

Czy mycelia z kultur *in vitro* *Amanita muscaria* i *Amanita pantherina* versus owocniki mogą być potencjalnym źródłem substancji w profilaktyce i terapii depresji

Role of mycelia derived from *in vitro* cultures of *Amanita* spp. as a potential source of bioactive compounds with therapeutic potential for the mitigation and management of depressive disorders

Katarzyna Kała¹, Katarzyna Sułkowska-Ziaja¹, Joanna Piotrowska²,
Marta Gajda³, Agnieszka Sękara³, Kamil Hnatyk¹, Jan Lazur¹,
Bożena Muszyńska¹

¹ Katedra Biotechnologii Roślin i Grzybów Leczniczych, Wydział Farmaceutyczny,
Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum, Kraków

² Katedra Chemii Nieorganicznej i Analityki Farmaceutycznej, Wydział Farmaceutyczny,
Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum, Kraków

³ Katedra Ogrodnictwa, Wydział Biotechnologii i Ogrodnictwa,
Uniwersytet Rolniczy w Krakowie

Summary

Mushrooms of the *Amanita* genus are considered among the most toxic, causing severe poisoning, often resulting in death. However, of the 707 described species within this genus, only around a dozen contain the toxic octapeptides classified as amanitotoxins and phallotoxins. While most representatives of the genus are considered inedible species, there are a few exceptions that are palatable edible species. *Amanita muscaria* and *Amanita pantherina* fall into the category of poisonous species, with significant ethnomycological impact on human evolution and sociology, alongside their other psychoactive effects.

This study aimed to obtain mycelium of *A. muscaria* and *A. pantherina* species under controlled laboratory conditions, using 10 L air-lift bioreactors and to evaluate the obtained fungal material as a potential pharmaceutical raw material containing muscimol and other biologically active compounds of importance, which may have significance in the prevention of depression. The resulting biomass was analyzed by RP-HPLC and AAS to identify various organic compounds (indole compounds, sterols, lovastatin, ergothioneine, muscimol, and ibotenic acid) and different bioelements.

Based on the results obtained, it can be concluded that the mycelium of *A. muscaria* contains several bioactive compounds, such as lovastatin, ergothioneine, and 5-hydroxy-L-

tryptophan, at higher levels than *A. pantherina*. The determination of muscimol and other bioactive substances, which have not been previously studied, in the biomass obtained through *in vitro* cultivation, compared to those found in the fruiting bodies, suggests the potential of these species in the treatment of depression. However, further research, including *in vitro* experiments and subsequent clinical trials, is required.

Słowa kluczowe: związki indolowe, muscimol, biopierwiastki

Key words: indole compounds, muscimol, bioelements

Wstęp

Grzyby to najmniej zbadane królestwo *Eucaryota*, które ma olbrzymi wpływ na różne aspekty życia człowieka. Hyde i wsp. [1] przedstawili w swojej pracy 50 możliwych zastosowań grzybów i opisali ich metabolity, które mogą być wykorzystywane jako potencjalne leki, substancje przydatne w przemyśle i ogrodnictwie bądź jako czynniki zdolne remediować zanieczyszczenia ze środowiska naturalnego [2].

Grzyby z rodzaju *Amanita* są uważane za jedne z najbardziej toksycznych organizmów powodujących zatrucia, często kończące się śmiercią. Lecz spośród 707 opisanych gatunków tylko kilkanaście zawiera silnie toksyczne cykliczne oktapeptydy z grupy amanitotoksyn i falotoksyn, a większość sklasyfikowana jest jako niejadalne. Rodzaj ten to jeden z tych, w których występują te najbardziej trujące, jak i bardzo smaczne jadalne gatunki. *Amanita muscaria* i *Amanita pantherina* miały duży etnomykologiczny wpływ na ewolucję i socjologię człowieka, między innymi z powodu ich działania psychoaktywnego. Jednocześnie niektóre gatunki, np. *Amanita rubescens*, są uważane za jadalne, a przez znawców gatunków ten uznawany jest za grzyb o wyjątkowym smaku i aromacie. Wszystkie gatunki *Amanita* to grzyby mikoryzowe, żyjące w skomplikowanej symbiozie ze specyficznymi gatunkami drzew, ale też z bakteriami i innymi grzybami [3].

Rodzaj *Amanita*, a przede wszystkim jego charakterystyczny przedstawiciel – *A. muscaria*, jest najbardziej rozpoznawalnym gatunkiem grzyba na świecie, choć przez bardzo długi czas był pomijany w literaturze naukowej. Szereg prac opisuje duże znaczenie kulturowe i historyczne tego gatunku w etnomykologii, badaniu związków między grzybami a ludźmi, zwłaszcza w kontekstach kulturowych [4, 5].

Gatunek ten był związany z człowiekiem od samych początków istnienia ludzkości, na co może wskazywać jego zastosowanie w celach mistycznych, rytualnych, religijnych, w medycynie tradycyjnej i praktykach szamańskich [4, 5]. Badania naukowe nad *Amanita* spp. zapoczątkowano w XX wieku, ale u jego schyłku temat ten stawał się coraz mniej popularny, co mogło mieć związek z negatywnym podejściem do substancji psychoaktywnych. Ponowne zainteresowanie różnymi praktykami szamańskimi, zmianami świadomości oraz poszerzaniem percepcji przez ludzi spowodowało nasilenie konsumpcji roślin i grzybów psychoaktywnych. Może się to łączyć z coraz szybszym tempem życia, ze stresem, a co za tym idzie – ze stale rosnącą liczbą osób chorujących na depresję i inne schorzenia ośrodkowego układu nerwowego. Stosowanie *A. muscaria* przez człowieka jest zagadnieniem niezwykle zawiłym, jednak widać spore zainteresowanie jego wykorzystywaniem w nowatorskich psychoterapiach. W Stanach

Zjednoczonych Ameryki prowadzone są badania nad leczeniem depresji z użyciem grzybów psychoaktywnych, których zadaniem jest wytworzenie silnego doświadczenia psychodelicznego [6, 7]. Efekty zatrucia *A. muscaria* są niebezpieczne dla zdrowia, a w ostatnich latach zaobserwowano wzrost zainteresowania konsumpcją tego gatunku. Należy zaznaczyć, że przewlekłe przyjmowanie owocników czy ekstraktów z nich otrzymanych może prowadzić do śmierci [8, 9].

Innymi ważnymi grzybami halucynogennymi znanymi już od czasów prehistorycznych są grzyby z rodzaju *Psilocybe* [6, 10]. Sięgano po nie głównie w ramach praktyk religijnych, wróżbiarskich, ale również w celach leczniczych. W Europie grzyby te poznano dokładniej dopiero w drugiej połowie XX wieku. Psylocybina została wyizolowana przez szwajcarskiego naukowca Alberta Hofmanna, który opisał też psychoaktywne właściwości LSD (dietyloamid kwasu D-lizergowego) otrzymywanego z *Claviceps purpurea* (Fr.) Tul. Od tego czasu grzyby z rodzaju *Psilocybe* traktowano jako narzędzia służące do „poszerzania świadomości”, co przyczyniło się do ich nadużywania, a w konsekwencji do ich zakwalifikowania do grupy niebezpiecznych substancji narkotycznych [6, 10, 11]. Na przełomie XX i XXI wieku ponownie badacze zaczęli przyglądać się bliżej psylocybinie i jej pochodnym. Tym razem opisano jej potencjalne znaczenie terapeutyczne, w szczególności w leczeniu takich schorzeń, jak depresja, stany lękowe, zespół stresu pourazowego (PTSD) czy uzależnienia. Odkrycie potencjalnych korzyści zdrowotnych płynących z przyjmowania grzybów halucynogennych sprawiło, że na całym świecie po raz kolejny podjęto dyskusję na temat ich legalizacji i ewentualnego dopuszczenia do terapii z uwzględnieniem zagrożeń związanych ze stosowaniem substancji psychodelicznych. Co istotne, 1 lipca 2023 roku Australia została pierwszym krajem, w którym oficjalnie zezwolono na użycie psylocybiny w leczeniu lekoopornej depresji (informacje dostępne na stronie internetowej rządu Australii – Australian Government, Department of Health and Aged Care, Therapeutic Goods Administration) [6, 11, 12]. Dopuszczenie do obrotu tego rodzaju substancji miało też znaczenie dla badań nad innymi grzybami halucynogennymi o potencjalnym znaczeniu terapeutycznym – w tym nad muchomorami (rodzaj *Amanita*) [7, 12].

A. muscaria zawiera muscymol. Substancja ta jest agonistą receptorów GABA. Są to receptory błonowe wiążące kwas γ -aminomasłowy w mózgu człowieka, powodując psychoaktywne działanie takie jak pobudzenie, halucynacje oraz urojenia. Psychoaktywny muscymol działa na receptory GABA_A w podobny sposób jak leki przeciwdepresyjne, jednakże do tej pory nie był on wykorzystywany medycznie. W ograniczonym zakresie w latach 70. XX wieku prowadzono badania nad jego użyciem w klinicznym leczeniu schizofrenii, jednak nie osiągnięto satysfakcjonujących rezultatów [7, 13].

Obecnie prowadzone są badania naukowe, których celem jest wykorzystanie muscymolu i określenie optymalnej dawki, jaka mogłaby mieć działanie przeciwdepresyjne. Co ważne, muscymol jest także obecny w innych gatunkach *Amanita* spp. – został oznaczony m.in. w *A. pantherina* [7, 14].

Badania miały na celu określenie zawartości w myceliach i owocnikach *A. muscaria* i *A. pantherina* związków, które potencjalnie mogłyby znaleźć zastosowanie w profilaktyce i leczeniu depresji. Zawartość muscymolu w świeżych owocnikach

Amanita spp. jest bardzo zmienna, zależna osobniczo i może różnić się nawet o kilka-kilkanaście procent, co stwarza problemy w pozyskaniu dobrego źródła materiału grzybowego ze środowiska naturalnego [9]. Rozwiązaniem tego problemu okazuje się biotechnologiczne pozyskiwanie mycelium w warunkach laboratoryjnych, co powoduje zmniejszoną ingerencję w środowisko naturalne oraz zmniejszone prawdopodobieństwo omyłkowego zebrania gatunku, a także stwarza możliwości celowanej produkcji określonych substancji bioaktywnych.

Celem naszej pracy było pozyskanie ze środowiska naturalnego owocników i otrzymanie metodami biotechnologicznymi myceliów dwóch gatunków: *A. muscaria* i *A. pantherina* w 10 L bioreaktorach z systemem *air-lift*, oraz ocena zawartości w uzyskanym materiale substancji biologicznie aktywnych, ze szczególnym uwzględnieniem związków o znaczeniu w profilaktyce depresji. Należy podkreślić, że celem badania było nie tylko oznaczenie muscymolu czy kwasu ibotenowego, lecz również po raz pierwszy przeanalizowanie zawartości innych substancji o znaczeniu leczniczym, zwłaszcza niehalucynogennych pochodnych indolowych, takich jak np. L-tryptofan, który jest prekursorem syntezy serotoniny w ośrodkowym układzie nerwowym, czy 5-hydroksy-L-tryptofan – o udowodnionej aktywności przeciwdepresyjnej. Co istotne, przeprowadzono analizę porównawczą zawartości zarówno związków organicznych, jak i biopierwiastków.

1. Materiały

1.1. Materiał badawczy

Owocniki *Amanita muscaria* (L.) Lam. oraz *Amanita pantherina* (DC.) Krombh zebrano w lasach mieszanych Polski południowej (w pobliżu Krakowa). Identyfikacji taksonomicznej dokonano na podstawie analizy mykologicznej (prof. Bożena Muszyńska) oraz klucza do rozpoznawania grzybów [15]. Próbkki materiału są przechowywane w Katedrze Botaniki Farmaceutycznej Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum w Krakowie (numer depozytu: KBF/AM – 1/2022., KBF/AP – 2/2022).

1.2. Kultury myceliane – otrzymywanie

Świeżych owocników użyto do zainicjowania kultur mycelialnych. Wyprowadzenie kultur *in vitro* na pożywce zestalonej agarem przeprowadzono według procedury opracowanej przez Muszyńską i wsp. [16]. W pierwszym etapie tego procesu otrzymano kultury stacjonarne na zmodyfikowanej pożywce według Oddoux [17].

1.3. Kultury płynne wytrząsane

W celu zainicjowania kultur płynnych, prowadzonych jako kultury wytrząsane (względne), do kolb Erlenmeyera o pojemności 500 mL przeniesiono fragmenty mycelium z kultur agarowych. Kolby umieszczono na wytrząsarce obrotowej (częstotli-

wość 140 obr./min) (ALTEL, Łódź, Polska) i prowadzono w temperaturze $25 \pm 2^\circ\text{C}$ w warunkach zmiennego oświetlenia (z zachowaniem cyklu dobowego). Kultury te służyły jako materiał macierzysty do zapoczątkowania kultur eksperymentalnych, bioreaktorowych – podlegających procesowi optymalizacji.

1.4. Eksperymentalne kultury w bioreaktorach z systemem *air-lift*

W celu uzyskania efektywnych przyrostów biomasy z przeznaczeniem do dalszych analiz grzybnic z kultur płynnych wytrząsanych przeniesiono do 10 L biofermentora (butle szklane SIMAX®), w którym mieszanie biomasy zapewnione było przez dopływ sterylnego powietrza oraz odprowadzanie CO_2 (system *air-lift*). Po 10 dniach biomasę oddzielono od pożywki, zamrożono, a następnie liofilizowano, a uzyskany materiał posłużył do dalszych etapów badań.

2. Metody

2.1. Ekstrakcja uzyskanego materiału

Zliofilizowaną w liofilizatorze (Labconco Freezone lyophilizer 4.5, Kansas City, USA) biomasę (owocniki i mycelia z kultur *in vitro*) rozdrobniono w moździerzu agatowym. Próbkę o odpowiednich naważkach – 3 gramy – ekstrahowano przez 20 minut metanolem (100 mL) z zastosowaniem ultradźwięków o częstotliwości 40 kHz. Ekstrakcję powtórzono dziewięciokrotnie dla każdej z próbek. Ekstrakty odwirowano (15 minut, 35 000 obr./min). Otrzymany supernatant oddzielono znad osadu i umieszczono w krystalizatorach do odparowania metanolu (w temperaturze $25 \pm 2^\circ\text{C}$). Powstałą suchą pozostałość rozpuszczono ilościowo w metanolu o czystości HPLC (Honeywell Riedel-de Haën, Sheelze, Niemcy) i filtrowano z użyciem filtrów strzykawkowych (Millipore Millex® GP 0,22 μm , Merck, Darmstadt, Niemcy). Otrzymany ekstrakt przeznaczono do analiz metodą HPLC następujących związków: muscymol, kwas ibotenowy, związki indolowe, lowastatyna oraz ergotioneina.

2.2. Analiza zawartości związków indolowych

W celu oznaczenia związków indolowych ekstrakty z owocników i myceliów z kultur *in vitro* poddano analizie metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej w układzie faz odwróconych (RP-HPLC) z wykorzystaniem analizatora HPLC (Merc Hitachi, Tokio, Japonia) z detektorem UV L-7400, termostatem L-2350, pompą L-7100, degazerem VWR7614, kolumną RP-18 4×250 mm (Purospher®, 5 μm). Temperatura kolumny wynosiła 25°C . Do oznaczenia L-tryptofanu, melatoniny, tryptaminy i 5-metylotryptaminy zastosowano rozdział izokratyczny z użyciem mieszaniny metanolu, wody i octanu amonu w proporcji 15: 14: 1 v/v/v. Detekcji dokonano przy długości fali $\lambda = 280$ nm. Do oznaczenia 5-hydroksy-L-tryptofanu jako eluent zastosowano mieszaninę 0,1% kwasu fosforowego i acetonitrylu w stosunku objętościowym 93: 7. Obecność tego związku analizowano przy $\lambda = 275$ nm. Szybkość przepływu eluentu

w toku analizy wszystkich związków indolowych wynosiła 1,0 mL/min. Analizę ilościową przeprowadzono metodą krzywej kalibracyjnej.

2.3. Analiza zawartości ergotioneiny

Analizę zawartości ergotioneiny wykonano metodą RP-HPLC według Zhou i wsp. [18] z użyciem analizatora opisanego powyżej. Zastosowano rozdział izokratyczny z wykorzystaniem mieszaniny 1% metanolu z kwasem borowym (pH = 5), a temperatura kolumny wynosiła 25°C. Analizy przeprowadzono przy długości fali $\lambda = 275$ nm. Szybkość przepływu eluentu wynosiła 0,5 mL/min.

2.4. Analiza zawartości lowastatyny

Do oznaczenia lowastatyny w badanych próbkach wykorzystano metodę Pansuriya i Singhal [19]. Analizę wykonano metodą RP-HPLC za pomocą aparatury opisanej powyżej. Zastosowano rozdział izokratyczny z użyciem mieszaniny acetonitrylu i 0,1% kwasu fosforowego w proporcji 60: 40 v/v. Temperatura kolumny wynosiła 25°C, długość fali $\lambda = 238$ nm, a szybkość przepływu eluentu 1 mL/min.

2.5. Analiza zawartości muscymolu i kwasu ibotenowego

Oznaczenie muscymolu i kwasu ibotenowego przeprowadzono według metodyki opracowanej przez Tsunoda i wsp. [20, 21] z własnymi modyfikacjami w zakresie proporcji użytego eluentu oraz warunków badania. Do oznaczeń wykorzystano zestaw do chromatografii cieczowej opisany powyżej. Zastosowano elucję izokratyczną, a eluent stanowiła mieszanina: wody, acetonitrylu i metanolu 60: 20: 10 v/v z dodatkiem 4 mM kwasu fosforowego o pH 2,2 oraz siarczuanu dodecyłu sodu (2,1 mM). Oznaczeń dokonano przy długości fali $\lambda = 210$ nm, a temperatura kolumny wynosiła 35°C.

2.6. Analiza zawartości steroli

Do analizy zawartości steroli odważono 5 g zliofilizowanych owocników *A. muscaria*, *A. pantherina* oraz ich mycelia i ekstrahowano je w mieszaninie metanolu i dichlorometanu (75: 25 v/v) w łaźni ultradźwiękowej z częstotliwością 40 kHz przez 10 minut. Po 2 godzinach uzyskany ekstrakt wirowano przy obrotach (12 000 obr./min) przez 5 minut. Procedurę ekstrakcji powtórzono dwukrotnie, a następnie supernatant oddzielono od osadu, umieszczono w krystalizatorach o objętości 80 mL i pozostawiono aż do odparowania metanolu. Suchą pozostałość rozpuszczono w metanolu o czystości HPLC (Merc, Dramstadt, Niemcy) i filtrowano z użyciem filtrów strzykawkowych. Oznaczenia prowadzono według metodyki opisanej przez Sułkowską-Ziaję i wsp. [22].

2.7. Analiza zawartości β -glukanów

Zawartość β -glukanów oznaczono z użyciem zestawu testowego (Megazyme© International, Ireland Ltd, Wicklow, Irlandia) zgodnie z instrukcjami producenta i procedurą opisaną przez Sari i wsp. [23]. Wszystkie próbki w ilości 0,1 g liofilizowanego materiału zmielono za pomocą młynka analitycznego i przesiano przez sito 0,5 mm. Na kolejnym etapie dodano 1,5 mL 37% HCl i mieszaninę ogrzewano w temperaturze 30°C przez 45 minut. Następnie do każdej próbki dodano 10 mL wody destylowanej i inkubowano przez 2 godziny we wrzącej łaźni wodnej. Po neutralizacji 2 M KOH do próbek *Amanita* spp. dodano bufor octanowy (pH = 5), aby uzyskać końcową objętość 100 mL. Następnie pobrano 0,1 mL roztworu i dodano egzo-1,3- β -glukanazę (20 U/mL) i β -glukozydazę (20 U/mL). Tak otrzymany roztwór inkubowano w łaźni wodnej w temperaturze 40°C przez 1 godzinę. Do każdej analizowanej próbki dodano 3 mL odczynnika do oznaczania glukozy Megazyme (oksydaza glukozowa/peroksydaza; GOPOD), a mieszaninę ponownie inkubowano w temperaturze 40°C przez 20 minut. Próbki analizowano za pomocą spektrofotometru UV/VIS Helios Beta (Thermofisher, Wielka Brytania) przy długości fali $\lambda = 510$ nm i porównywano z próbą ślepą. Do wykrywania 1,3-1,6- β -glukanów zastosowano metodę testu enzymatycznego, która jest skuteczną metodą ilościowego oznaczania β -glukanów w grzybach, a standardowy błąd metody wynosi <5% (Megazyme© International, Ireland Ltd, Wicklow, Irlandia) [23].

2.8. Analiza biopierwiastków

Wysuszone owocniki i mycelia badanych gatunków sproszkowano w młynie kulowym Pulverisette 14 (Merzet, Poznań, Polska). Próbki analizowano na zawartość biopierwiastków: Mg, K, Na, Ca, Fe, Zn, Mn i Cu. Z każdego wysuszonego materiału grzybowego odważono 0,5 g próbek i przeniesiono do teflonowych naczyń zawierających 2 mL 30% H_2O_2 oraz 6 mL 65% HNO_3 . Następnie próbki poddano mineralizacji mokrej w systemie zamkniętym w mineralizatorze Magnum II (ERTEC–Poland, Wrocław, Polska). Otrzymany zmineralizowany roztwór ogrzewano na płycie grzewczej przez 60 minut w 120°C w celu usunięcia nadmiaru odczynników. Następnie próbki przeniesiono do 10 mL kolb i rozcieńczono czterokrotnie wodą destylowaną. Do oznaczenia pierwiastków wykorzystano atomową spektrometrię absorpcyjną z atomizacją w płomieniu (ASA). Do wszystkich pomiarów zastosowano spektrometr iCE3500 (Thermo Scientific, Gloucester, Wielka Brytania).

2.9. Analiza statystyczna wyników

Analizę statystyczną wyników opracowano, stosując analizę wariancji ANOVA, wyznaczając grupy jednorodne z zastosowaniem testu HSD Tukeya przy $p \leq 0,05$, w programie Statistica wersja 13.3 (TIBCO Software Inc., Palo Alto, Kalifornia, USA).

3. Wyniki

3.1. Zawartość związków organicznych

Największą zawartość spośród związków indolowych wykazano dla 5-hydroksy-L-tryptofanu. W mycelium *A. muscaria* jego ilość wynosiła 167 mg/100 g s.m., a w owocnikach 137 mg/100 g s.m. W wypadku *A. pantherina* wartości te były ponad dwukrotnie mniejsze (32,5–63,5 mg/100 g s.m.). Zawartość 5-metylotryptaminy była największa w mycelium *A. pantherina* – 12,8 mg/100 g s.m., a w wypadku pozostałych analizowanych próbek zawartość wynosiła 2,21–5,94 mg/100 g s.m. Zawartość L-tryptofanu była zbliżona w owocnikach obu gatunków i mieściła się w zakresie 26,8–31,6 mg/100 g s.m. Najmniej tej substancji oznaczono w mycelium *A. muscaria* (6,23 mg/100 g s.m.), niemniej jednak tylko w tym materiale oznaczono melatoninę – 10,5 mg/100 g s.m. (tab. 1).

Tabela 1. Zawartość związków bioaktywnych w materiale grzybowym *Amanita muscaria* i *Amanita pantherina* [mg/100 g s.m. $\pm$ SD] oraz dla β -glukanów [g/100 g s.m. $\pm$ SD]

<i>Amanita</i> spp. Związki bioaktywne	<i>Amanita muscaria</i> kultury mycelialne	<i>Amanita muscaria</i> owocniki	<i>Amanita pantherina</i> kultury mycelialne	<i>Amanita pantherina</i> owocniki
Muscymol	0,051 $\pm$ 0,003 ^a	0,692 $\pm$ 0,091 ^b	0,051 $\pm$ 0,003 ^a	0,093 $\pm$ 0,002 ^a
Kwas ibotenowy	*	*	*	*
Ergosterol	*	75,1 $\pm$ 2,5 ^a	8,97 $\pm$ 3,07 ^b	18,2 $\pm$ 0,1 ^c
Nadtlenek ergosterolu	*	*	*	*
Lowastatyna	51,7 $\pm$ 0,9 ^a	3,64 $\pm$ 0,30 ^b	10,6 $\pm$ 0,4 ^c	1,83 $\pm$ 0,02 ^d
Ergotioneina	9,96 $\pm$ 0,80 ^a	19,2 $\pm$ 2,3 ^b	14,4 $\pm$ 0,4 ^c	2,68 $\pm$ 0,07 ^d
5-Hydroksy-L-tryptofan	164 $\pm$ 5 ^a	137 $\pm$ 5 ^b	63,5 $\pm$ 2,4 ^c	32,5 $\pm$ 0,1 ^d
L-Tryptofan	6,23 $\pm$ 0,91 ^a	31,6 $\pm$ 1,4 ^b	26,8 $\pm$ 0,6 ^c	28,6 $\pm$ 0,2 ^c
Tryptamina	0,061 $\pm$ 0,001 ^a	*	Nd	Nd
Melatonina	10,5 $\pm$ 1,8 ^a	Nd	*	*
5-Metylotryptamina	5,94 $\pm$ 0,34 ^a	4,64 $\pm$ 0,11 ^b	12,8 $\pm$ 0,3 ^c	2,21 $\pm$ 0,01 ^d
β -Glukany	6,24 $\pm$ 0,09 ^a	5,78 $\pm$ 0,12 ^b	9,84 $\pm$ 0,12 ^c	6,13 $\pm$ 0,06 ^d

$n = 9$; * – ilości śladowe; Nd – nie oznaczono; litery obok wartości oznaczają wyniki *post-hoc* HSD Tukeya ($p < 0,05$)

Najwyższą zawartość ergotioneiny oznaczono w owocnikach *A. muscaria* (19,2 mg/100 g s.m.), a najniższą w owocnikach *A. pantherina* (2,68 mg/100 g s.m.). W wypadku lowastatyny największą jej zawartość oznaczono w mycelium *A. muscaria* (51,7 mg/100 g s.m.), natomiast w pozostałych próbkach było jej minimum pięciokrotnie mniej. Ergosterol oznaczono w największej ilości w owocnikach *A. muscaria* (75,1 mg/100 g s.m.), a w pozostałych próbkach wartości te były kilkukrotnie mniejsze. Jeśli chodzi o mycelium z kultur *in vitro* *A. muscaria* – nie oznaczano tej substancji.

Zawartości ergotioneiny, lowastatyny i ergosterolu były istotnie statystycznie zróżnicowane we wszystkich badanych próbkach. Zawartość β -glukanów była najwyższa w mycelium *A. pantherina* (9,84 g/100 g s.m.) – w wypadku innych obiektów wartości nie różniły się istotnie statystycznie. Pewne ilości charakterystycznego dla *Amanita* spp. muscymolu oznaczono we wszystkich badanych próbkach. Największe ilości tej substancji oznaczono w owocnikach *A. muscaria* (0,692 mg/100 g s.m.); pozostałe badane próbki zawierały niewielkie ilości tej substancji. Oznaczano również śladową zawartość kwasu ibotenowego (na granicy poziomu oznaczalności) (tab. 1).

3.2. Zawartość mikroelementów i makroelementów

Wyniki zawartości biopierwiastków przedstawiono w tabeli 2. Najwyższą zawartość Fe oznaczono w owocnikach *A. muscaria* (53,4 mg/100 g s.m.), w wypadku innych próbek ilość ta była ponaddwukrotnie mniejsza i we wszystkich istotnie statystycznie różna. Zawartość Cu była na podobnym poziomie w owocnikach obu badanych gatunków (3,30–4,13 mg/100 g s.m.). W kulturach mycelialnych oznaczono kilkakrotnie niższe zawartości tego pierwiastka. Owocniki *A. pantherina* zawierały najwięcej Zn (68,9 mg/100 g s.m.), a pozostały badany materiał miał ponaddwukrotnie mniejszą zawartość tego pierwiastka. Zawartość Mn była najwyższa w mycelium *A. muscaria* (9,16 mg/100 g s.m.), a najniższa w owocnikach *A. pantherina* (0,838 mg/100 g s.m.).

Tabela 2. Zawartość wybranych biopierwiastków w gatunkach *Amanita muscaria* i *Amanita pantherina* [mg/100 g s.m. $\pm$ SD]

Biopierwiastek	<i>Amanita muscaria</i> kultury mycelialne	<i>Amanita muscaria</i> owocniki	<i>Amanita pantherina</i> kultury mycelialne	<i>Amanita pantherina</i> owocniki
Ca	4,70 $\pm$ 0,26 ^a	7,03 $\pm$ 0,10 ^b	8,16 $\pm$ 0,06 ^b	44,0 $\pm$ 3,3 ^b
Cu	0,412 $\pm$ 0,037 ^a	3,30 $\pm$ 0,24 ^b	0,575 $\pm$ 0,033 ^c	4,13 $\pm$ 0,13 ^b
Fe	36,4 $\pm$ 0,5 ^a	53,4 $\pm$ 0,2 ^b	24,1 $\pm$ 0,2 ^c	18,1 $\pm$ 1,1 ^d
K	497 $\pm$ 19 ^a	157 $\pm$ 1 ^b	637 $\pm$ 38 ^a	156 $\pm$ 1 ^c
Mg	152 $\pm$ 6 ^{a,c}	114 $\pm$ 4 ^{b,c}	119 $\pm$ 3 ^{a,b,c}	107 $\pm$ 4 ^d
Mn	9,16 $\pm$ 0,04 ^a	4,55 $\pm$ 0,14 ^b	3,35 $\pm$ 0,17 ^c	0,838 $\pm$ 0,059 ^d
Na	79,5 $\pm$ 2,0 ^a	18,5 $\pm$ 0,5 ^b	75,8 $\pm$ 1,4 ^c	6,65 $\pm$ 0,13 ^d
Zn	13,4 $\pm$ 0,3 ^a	6,19 $\pm$ 0,27 ^b	26,7 $\pm$ 0,5 ^c	68,9 $\pm$ 3,1 ^d

$n = 9$; litery obok wartości oznaczają wyniki *post-hoc* HSD Tukeya ($p < 0,05$)

Najwyższą zawartość K oznaczono w mycelium *A. pantherina* (637 mg/100 g s.m.). Istotnie mniej oznaczono go w mycelium *A. muscaria* (497 mg/100 g s.m.), a także w owocnikach obu gatunków. Zawartość Mg była na zbliżonym poziomie w badanym materiale, niemniej jednak różnice były istotne statystycznie – najwięcej Mg oznaczono w mycelium *A. muscaria* (152 mg/100 g s.m.), a najmniej w owocnikach *A. pantherina* (107 mg/100 g s.m.). Z kolei zawartość Ca była najwyższa w owocnikach *A. pantherina* (44,0 mg/100 g s.m.). W wypadku Na oznaczono podobne zawartości

tego pierwiastka w myceliach (75,8 mg/100 g s.m. i 79,5 mg/100 g s.m.), a kilkukrotnie mniejsze w owocnikach (tab. 2).

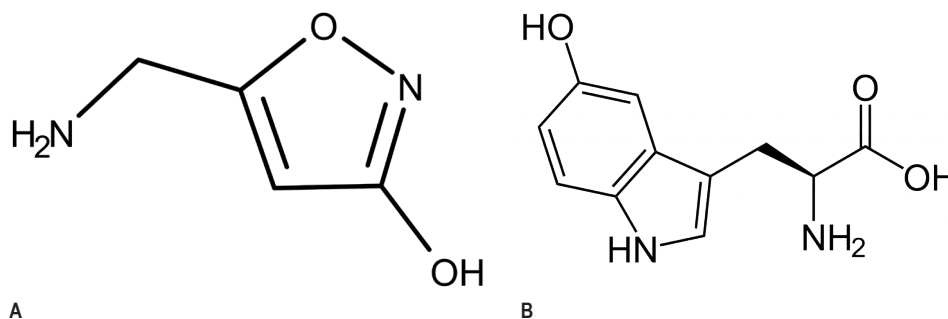
4. Dyskusja wyników

W biomasie otrzymanej z kultur mycelialnych *A. muscaria* oznaczono muscymol (rys. 1A) w ilości 0,05% suchej masy, jednakże biorąc pod uwagę łatwość produkcji mycelium, może okazać się to efektywnym sposobem pozyskiwania muscymolu, tym bardziej że trwają prace nad mikrodozowaniem tej substancji [24, 25]. Inni autorzy oznaczali głównie takie substancje, jak muskaryna w ilości 0,02% suchej masy, kwas ibotenowy w ilości około 1% suchej masy, muscymol w ilości około 0,09% suchej masy, a także śladowe ilości alkaloidów tropanowych. W świeżym owocniku ważącym między 50–70 g można oznaczyć muscymol w ilości około 6 mg, natomiast zawartości kwasu ibotenowego mogą wynosić aż 70 mg [26, 27]. Ilości muscymolu oznaczone w niniejszej pracy pokrywają się z wcześniejszymi analizami, natomiast w przeciwieństwie do danych z piśmiennictwa naukowego w naszym eksperymencie kwas ibotenowy występował jedynie w ilościach śladowych (tab. 1) [26, 27]. Co interesujące, dla obu analizowanych gatunków potwierdzono uprzednio występowanie znacznie wyższych zawartości zarówno muscymolu, jak i kwasu ibotenowego w kapeluszach grzybów [27]. Ze względu na potencjalne działanie toksyczne analizowanych gatunków grzybów wcześniejsze badania nie obejmowały pomiaru zawartości związków biologicznie aktywnych o właściwościach prozdrowotnych. W związku z tym przeprowadzone w niniejszej pracy analizy dotyczące obecności niehalucynogennych związków indolowych, ergosterolu, ergotioneiny oraz lowastatyny stanowią pierwsze tego rodzaju badania mykochemiczne, co stanowi dodatkowy atut naukowy prezentowanego projektu.

Muscymol jest silnym agonistą receptorów neuroprzekąznika GABA (kwasu γ -aminomasłowego), oddziałującym głównie na receptory GABA_A w ośrodkowym układzie nerwowym (OUN). GABA jest głównym neuroprzekąznikiem hamującym w mózgu, a działanie muscymolu na receptory GABA_A daje efekty uspokajające, przeciwlękowe i nasenne. Może również wywoływać stan relaksu, a w większych dawkach stan hipnotyczny lub bezpośrednio usypiający. Działanie przeciwlękowe osiąga się przez wzmocnienie neurotransmisji hamującej za pośrednictwem receptorów GABA w mózgu. Działanie muscymolu może się różnić w zależności od dawki, indywidualnej wrażliwości i czynników środowiskowych. Spożywanie grzybów zawierających muscymol może być niebezpieczne i należy go unikać ze względu na zagrożenie zatruciem oraz potencjalne poważne skutki uboczne [28].

Dodatkowo w badaniach oznaczono szereg innych substancji bioaktywnych, w tym związki indolowe, które również działają przeciwdepresyjnie. Związki te, a przede wszystkim 5-hydroksy-L-tryptofan (rys. 1B), to prekursor serotoniny, która jest jednym z najważniejszych neuroprzekązników w mózgu odpowiadających za kontrolę samopoczucia, jakość snu czy apetyt [29]. Grzyby są bogatym źródłem związków indolowych, wśród których wyszczególnić można również melatoninę [30].

W pracy oznaczono wysokie zawartości związków indolowych – w mycelium *A. muscaria* zawartość 5-hydroksy-L-tryptofanu wynosiła 164 mg/100 g s.m., wysoka



Rysunek 1. Wzory strukturalne: muscimol (A), 5-hydroksy-L-tryptofan (B)

zawartość została oznaczona również w owocniku tego gatunku. W porównaniu z innymi gatunkami jest to wartość średnia – w zależności od gatunku zawartość 5-hydroksy-L-tryptofanu, jak i innych związków indolowych, waha się od ilości śladowych po nawet ponad 700 mg/100 g s.m. w mycelium *Pleurotus djamor* [31, 32]. W wypadku kultur *in vitro* można wystandaryzować warunki i sterować metabolizmem grzybni, dodając różne substancje do pożywki, w tym prekursory syntezy niehalucynogennych pochodnych indolowych, takich jak seryna czy kwas antranilowy, albo L-feniloalaninę będącą prekursorem syntezy kwasów fenolowych [33, 34]. Być może z zastosowaniem innych składników i dodatków, np. soli pierwiastków, możliwe będzie otrzymanie surowca bogatszego w pożądany składnik aktywny – taką zależność zaobserwowano w wypadku grzybów uprawnych, takich jak *Agaricus bisporus* i *Pleurotus* spp. [16, 35].

W ekstraktach z uzyskanego mycelium oraz owocnikach *A. muscaria* i *A. pantherina* oznaczono również inne związki, takie jak ergotioneina, lowastatyna oraz ergosterol. Ergotioneina to aminokwas będący pochodną histydyny, która ma silne właściwości antyoksydacyjne. Niektórzy badacze sugerują, że powinna być zaliczana do witamin, jako że jest niezbędna do działania organizmu człowieka, a pobierana jest wyłącznie z pożywienia [36]. W przeprowadzonych badaniach wybranych gatunków oznaczono wysokie zawartości ergotioneiny – najwięcej w owocnikach *A. muscaria*, a jej ilość wynosiła 19,2 mg/100 g s.m. Grzyby uważane są za jedno z najlepszych źródeł tej substancji, co potwierdza jej ilość w innych jadalnych gatunkach, takich jak np. *Pleurotus* spp. [31, 37]. Lowastatyna to związek regulujący metabolizm cholesterolu u człowieka, co w konsekwencji obniża poziom jego szkodliwej formy LDL (lipoproteiny o niskiej gęstości), jednocześnie regulując poziom dobrego cholesterolu HDL (lipoproteiny o wysokiej gęstości). Grzyby uważa się za jedno z lepszych źródeł tej substancji [37]. W pracy oznaczono zawartość lowastatyny dla mycelium *A. muscaria* wynoszącą 51,7 mg/100 g s.m., co jest ilością stosunkowo wysoką. Dla porównania w owocnikach *Cantharellus cibarius* oznaczono 67,89 mg tej substancji w 100 g s.m., a w *Pleurotus citrinopileatus* – 28,84 mg/100 g s.m. [31, 37].

Sterole to związki powszechnie występujące w grzybach, które traktuje się jako ich dobre źródło. W skład grupy steroli wchodzi ergosterol będący prekursorem witaminy

D [38]. Za jego bogate źródło uważa się *A. bisporus* (pieczarka dwuzarodnikowa), która zawiera 61,5 mg ergosterolu w 100 g s.m. [39]. Przeprowadzone badania wykazały, że również owocniki *A. muscaria* są dobrym źródłem tej substancji. Grupą związków szeroko badanych pod względem aktywności biologicznej są polisacharydy, w szczególności β -glukany wchodzące w skład ściany komórkowej grzybów. Mają one udowodnione właściwości immunomodulujące i stosowane są w terapiach nowotworowych jako adiuwanty w standardowej chemio – i radioterapii – głównie w Chinach i Japonii [40]. We wszystkich badanych próbkach oznaczono β -glukany, jednak porównanie ich zawartości z innymi gatunkami jest trudne i nie zawsze miarodajne ze względu na indywidualną aktywność polisacharydów w określonych gatunkach grzybów [23]. W przeprowadzonych w 1992 roku badaniach β -glukanów zawartych w *A. muscaria* stwierdzono ich hamującą aktywność wobec rozrostu guzów nowotworowych w warunkach *in vitro*. Wykazano też potencjał przeciwnowotworowy ekstraktów zawierających polisacharydy *A. muscaria* przeciwko czerniakowi [41, 42].

Owocniki grzybów mają wiele makro – i mikroelementów, które są niezbędne człowiekowi do prawidłowego funkcjonowania. Grzyby zawierają m.in. K, Ca, Mg, Zn, Na, Se, Fe w ilościach, które pozwalają na stwierdzenie, że są ich cennym dostawcą, a ich konsumpcja może okazać się istotną formą suplementacji [38, 43]. Obecność tych substancji jest w środowisku naturalnym bardzo zmienna i zależy od podłoża, na którym grzybnia rosła – w wypadku kultur *in vitro* można łatwo modyfikować i dodawać różne biopierwiastki, zmieniając metabolizm grzybów, a także uzyskując organiczną, łatwiej przyswajalną formę np. deficytowego seleniu [44]. Ilości makro – i mikroelementów w badanych obiektach są zbliżone do wyników uzyskanych w innych pracach naukowych dla grzybów jadalnych. W opisywanej tu pracy wykazano duże zawartości Fe, Mn, Zn, Mg i K – wartości te były jednak zmienne w zależności od badanego surowca (tab. 2). W odniesieniu do uprzednio oznaczanych biopierwiastków dla *A. muscaria* zaobserwowano szczególnie duże różnice w zawartościach takich biopierwiastków, jak Ca (136,7 mg/100 g s.m., a obecnie 7,03 mg/100 g s.m.), Fe (11,8 mg/100 g s.m., a obecnie 53,4 mg/100 g s.m.) oraz Zn (12,9 mg/100 g s.m., a obecnie 6,19 mg/100 g s.m.). Z kolei dla Mg i Cu oznaczone ilości były podobne (130 i 114 mg/100 g s.m. oraz 3,84 i 3,30 mg/100 g s.m.). W wypadku *A. pantherina* oznaczono podobne zawartości Fe i Cu (odpowiednio 16,5 i 18,1 mg/100 g s.m. oraz 4,52 i 4,13 mg/100 g s.m.), natomiast dla Zn i Mg w obecnym eksperymencie były one wyższe (odpowiednio 16,5 i 68,9 mg/100 g s.m. oraz 103,9 i 156 mg/100 g s.m.). Różnicę zaobserwowano również dla Ca (84,2 mg/100 g s.m. w uprzednich badaniach i 44,0 mg/100 g s.m. obecnie) [45].

Podsumowując, należy uznać, mycelia badanych gatunków są potencjalnym źródłem muscymolu, a dodatkowo nie zawierają toksycznego kwasu ibotenowego. W owocnikach, jak i mycelium *A. muscaria* i *A. pantherina* oznaczono szereg substancji o właściwościach prozdrowotnych. Mycelium *A. muscaria* zawierało przeważnie najwięcej związków aktywnych w porównaniu z *A. pantherina*.

Podsumowanie

Na podstawie uzyskanych wyników można stwierdzić, że mycelium *A. muscaria* oraz *A. pantherina* jest potencjalnym surowcem zawierającym substancje działające na układ nerwowy człowieka. Muscymol oraz oznaczone związki indolowe mogą w przyszłości posłużyć do opracowania preparatu o działaniu przeciwdepresyjnym, jednak potrzebne są dalsze badania w tym zakresie, w tym w modelach *in vitro*, *in vivo* oraz kliniczne. Po raz pierwszy oznaczona wysoka zawartość innych związków o udowodnionym potencjale prozdrowotnym, takich jak lowastatyna, ergosterol czy ergotioneina, dodatkowo zwiększa potencjalną wartość leczniczą surowca, jakim jest mycelium *A. muscaria* oraz *A. pantherina*. Niezbędne są wszakże wielkoskalowe, znacznie bardziej złożone i dłuższe badania, żeby lek na bazie *Amanita* spp. został wprowadzony do użytkowania. Taki lek nie powinien zarazem stać się suplementem diety z powodu zawartości muscymolu o działaniu psychoaktywnym.

Złożoność problematyki związanej z podjętymi badaniami *A. muscaria* oraz *A. pantherina* została w tej pracy jedynie zaznaczona, a jeśli chodzi o ustalenie znaczenia kultur mycelialnych jako potencjalnego środka leczniczego – dopiero zapoczątkowana. Podsumowując, należy podkreślić, że nie tylko owocniki otrzymywane ze środowiska naturalnego, ale również mycelia z kultur *in vitro* mogą stanowić wystandardyzowany rodzaj materiału grzybowego, z przeznaczeniem do dalszych eksperymentów badających potencjał muscymolu czy pochodnych indolowych w depresji, a także w innych schorzeniach OUN.

Finansowanie

Publikacja powstała ze środków Priorytetowego Obszaru Badawczego qLife w ramach programu strategicznego „Inicjatywa Doskonałości – Uczelnia Badawcza” w Uniwersytecie Jagiellońskim (nr 06/IDUB/2019/94).

Piśmiennictwo

1. Hyde KD, Xu J, Rapior S, Jeewon R, Lumyong S, Niego AGT i wsp. *The amazing potential of fungi: 50 ways we can exploit fungi industrially*. Fungal Divers. 2019; 7: 1–136.
2. Bruns T. *Evolutionary biology: A kingdom revised*. Nature 2006; 7113(443): 758–761.
3. Zhang P, Tang LP, Cai Q, Xu JP. *A review on the diversity, phylogeography and population genetics of Amanita mushrooms*. Mycology 2015; 6(2): 86–93.
4. Feeney K. *The significance of pharmacological and biological indicators in identifying historical uses of Amanita muscaria*. W: Rush JA. red. *Entheogens and the development of culture*. Berkeley, CA: North Atlantic Books; 2013. S. 279–317.
5. Feeney K, Stijve T. *Re-examining the role of muscarine in the chemistry of Amanita muscaria*. Mushroom The Journal 2010; Spring–Summer: 32–36.
6. Horton DM, Morrison B, Schmidt J. *Systematized review of psychotherapeutic components of psilocybin-assisted psychotherapy*. Am. J. Psychother. 2021; 74(4): 140–149.
7. Okhovat A, Cruces W, Docampo-Palacios ML, Ray KP, Ramirez GA. *Psychoactive isoxazoles, muscimol, and isoxazole derivatives from the Amanita (Agaricomycetes) species: Review of*

- new trends in synthesis, dosage, and biological properties.* Int. J. Med. Mushrooms 2023; 25(9): 1–10.
8. Buck RW. *Toxicity of Amanita muscaria.* J. Am. Med. Assoc. 1963; 185(8): 663–664.
 9. Tsujikawa K, Mohri H, Kuwayama K, Miyaguchi H, Iwata Y, Gohda A i wsp. *Analysis of hallucinogenic constituents in Amanita mushrooms circulated in Japan.* Forensic Sci. Int. 2006; 164(2–3): 172–178.
 10. Doblin RE, Christiansen M, Jerome L, Burge B. *The past and future of psychedelic science: An introduction to this issue.* J. Psychoactive Drugs 2019; 51(2): 93–97.
 11. Dawood Hristova JJ, Pérez-Jover V. *Psychotherapy with psilocybin for depression: Systematic review.* Behav. Sci. (Basel). 2023; 13(4): 297.
 12. Dixon Ritchie O, Donley CN, Dixon Ritchie G. *From prohibited to prescribed: The rescheduling of MDMA and psilocybin in Australia.* Drug Sci. Policy Law 2023; 9: 1–3.
 13. Tamminga CA, Crayton JW, Chase TN. *Muscimol: GABA agonist therapy in schizophrenia.* Am. J. Psychiatry 1978; 135(6): 746–747.
 14. Festi F, Bianchi A. *Amanita muscaria: Myco-pharmacological outline and personal experience.* Psychedelic Monographs and Essays 1990; 5: 209–250.
 15. Knudsen H, Vesterholt J. *Funga Nordica: Agaricoid, boletoid and cyphelloid genera.* Copenhagen: Nordsvamp; 2008.
 16. Muszyńska B, Kała K, Sułkowska-Ziaja K, Krakowska A, Opoka W. *Agaricus bisporus and its in vitro culture as a source of indole compounds released into artificial digestive juices.* Food Chem. 2016; 199: 509–515.
 17. Oddoux L. *Recherches sur les mycéliums secondaires des Homobasidiés en culture pure.* Lyon: Imprimerie de Trevoux; 1957.
 18. Zhou T, Liu Q, Jiang W, Chen N. *A new strategy for quantitative analysis of ergothioneine in fermentation broth by RP–HPLC.* Lect. Notes Electr. Eng. 2014; 249: 313–321.
 19. Pansuriya RC, Singhal RS. *Supercritical fluid extraction of lovastatin from the wheat bran obtained after solid-state fermentation.* Food Technol. Biotechnol. 2009; 47(2): 159–165.
 20. Tsunoda K, Inoue N, Aoyagi Y, Sugahara T. *Simultaneous analysis of ibotenic acid and muscimol in toxic mushroom, Amanita muscaria, and analytical survey on edible mushrooms.* J. Food Hyg. Soc. Japan 1993; 34(1): 12–17.
 21. Tsunoda K, Inoue N, Aoyagi Y, Sugahara T. *Change in ibotenic acid and muscimol contents in Amanita muscaria during drying, storing or cooking.* J. Food Hyg. Soc. Japan 1993; 34(2): 153–160.
 22. Sułkowska-Ziaja K, Szewczyk A, Galanty A, Gdula-Argasińska J, Muszyńska B. *Chemical composition and biological activity of extracts from fruiting bodies and mycelial cultures of Fomitopsis betulina.* Mol. Biol. Rep. 2018; 45(6): 2535–2544.
 23. Sari M, Prange A, Lelley JI, Hambitzer R. *Screening of beta-glucan contents in commercially cultivated and wild growing mushrooms.* Food Chem. 2017; 216: 45–51.
 24. Meade E, Hehir S, Rowan N, Garvey M. *Mycotherapy: Potential of fungal bioactives for the treatment of mental health disorders and morbidities of chronic pain.* J Fungi (Basel). 2022; 8(3): 290.
 25. Vargas MV, Meyer R, Avanes AA, Rus M, Olson DE. *Psychedelics and other psychoplastogens for treating mental illness.* Front. Psychiatry. 2021; 12: 727117.
 26. Carboué Q, Lopez M. *Amanita muscaria: Ecology, chemistry, myths.* Encyclopedia 2021; 1(3): 905–914.

27. Tsujikawa K, Mohri H, Kuwayama K, Miyaguchi H, Iwata Y, Gohda A i wsp. *Analysis of hallucinogenic constituents in Amanita mushrooms circulated in Japan*. Forensic Sci. Int. 2006; 164(2–3): 172–178.
28. Johnston GA. *Muscimol as an ionotropic GABA receptor agonist*. Neurochem. Res. 2014; 39(10): 1942–1947.
29. Maffei ME. *5-Hydroxytryptophan (5-HTP): Natural occurrence, analysis, biosynthesis, biotechnology, physiology and toxicology*. Int. J. Mol. Sci. 2020; 22(1): 181.
30. Muszyńska B, Sułkowska-Ziaja K, Ekiert H. *Indole compounds in fruiting bodies of some edible Basidiomycota species*. Food Chem. 2011; 125(4): 1306–1308.
31. Krakowska A, Zięba P, Włodarczyk A, Kała K, Sułkowska-Ziaja K, Bernaś E i wsp. *Selected edible medicinal mushrooms from Pleurotus genus as an answer for human civilization diseases*. Food Chem. 2020; 327: 127084.
32. Podkowa A, Kryczyk-Poprawa A, Opoka W, Muszyńska B. *Culinary-medicinal mushrooms: A review of organic compounds and bioelements with antioxidant activity*. Eur. Food Res. Technol. 2021; 247(3): 513–533.
33. Koca N, Karaman S. *The effects of plant growth regulators and L-phenylalanine on phenolic compounds of sweet basil*. Food Chem. 2015; 166: 515–521.
34. Opoka W, Kała K, Krężałek R, Sułkowska-Ziaja K, Maślanka A, Muszyńska B. *TLC–Densitometry analysis of indole compounds in mycelial culture of Imleria badia and Agaricus bisporus enriched with precursors – serine or anthranilic acid*. Acta Chromatogr. 2018; 30(4): 236–242.
35. Włodarczyk A, Krakowska A, Sułkowska-Ziaja K, Suchanek M, Zięba P, Opoka W i wsp. *Pleurotus spp. mycelia enriched in magnesium and zinc salts as a potential functional food*. Molecules 2020, 26(1): 162.
36. Paul BD. *Ergothioneine: A stress vitamin with antiaging, vascular, and neuroprotective roles?* Antioxid. Redox Signal. 2022; 36(16–18): 1306–1317.
37. Kała K, Kryczyk-Poprawa A, Rzewińska A, Muszyńska B. *Fruiting bodies of selected edible mushrooms as a potential source of lovastatin*. Eur. Food Res. Technol. 2020; 246(4): 713–722.
38. Muszyńska B, Sułkowska-Ziaja K, Malec M. *Związki o działaniu antyoksydacyjnym występujące w jadalnych i leczniczych gatunkach grzybów (Basidiomycota)*. Farm. Polska 2012; 68(9): 629–639.
39. Muszyńska B, Grzywacz-Kisiełewska A, Kała K, Gdula-Argasińska J. *Anti-inflammatory properties of edible mushrooms: A review*. Food Chem. 2018; 243: 373–381.
40. Steimbach L, Borgmann AV, Gomar GG, Hoffmann LV, Rutkevski R, Andrade de DP i wsp. *Fungal beta-glucans as adjuvants for treating cancer patients – A systematic review of clinical trials*. Clin. Nutr. 2021; 40(5): 3104–3113.
41. Kiho T, Katsurawaga M, Nagai K, Ukai S, Haga M. *Structure and antitumor activity of a branched (1-3)- β -D-glucan from the alkaline extract of Amanita muscaria*. Carbohydr. Res. 1992; 224: 237–243.
42. Zavadinack M, Lima Bellan de D, Rocha Bertage da JL, Silva Milhorini da S, Silva Trindade da E, Simas FF i wsp. *An α -D-galactan and a β -D-glucan from the mushroom Amanita muscaria: Structural characterization and antitumor activity against melanoma*. Carbohydr. Polym. 2021; 274: 118647.
43. Kalač P, Svoboda L. *A review of trace element concentrations in edible mushrooms*. Food Chem. 2000; 69(3): 273–281.

-
44. Zięba P, Kała K, Włodarczyk A, Szewczyk A, Kunicki E, Sękara A i wsp. *Selenium and zinc biofortification of *Pleurotus eryngii* mycelium and fruiting bodies as a tool for controlling their biological activity*. *Molecules* 2020; 25(4): 889.
 45. Vetter J. *Mineral composition of basidiomes of *Amanita* species*. *Mycol. Res.* 2005; 109(6): 746–750.

Adres: Katarzyna Kała
Katedra Biotechnologii Roślin i Grzybów Leczniczych
Wydział Farmaceutyczny
Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum
e-mail: k.kała@uj.edu.pl

Otrzymano: 29.12.2023
Zrecenzowano: 14.07.2024
Otrzymano po poprawie: 14.08.2024
Przyjęto do druku: 12.09.2024