

Katarzyna Kała

Substancje biologicznie aktywne owocników i mycelium kultur *in vitro* wybranych grzybów jadalnych

Grzyby jadalne należą do żywności obecnej w diecie człowieka od wieków. Ceniono je ze względu na smak, potencjał odżywczy, ale także właściwości prozdrowotne. Udowodniono, że grzyby jadalne wykazują szereg aktywności, m.in. działanie antyoksydacyjne, immunostymulujące, przeciwdrobnoustrojowe, przeciwmiażdżycowe, czy przeciwzapalne. Mimo licznych doniesień dotyczących znaczenia terapeutycznego grzybów, niestety wciąż panuje przekonanie o ich niskim potencjale dietetycznym i leczniczym, dlatego istotna jest kompleksowa analiza zawartości substancji o aktywności prozdrowotnej, ze szczególnym uwzględnieniem ich potencjalnej biodostępności i rzeczywistego znaczenia dla organizmu człowieka.

Celem mojej pracy była ocena potencjału prozdrowotnego owocników i myceliów z kultur *in vitro* wybranych grzybów jadalnych, poprzez przeprowadzenie analizy zawartości substancji prozdrowotnych (biopierwiastków, niehalucynogennych związków indolowych, kwasów fenolowych, lowastatyny) w materiale grzybowym, a następnie ocenę ich biodostępności. Do analizy biodostępności zastosowano roztwory sztucznych soków trawiennych oraz specjalnie skonstruowany aparat Gastroel-2014, który umożliwia ekstrakcję w temperaturze ciała człowieka 37°C. Celem pracy było również badanie biodostępności *in vitro* w modelu transportu biernego i aktywnego tak, aby udowodnić, że związki o znaczeniu leczniczym są nie tylko ekstrahowane do sztucznych soków trawiennych, ale mogą być również wchłaniane w organizmie człowieka i działać terapeutycznie. Przedmiotem pracy było również otrzymanie kultur mycelialnych wybranych gatunków grzybów na modyfikowanych podłożach tak, aby zapewnić grzybni jak najlepsze właściwości i wzmocnić jej potencjał prozdrowotny w tym np. działanie antyoksydacyjne, przeciwmiażdżycowe, czy przeciwdepresyjne.

W wyniku przeprowadzonego eksperymentu z użyciem owocników dwunastu gatunków grzybów jadalnych, wykonano kompleksową analizę zawartości biopierwiastków, związków indolowych, a także kwasów fenolowych wyekstrahowanych do sztucznych soków trawiennych w warunkach *in vitro*. Dokonano również optymalizacji metody wytrawiania. Udowodniono, że dla większości gatunków czas przebywania w soku żołądkowym – 60 minut, jest najkorzystniejszy dla sumarycznych ilości wyekstrahowanych biopierwiastków, ale także jest korzystny dla ilości oznaczonych związków organicznych.

W kolejnej pracy analizowano również zawartość związków bioaktywnych w owocnikach gatunku *Tricholoma equestre*, który w niektórych krajach jest uznany za gatunek toksyczny, wywołujący rabdomiolizę. Na podstawie otrzymanych wyników wykazano, że gatunek ten nie

wyróżnia się spośród innych gatunków grzybów jadalnych szczególnymi właściwościami prozdrowotnymi, a w badaniach *in vitro* (z zastosowaniem ludzkich komórek nabłonkowych niedrobnokomórkowego raka płuc A549) może wywoływać nawet efekt prozapalny, co przemawia za zachowaniem dużej ostrożności przy jego spożywaniu.

W pracy doktorskiej podjęto również niezwykle istotną z punktu widzenia konsumentów analizę zawartości i biodostępności biopierwiastków w zależności od metody ich przechowywania i konserwacji. Badano materiał świeży, mrożony, a także suszony metodą liofilizacji, na słońcu oraz gorącym powietrzem w komercyjnie dostępnej suszarce spożywczej (temp. 60°C). Wykazano, że suszenie metodą liofilizacji oraz na słońcu jest najkorzystniejsze dla zawartości i biodostępności cynku, miedzi, żelaza oraz magnezu z badanych owocników. Biodostępność analizowanego magnezu i cynku była największa, sięgała prawie 100%. Biodostępność żelaza i miedzi była nieco mniejsza (maksymalnie 51,9% i 71,5%).

W owocnikach i kulturach mycelialnych badano również zawartość lowastatyny, substancji o znaczeniu hipocholesterolemicznym. Udowodniono, że grzyby jadalne mogą być jej dobrym źródłem, ale także wykazano możliwości biotechnologiczne w kierunku wzbogacania kultur mycelialnych *Lentinula edodes* w tę substancję, co może prowadzić do wzmocnienia ich aktywności prozdrowotnej.

Analizując zawartość cynku i związków indolowych wyekstrahowanych do sztucznych soków trawiennych z kultur mycelialnych gatunku *Imleria badia* wykazano, że po odpowiedniej modyfikacji podłoża (dodatek cynku), gatunek ten może być dobrym źródłem oznaczonych substancji o potencjale przeciwdepresyjnym. W wyniku przeprowadzenia analiz w modelu transportu aktywnego i biernego wykazano, że 100 g s.m. materiału grzybowego otrzymanego po dodaniu do pożywek wodorooasparaginianu cynku w ilości 200 mg/L, może pokryć dziennie zapotrzebowanie na cynk dorosłego człowieka (~12 mg).

Wykazano również, że kultury mycelialne mogą być z powodzeniem wzbogacane w kwasy fenolowe o aktywności antyoksydacyjnej, poprzez dodanie do pożywek do kultur mycelialnych L-feniloalaniny, będącej roślinnym prekursorem syntezy kwasów fenolowych. Udowodniono także możliwości akumulacyjne związków cynku i selenu, które przy jednoczesnej dużej zawartości kwasów fenolowych i ich wysokiej potencjalnej biodostępności (97,4 mg/100 g s.m. kwasu *p*-hydroksybenzoesowego oraz 15,6 mg/100 g s.m. kwasu protokatechowego), mogą w sposób korzystny wpływać na zdrowie człowieka.

Na podstawie przeprowadzonych badań udowodniono, że grzyby jadalne (owocniki i mycelia z kultur *in vitro*) stanowią cenny surowiec o właściwościach profilaktycznych, dietetycznych, ale także leczniczych.

Edible mushrooms are food that has been present in the human diet for centuries. They were appreciated for their taste, nutritional potential, and health-promoting properties. It has been proven that edible mushrooms exhibit a number of activities, including antioxidant, immunostimulating, antimicrobial, anti-atherosclerotic or anti-inflammatory effects. Despite numerous reports on the therapeutic importance of mushrooms, unfortunately, there is still a belief about their low dietary and therapeutic potential, therefore a comprehensive analysis of the content of substances with pro-health activity is important, with particular emphasis on their potential bioavailability and real importance for the human body.

The aim of my study was to assess the health-promoting potential of fruiting bodies and mycelia from *in vitro* cultures of selected edible mushrooms by analyzing the content of health-promoting substances (bioelements, non-hallucinogenic indole compounds, phenolic acids, lovastatin) in the mushroom material, and then assessing their bioavailability. For the analysis of bioavailability, solutions of artificial digestive juices and a specially constructed Gastroel-2014 apparatus were used, which enables extraction at a human body temperature of 37°C. The aim of the study was also to test the *in vitro* bioavailability in the passive and active transport model, so as to prove that compounds of therapeutic importance are not only extracted into artificial digestive juices, but can also be absorbed in the human body and cause a therapeutic effect. The subject of the work was also to obtain mycelial cultures of selected species of mushrooms on modified substrates so as to provide the mycelium with the best properties and enhance its health-promoting potential, including, for example, antioxidant, anti-atherosclerotic or antidepressant effects.

As a result of the experiment with the use of fruiting bodies of twelve species of edible mushrooms, a comprehensive analysis of the content of bioelements, indole compounds and phenolic acids extracted into artificial digestive juices in *in vitro* conditions was performed. The digestion method was also optimized. It has been proved that for most species, the being time in gastric juice – 60 minutes, is the most favorable for the total amounts of released bioelements, but it is also favorable for the amounts of the determined organic compounds.

The next study also analyzed the content of bioactive compounds in fruiting bodies of the species *Tricholoma equestre*, which in some countries is recognized as a toxic species that causes rhabdomyolysis. On the basis of the obtained results, it was shown that this species does not differ from other edible mushroom species with its special health-promoting properties, and *in vitro* studies (using human A549 lung epithelial cells) may even cause a pro-inflammatory effect, which is a reason to be very careful when consuming it.

The doctoral dissertation also includes an analysis of the content and bioavailability of bioelements, which is extremely important from the point of view of consumers, depending on the method of their storage and conservation. The fresh, frozen, and dried using the lyophilization

method, sun-drying and in hot air in a commercially available food dryer (temperature 60°C) material was tested. It was shown that drying by lyophilization and sun-drying is the most favorable for the content and bioavailability of zinc, copper, iron and magnesium from the tested fruiting bodies. The bioavailability of the analyzed magnesium and zinc was the highest, reaching almost 100%. The bioavailability of iron and copper was slightly lower (at the maximum levels of 51.9% and 71.5%, respectively).

The content of lovastatin, a substance of hypocholesterolemic importance, was also tested in fruiting bodies and mycelial cultures. It has been proven that edible mushrooms can be a good source of it, but also biotechnological possibilities have been shown to enrich *Lentinula edodes* mycelial cultures with this substance, and thus enhance their pro-health activity.

By analyzing the content of zinc and indole compounds extracted into artificial digestive juices from mycelial cultures of the *Imleria badia* species, the study showed that after appropriate modification of the medium (addition of zinc), this species can be a good source of marked substances with antidepressant potential. As a result of the analyzes carried out in the active and passive transport model, it was shown that 100 g of d.w. mushroom material obtained after adding zinc hydrogen aspartate to the substrates in the amount of 200 mg/L, can cover the daily requirement for zinc in an adult (~12 mg).

It has also been shown that mycelial cultures can be successfully enriched with phenolic acids with antioxidant activity by adding L-phenylalanine to the mycelial culture media, which is a plant precursor for the synthesis of phenolic acids. The accumulation potential of zinc and selenium compounds has also been proven, which, due to the high content of phenolic acids and their high potential bioavailability (97.4 mg/100 g d.w. *p*-hydroxybenzoic acid and 15.6 mg/100 g d.w. protocatechuic acid), can have a beneficial effect on human health.

On the basis of the conducted research, it was proved that edible mushrooms (fruiting bodies and mycelia from *in vitro* cultures) are a valuable material with prophylactic, dietary and therapeutic properties.