znajdują się szczegółowe wytyczne dotyczące uprawy wybranych gatunków grzybów, co pozwoli gospodarstwom na ekologiczną produkcję grzybów leśnych.

OPIS SZCZEGÓŁOWY BADAŃ I UZYSKANE WYNIKI

Badania podzielono i wykonano w toku wzajemnie powiązanych zadań badawczych.

I. Pozyskanie grzybni matecznej wybranych gatunków grzybów jadalnych/dziko-rosnących

1. Kultury w systemie zamkniętym

W pierwszym etapie badań 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. Uzyskana grzybnia została przekazana gospodarstwu rolniczemu – Konrad Sadowski (32-608 Osiek) w celu zaszczepienia ziaren pszenicy i w konsekwencji uzyskania owocników. Gospodarstwo wytypowano i wybrano do realizacji projektu, ze względu na to, że pierwotnie planowana współpraca z gospodarstwem Wiesława Zięby stała się niemożliwa z powodu braku chęci przystąpienia do certyfikacji upraw ekologicznych.

Grzybnia mateczna 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 łoży 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.

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.

3. Otrzymywanie grzybni na ziarnie do inokulowania balotów uprawowych

Grzybnia pozyskana w punkcie 1 została zastosowana 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.

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 została opracowana technologia 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. 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.

II. Uprawy

Podczas realizacji projektu wykonano doświadczenie z pięcioma gatunkami grzybów i dla każdego z nich przetestowano podłoża uprawowe o różnym składzie będące surowcami ubocznymi ekologicznej produkcji rolnej. Wszystkie surowce do sporządzenia w/w podłoży uprawowych zakupiono w Polsce (w tym z certyfikowanych gospodarstw).

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 niniejszego 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*, *Hericiium 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 płomiennicy 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 [14-17]. Cykl uprawowy trwał 3 miesiące. W tym czasie otrzymano grzybnię mateczną, a z jej wykorzystaniem zaszczepiono uwodnione i wysterylizowane ekologiczne ziarna pszenicy. Wilgotność ziarna przed zaszczepieniem grzybnią wynosiła 55% (było to istotne dla odpowiedniego przerostu ziarna). Zaszczepione ziarno przechowywano w workach polipropylenowych z mikrofiltrami (0,2 µm, Unicorn Bags-Type 3, USA). 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. 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 składały 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). Wszystkie z przygotowanych podłoży zostały nawodnione do wilgotności względnej 55%, wymieszane w mieszadło i przeniesione do specjalnych worków uprawowych z mikrofiltrami (2,5 kg podłoża w każdym worku doświadczalnym/balocie). Następnie worki doświadczalne zawierające podłoże zostały poddane sterylizacji parowej (H+P Varioklav 400E, HP Labortechnik, Berlin, Niemcy) przez 2 godziny (121 °C/1 atm). Po schłodzeniu podłoże zaszczepiono wcześniej przygotowaną grzybnią ziarnistą (ziarna pszenicy przerośnięte grzybnią) w stosunku 5% grzybni na 2,5 kg podłoża i przechowywano w pomieszczeniu inkubacyjnym. Całkowity przerost podłoża trwał

do 3 tygodni. Worki doświadczalne inkubowano w temperaturze 23–26 °C bez dostępu światła do momentu, aż grzybnia całkowicie przerosła podłoże. W przypadku płomiennicy zimowej zastosowano schłodzenie w temperaturze 4 °C, aby zainicjować owocnikowanie. Po zarośnięciu worki/baloty zostały rozcięte i przeniesione do uprawowego tunelu klimatycznego. W tunelu utrzymywano temperaturę 21–25 °C (maksymalna temperatura 28 °C, co miało związek z warunkami pogodowymi), ze stałym przepływem powietrza, wilgotnością względną 85–90% i oświetleniem typu dzień/noc o natężeniu 100–500 luksów. Około 3 tygodnie po umieszczeniu balotów w uprawowym tunelu klimatycznym, zebrano pierwsze owocniki. Kolejne 2 tygodnie później zebrano drugi rzut owocników. W przypadku płomiennicy zimowej najlepszym cyklem uprawowym był cykl jesienny, ze względu na panujące niższe temperatury. Oba rzuty dojrzałych owocników zostały zamrożone, a następnie zliofilizowane w temperaturze -40 °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.

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 podłoża (minimum trzech), co powiodło się dla 4 gatunków. W ramach zrealizowanego projektu udało się udowodnić, że najlepszy wzrost, a co za tym idzie plon płomiennicy zimowej, polówki wiązkowej, sopłówki jeżowatej, a także żółciaka siarkowego uzyskano z podłoża nr 2 (55% trocin bukowych i 45% otrębów pszennych). W przypadku sopłówki jeżowatej dobrym rodzajem podłoża okazała 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*, *Hericiium 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 ścisłą 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 wybranych do projektu może być istotne ze względu na profilaktykę depresji, chorób neurodegeneracyjnych, a także innych chorób cywilizacyjnych, co dodatkowo potwierdza wzrastające zapotrzebowanie na te gatunki [12].

III. 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. W tym celu otrzymane owocniki oraz grzybnię maticzną zliofilizowano, rozdrobniono w mrożeniu w młynku agatowym i poddano ekstrakcji rozpuszczalnikami polarnymi w łaźni ultradźwiękowej z częstotliwością 40 kHz (Sonic-2, Polsonic). Ekstrakcję powtórzono dziewięciokrotnie dla każdego z badanych gatunków, zarówno kultur mycelialnych jak i owocników. Następnie uzyskane ekstrakty łączono (300 mL) i odparowywano. Odparowane ekstrakty rozpuszczano ilościowo w rozpuszczalniku o czystości do HPLC, a następnie sączono przy użyciu filtrów membranowych (Millex, Millipore Corporation, USA). Otrzymane ekstrakty po przefiltrowaniu poddano 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 przeprowadzono 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 maticznej wszystkich gatunków.

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-fenylalanina, ergosterol, glukany czy wykazujących znaczącą aktywność antyoksydacyjną potwierdzoną m.in. metodą DPPH. Uzyskane i opracowane na podstawie niniejszego projektu dane posłużyły do przygotowania publikacji naukowej pt. „*Hericiium* spp. – analysis of the content of bioactive substances in mycelia and two fruiting bodies flushes” będącej obecnie w procesie recenzji wtórnej w renomowanym czasopiśmie *Journal of Food Composition and Analysis* wydawnictwa Elsevier. 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 macecznej 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 maceczna 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 najniższe 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 macecznej 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 tym 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 macecznej, 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 mącznej i owocników oraz ich poszczególnych rzutów na jakość produktu końcowego trafiającego do konsumenta. Opisana w projekcie uprawa grzybów w sposób ekologiczny i zrównoważony może stanowić impuls do rozpoczęcia produkcji wielkoskalowej.

PODSUMOWANIE

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

Realizacja tego projektu może stanowić pierwszy krok w dążeniu do rozwoju rolnictwa ekologicznego w zakresie produkcji grzybów uprawnych. Ponadto, projekt łączy rozwijanie technik produkcji ekologicznej z wprowadzaniem na rynek produktów o korzystnym wpływie na zdrowie. Istotnym celem długofalowym zrealizowanego projektu jest 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. 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. Projekt kończy się także stworzeniem praktycznego przewodnika, zawierającego wskazówki i zalecenia dotyczące produkcji ogrodniczej czterech wybranych gatunków grzybów opisanych w ramach projektu, tj. *Hericium erinaceus*, *Cyclocybe aegerita*, *Flammulina velutipes* oraz *Laetiporus sulphureus*. Wyniki zrealizowanego projektu w formie przygotowanego poradnika z możliwością pobrania go w wersji PDF będą dostępne od dnia 15 listopada 2023 roku na stronie internetowej Działu Nauki Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum.

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. 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.
15. 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.
16. Sánchez, C. (2010). Cultivation of *Pleurotus ostreatus* and other edible mushrooms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85(5), 1321–1337.
17. Sokół, S., Gólak-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.