

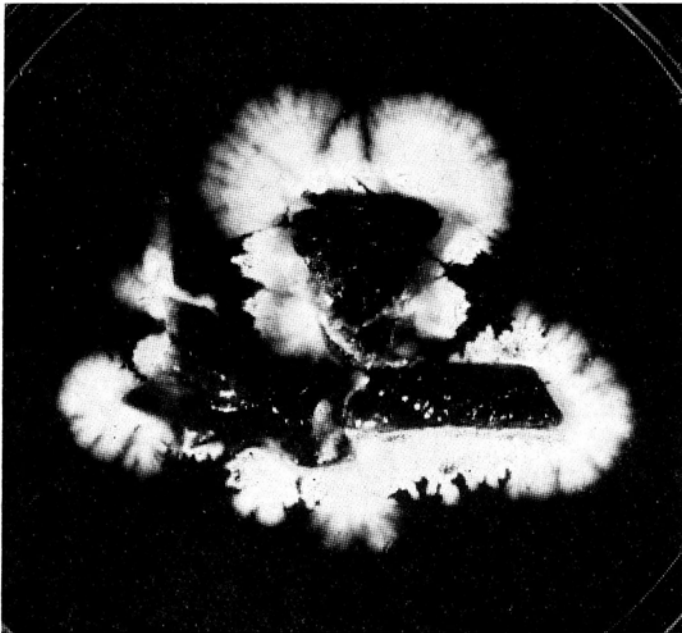
JOANNA DIAK

HODOWLE MYCELIARNE GRZYBÓW WIELKOOWOCNIKOWYCH

Grzyby wielkoowocnikowe są współcześnie przedmiotem coraz intensywniejszych badań biochemicznych i fizjologicznych. Hodowle myceliarne grzybów wielkoowocnikowych mogą stać się w przyszłości źródłem składników pokarmowych, szczególnie białek i witamin, lub też podobnie jak pleśnie źródłem nowych leków. Jednak u grzybów wielkoowocnikowych nie został jeszcze wystarczająco poznany zespół warunków prowadzący do szybkiego wzrostu myceliów i formowania się struktur fruktyfikacyjnych na podłożach syntetycznych. Oddoux (1953) podaje, że z przebadanych 508 gatunków *Basidiomycetes*, na pożywce zawierającej agar, ekstrakt maltozowy i elementy nieorganiczne, 248 gatunków rośnie oraz może być zachowane przy życiu przez kolejne przeszczepianie i przechowywanie w obniżonej temperaturze. Są to gatunki z następujących rodzajów: *Boletus*, *Marasmius*, *Collybia*, *Mycena*, *Clitocybe*, *Melanoleuca*, *Lyophyllum*, *Rhodopaxillus*, *Naucoria*, *Hebeloma*, *Dryophila*, *Geophila*, *Conocybe*, *Lepiota*, *Psaliota*. Gatunki z rodzajów *Inocybe* i *Russula* nie dawały wzrostu, a gatunki z rodzajów *Tricholoma*, *Rhodophyllum*, *Lactarius* dawały różne rezultaty.

Osobny problem w hodowli myceliarnej grzybów wielkoowocnikowych stanowi uzyskanie czystej kultury z jednej spory lub zawiesiny spor. Spory otrzymuje się przez wysyp z kapelusza lub roztarcie wysuszonych blaszek z wodą. Po wyjąłowieniu zawiesiny wodnej spor, nanosi się ją na wyżej wymienioną pożywkę. Ten typ pożywki stałej ubogiej w składniki odżywcze jest stosowany najczęściej przy wstępnych pracach izolacyjnych zmierzających do otrzymania kultur wzorcowych. Z jednej spory można uzyskać jedno mycelium, gdy każdą kiełkującą sporę przeniesie się na osobną szalkę z tą samą pożywką. Podobny efekt osiąga się drogą kolejnych rozcieńczeń zawiesiny wodnej spor, aż do momentu uzyskania w kropli wody jednej spory, którą przenosi się na szalkę z pożywką. Humfeld (1954) i Cirillo (1960) podają metodę otrzymywania myceliów poprzez izolację tkanki z trzonka, lub warstwy hymenialnej grzyba. W tym celu sterylizuje się powierzchniowo owocnik w podgrzanym alkoholu i odpowiednie fragmenty tkanki przenosi na pożywkę.

Panuje pogląd, że mycelia grzybów wielkoowocnikowych podobnie jak pleśnie nie wymagają do swego wzrostu wieloskładnikowych pożywek syntetycznych.



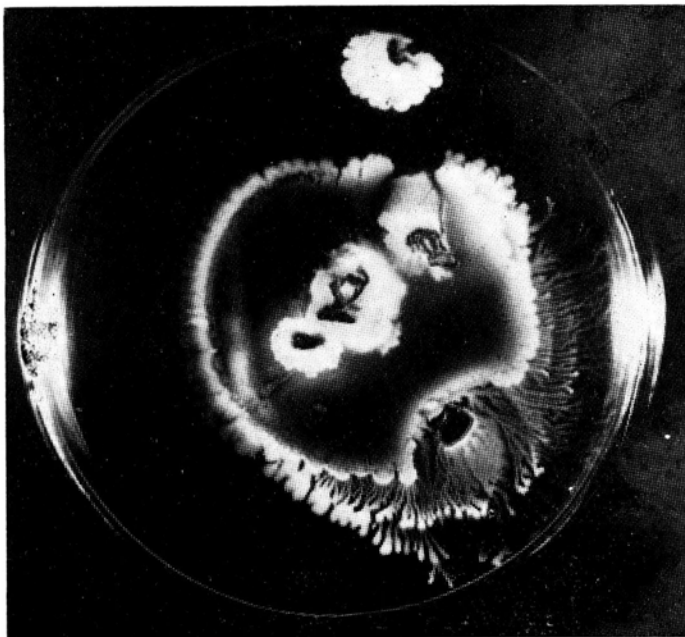
Ryc. 1. Mycelium i fragmenty owocnika *Stropharia aeruginosa* (Curt. ex Fr. /Quel.). Hodowla własna

Organicznym źródłem węgla jest najczęściej glikoza lub ekstrakt maltozowy. Z przeprowadzonych dotychczas badań wynika, że grzyby wielkoowocnikowe w hodowlach myceliarnych mogą zużywać azot jedynie w postaci związków organicznych. Jennison, Newcomb (1955) badali zapotrzebowanie na azot związany nieorganicznie (sole amonowe) i azot związany organicznie (aminokwasy, kazeina, pepton) u 42 gatunków grzybów nadrzewnych z rodzajów: *Peniophora*, *Polyporus* i *Trametes*. Hodowle płynne-wytrząsane prowadzili ze standardowych myceliów na pożywce o następującym składzie: $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,5 g, KH_2PO_4 1,5 g, źródła azotu 100 mg, elementy śladowe: Cu 0,01 mg, Fe 0,05 mg, Mn 0,01 mg, Mo 0,01 mg i Zn 0,07 mg na 1000 ml H_2O .

70 ml. pożywki w kolbie Erlenmayera (250 ml) inokulowano odpowiednim mycelium i inkubowano w temperaturze $28^\circ C$ przez 7 dni. Autorzy stwierdzili, że tylko *Trametes serialis* wykazuje wzrost w obecności chlorku amonu jako jedyne źródła azotu. Przebadane gatunki grzybów nadrzewnych najlepiej przyswajają następujące aminokwasy: arginę, cysteinę, kwas glutaminowy, glutaminę i walinę. W literaturze zazwyczaj podaje się, że grzyby są wrażliwe na niedobór co najmniej czterech witamin: tiaminy, biotyny, inozytolu i pirydoksyny. Jennison, Newcomb (1955) stwierdzili, że *Armillaria mellea*, *Merillus americanus*, *Polyporus sulphureus*, *Poria radiculosa* rosną na pożywce syntetycznej z dodatkiem tylko tiaminy, natomiast *Poria vailantii* i *Fomes officinalis* wymagają do wzrostu adeniny, biotyny, ryboflawiny i pirydoksyny.

Temperatura i pH podłoża wywierają duży wpływ na procesy życiowe kulturowanych organizmów. Dla przebadanych gatunków grzybów wielkoowocnikowych

wartość pH, przy której następuje wzrost myceliów, waha się w granicach od 5,0 do 6,0 z wyjątkiem grzybów nadrzewnych, gdzie pH może ulec obniżeniu aż do 4,0. Temperatury inkubacji myceliów są zależne od indywidualnych wymagań badanego gatunku, lecz najczęściej mieszczą się w zakresie od 20°C do 30°C. Z reguły kultury wzorcowe przechowuje się w temperaturze 4°C. Jak wykazały doświadczenia, odpowiednie warunki świetlne i temperaturowe są niezbędne do inicjacji i rozwoju struktur fruktyfikacyjnych w hodowlach myceliarnych grzybów wielkoowocnikowych. Kitamoto, Takahashi, Kasai (1968) wyprowadzili kultury myceliarne *Favolus arcularis* (Fr.) Amies. ze spor na 2% agarze maltozowym. Po tygodniu inkubacji w ciemności w temperaturze 25°C, uzyskane mycelia używano jako inokulum, zachowując tę samą pożywkę i temperaturę inkubacji. Po dwóch dniach od momentu pierwszego przeszczepienia przeniesiono kultury z ciemności na światło ciągłe około 250 ± 300 lux. Po trzech dniach ekspozycji na świetle w centrum kolonii powstało cielisto zabarwione primordium „pierwotne ciało owocujące”. Następnie obserwowano tworzenie się i wydłużanie trzonka na około 10—20 mm. Z kolei trzonek rozpląszczał się w pobliżu końca elongacji i pory ukazywały się na kapeluszu. Kolor kapelusza przechodził z białego w kremowobiały i spory były już widoczne w hymenium. Rozwój owocnika u *Favolus arcularis* trwał siedem do ośmiu dni po inokulacji i zachodził tylko na świetle. Na uwagę zasługuje fakt, że owocniki formowały się w centrum kolonii, gdy kultury umieszczano na świetle natychmiast po inokulacji, lecz gdy kultury rosły w ciemności przez trzy do pięciu dni przed ekspozycją świetlną, na kolonii tworzył się pierścień owocników (fairy ring). Oprócz *Favolus arcularis* te same typy rozmieszczenia owocników na kolonii obserwowano



Ryc. 2. Mycelium i fragmenty owocnika *Cystoderma amiantinum* (Scop. ex Fr./Fr.). Hodowla własna

także u *Coprinus logopus* Rea. *Coprinus macrorhizus* Rea. W badaniach nad *Coprinus macrorhizus* Rea. f. *microspora* Hongo (Tsusue, Yanaginata 1968), stwierdzono efektywny wpływ obniżonej temperatury w dwóch różnych stadiach morfogenezy, a mianowicie w powstawaniu i rozwoju primordium, oraz we wzroście i dojrzewaniu ciał owocujących. Mycelia kultywowano na agarze ziemniaczano-cukrowym o pH 6,0 w temperaturze 30°C i świetle ciągłym fluoryzującym około 500 lux. Po czterech dniach kultury przenoszono do chłodni o temperaturze 5°C na 24 godziny. Następnie inkubowano w temperaturze 30°C i już po pierwszym dniu zauważono tworzenie się drobnych primordiów zorganizowanych w kolistą strefę. Po sześciu dniach hodowli w standardowych warunkach zastosowano jeszcze raz temperaturę 5°C przez 24 godziny i w efekcie po łącznie dwunastu dniach kultury rozwijały się sterylne owocniki.

Tylko u nielicznych gatunków grzybów mikorytycznych udało się wywołać fruktyfikację na podłożach syntetycznych. Grzyby koprofilne są łatwiejsze w hodowli, ponieważ można stosunkowo łatwo odtworzyć środowisko naturalne, stosując odpowiednie podłoże. Niektóre gatunki grzybów koprofilnych kultywuje się na skalę przemysłową np: *Agaricus bisporus* w Europie i Ameryce Półn. *Cortinellus shii-take* w Japonii i *Volvaria volvacea* w Azji Połud. Oprócz kompostu naturalnego w hodowli *Agaricus bisporus* stosuje się komposty sztuczne preparowane ze słomy, ziarn kukurydzy i innych produktów naturalnych. Kilka milionów ton owocników *Cortinellus shii-take* produkuje się rocznie w Japonii. Oryginalną metodę kultywacji stosuje się już od 2000 lat. Specjalnie preparowane kłody drewna inokulowane są zawiesiną spor i inkubowane od 1 do 2 lat. Po inkubacji kłody wytrząsa się w wodzie i suszy, a owocniki zbiera w ciągu kilku dni. Hodowla grzybów koprofilnych na podłożach syntetycznych również napotyka duże trudności, a lepiej udaje się na podłożach zawierających wyciągi z produktów naturalnych. Humfeld (1954) podaje, że z 18 litrów pożywki zawierającej wyciągi z gruszek i asparagusa, inokulowanej 70 g mycelium *Agaricus bisporus*, po 24 godzinach inkubacji w temperaturze 26°C, otrzymuje się 600 g mycelium o charakterystycznym grzybowym zapachu.

Na pożywkach stałych (zestalonych agarem) lub płynnych inokulowanych zarodnikami grzybowymi, czy fragmentami myceliów, mycelia rosną na powierzchni pożywek w formie luźnej lub zbitej pilśni. Ten rodzaj kultywacji jest prostszy i tańszy, lecz polecany tylko w badaniach początkowych, gdy ustala się ogólne parametry doświadczenia. W dalszych etapach badań biochemicznych i fizjologicznych stosowane są kultury płynne-wytrząsane, chociaż niejednokrotnie napotyka się duże trudności w uzyskaniu tych samych metabolitów co w kulturach powierzchniowych. Jednak w kulturach płynnych-wytrząsanych wzrost myceliów następuje w całej objętości pożywki, a także w porównaniu z kulturami powierzchniowymi wydajniejsze jest zużycie składników pożywki. Technika kultur płynnych-wytrząsanych umożliwia przewietrzanie myceliów powietrzem lub tlenem, co bardzo podnosi wydajność hodowli. Przejście w hodowlach myceliarnych od pożywek stałych, na których wyprowadzane są kultury wzorcowe, do pożywek płynnych-wytrząsanych ułatwia pomiar wzrostu mycelium i badanie jego metabolitów, a także stwarza możliwość wzbogacenia składu pożywki wyciągami z odpowiednich substratów.

Wielu autorów podkreśla, że ekstrakty z różnych substancji naturalnych takich, jak: humus, mech, drewno stymulują wzrost myceliów. W przypadku grzybów nadrzewnych rozkładających celulozę, hemicelulozę i ligniny, pożywki płynne mogą zawierać ekstrakty z drewna, słomy, ziarn kukurydzy i innych węglowodanowych substratów. Tego typu hodowle prowadzone są w odpowiednio dużych fermentorach i nierzadko mają charakter produkcji półprzemysłowej, chociażby ze względu na niewątpliwe wartości odżywcze myceliów grzybowych. Np. mycelia *Tricholoma nudum* i *Polyporus palustris* (Reusser, Spencer 1958) zawierają około 60% białka bogatego w lizynę i tryptofan oraz witaminę B. Bogatym źródłem białek, aminokwasów egzogennych i witamin (biotyna, tiamina, pirydoksyna, kwas pantotenowy, kwas foliowy, ryboflawina) są mycelia *Morchella esculenta*, *M. hortensis*, *M. hybrida*, hodowane na podłożu płynnym z dodatkiem serwatki sera i wyciągu z nasion dyni, (Litchfield 1964). Mycelium *Agaricus bisporus* jest jednym z najlepszych naturalnych źródeł kwasu nikotynowego i ryboflawiny. Na ogół w myceliach występują te same witaminy co w owocnikach, z wyjątkiem witaminy E (tokoferolu), której dotychczas nie znaleziono w hodowlach myceliarnych.

Substancje biologicznie czynne (produkty metabolizmu wtórnego) występujące w owocnikach mogą być również produkowane przez mycelia, a mycelia pod wpływem zmienionych warunków wegetacji mogą metabolizować substancje o nowych właściwościach biologicznych i strukturach chemicznych nie spotykanych w owocnikach. Leung, Paul (1967, 1968) wyodrębnili z mycelium *Psilocybe baeocystis* psilocybinę (substancję halucynogenną), występującą także w owocnikach tego gatunku grzyba, oraz dwie nowe pochodne psilocybin, baeocystinę i norbaeocystinę i nie występujące w owocnikach. Podobnie w hodowli myceliarnej *Calvatia gigantea*, w której czynnik cytostatyczny o charakterze mukoproteidu (calvacin) znaleziony w owocniku był także wydzielany przez mycelium do pożywki (Beneke 1963). Od kilkunastu lat w literaturze pojawiają się listy kultur myceliarnych grzybów wielkoowocnikowych, których ekstrakty mają działanie cytostatyczne. Największą aktywność hamującą rozwój nowotworów przeszczepialnych (Carcinoma 755, Sarcoma 180, Leukemia L-1210) wykazują kultury następujących gatunków: *Irpex flavus*, *Poria corticola*, *Hericium erinaceum*, *Tricholoma paneolum*, *Polyporus sp.* (Espenshade, Gregory, Healy, Agersborg 1966). Grzyby wielkoowocnikowe, podobnie jak bakterie i pleśnie, mają zdolność przeprowadzania transformacji biogenetycznych in vitro. Ta właściwość, a przede wszystkim możliwość uzyskiwania wtórnych metabolitów, budzi coraz większe zainteresowanie hodowlami myceliarnymi grzybów wielkoowocnikowych.

Zakład Farmakologii PAN w Krakowie, ul. Ojcowska 52

LITERATURA

- Beneke E. S., 1963. *Mycologia* 55, 257.
 Cirillo V. P., 1960. U.S. Patent 2, 928, 210, March 15.
 Espenshade M. A., Gregory F. J., Healy E. M., Agersborg H., 1966. *Mycologia* 58, 80.

- Humfeld H., 1952. U.S. Patent 2, 618, 900, Nov. 25.
- Humfeld H., 1954. U.S. Patent 2, 693, 665, Nov. 9.
- Jennison M. W., Newcomb M. D., 1955. *Mycologia* 47, 275.
- Kitamoto Y., Takahashi M., Kasai Z., 1968. *Plant. and Cell. Physiol.* 9, 797.
- Leung A. Y., Paul A. G., 1967. *J. Pharm. Sci.* 56, 146.
- Leung A. Y., Paul A. G., 1968. *J. Pharm. Sci.* 57, 1667.
- Litchfield J. H., 1964. *Food Science* 29, 690.
- Oddoux L., 1953. *Mushroom Science* 2, 21.
- Reusser F., Spencer J., 1958. *Appl. Microbiol.* 6, 1.
- Tsue Y. M., Yanaginata T., 1968. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 14, 213.