



BIULETYN  
Wydziału Farmaceutycznego  
Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

Biul. Wydz. Farm. WUM, 2013, 3, 18-26  
<http://biuletynfarmacji.wum.edu.pl/>

## BIOTECHNOLOGIA GRZYBÓW. ZASTOSOWANIE W FARMACJI I SUPLEMENTACJI

Jadwiga Turło

Katedra i Zakład Technologii Leków i Biotechnologii Farmaceutycznej  
Warszawski Uniwersytet Medyczny  
ul. Banacha 1, 02-097 Warszawa

tel. +4822 5720647, e-mail: [jadwiga.turlo@wum.edu.pl](mailto:jadwiga.turlo@wum.edu.pl)

Otrzymany 5.10.2012, zaakceptowany 6.02.2013, zamieszczony 8.05.2013

### STRESZCZENIE

Liczne gatunki grzybów należących do klasy *Basidiomycetes* posiadają zdolność biosyntezy biologicznie aktywnych związków, w tym o działaniu przeciwnowotworowym. Związki te izolowane są z owocników, grzybni, kultur mycelialnych i podłoża hodowlanych. *Lentinula edodes* (Berk.) Pegl., jest jednym z najszerzej wykorzystywanych grzybów leczniczych. Jest on źródłem dwóch zarejestrowanych w niektórych krajach leków. Obydwa preparaty wykazują działanie immunomodulacyjne i są stosowane w terapii nowotworów. *L. edodes* biosyntezuje również związki o działaniu m. in. przeciwbakteryjnym, przeciwwirusowym, obniżającym poziom cholesterolu, przeciwzakrzepowym. Izolowane z podłoża hodowlanego *L. edodes* rozpuszczalne w wodzie ligniny są testowane jako potencjalne leki w terapii hepatitis B i AIDS. Białka *L. edodes* składają się z 18 aminokwasów, w tym wszystkich egzogennych, występujących w proporcjach najbardziej wskazanych dla człowieka. Owocniki tego gatunku zawierają znaczne ilości witamin C, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, PP, B<sub>12</sub> i D. Izolowane z *L. edodes* polisacharydy o działaniu immunomodulacyjnym są stosowane w chemoprewencji i wspomagająco w terapii nowotworów, wraz z chemoterapią, łagodząc jej efekty niepożądane. Ten niezwykle ciekawy grzyb jest również wykorzystywany do otrzymywania suplementów diety.

**SŁOWA KLUCZOWE:** *Lentinula edodes*, kultury mycelialne, selen, immunomodulacja, suplementy diety

### ABSTRACT

FUNGAL BIOTECHNOLOGY. APPLICATIONS IN PHARMACY AND SUPPLEMENTATION

Many *Basidiomycetes* mushrooms have the ability to synthesize bioactive compounds, including anticancer agents that can be isolated from fruit bodies, mycelial cultures, or culture media. *Lentinula edodes* (Berk.) Pegl. is one of the most widely used medicinal mushrooms. This mushroom is the source of two drugs approved in several countries. Both drugs are immunomodulators and are used in cancer therapy. In addition, *L. edodes* forms compounds with antibacterial, antiviral, cholesterol lowering, and anticoagulant activities. Water-soluble lignans derived from *L. edodes* culture medium are being tested as potential drugs for the treatment of hepatitis B and AIDS. *L. edodes* protein is made up of 18 amino acids, including all essential amino acids, in ratios appropriate for humans. The fruit bodies of the mushroom contain considerable amounts of vitamins C, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, PP, B<sub>12</sub> and D. Immunomodulatory polysaccharides isolated from *L. edodes* are being used in chemoprevention and as adjuvants in cancer treatment because of their ability to alleviate undesirable side effects of such therapies. This valuable mushroom is also used to produce dietary supplements.

**KEYWORDS:** *Lentinula edodes*, mycelial cultures, selenium, immunomodulation, dietary supplements

### 1. Grzyby lecznicze

Wśród opisanych do chwili obecnej około 116 tysięcy gatunków grzybów, stanowiących aktualnie oddzielne królestwo (aczkolwiek niektórzy autorzy podają liczbę równą 45, 72, 80 czy 105 tysięcy [1-3,9]), istnieje dość liczna grupa posiadająca zdolność biosyntezy związków o silnym działaniu farmakologicznym. Grzyby wytwarzające związki o najsilniejszym i najciekawszym, co do kierunku, działaniu należą do podkrólestwa *Dikarya*, do typu *Ascomycota* (workowce), klasy *Ascomycetes* (workowce właściwe) lub do typu *Basidiomycota* (grzyby podstawkowe), klasy *Basidiomycetes* (podstawczaki).

Bardzo ważnymi dla biotechnologii farmaceutycznej, a ściślej mówiąc dla przemysłu farmaceutycznego, przedsta-

wicielami pierwszej z wymienionych klas (*Ascomycetes*) są tzw. grzyby strzępkowe. Przedstawiciele rodzajów *Penicillium*, *Cephalosporium*, *Aspergillus* czy *Fusidium* są producentami antybiotyków, witamin, enzymów czy kwasów organicznych (cytrynowego, itakonowego, fusarowego czy glukonowego). Można uznać, że znaczenie grzybów klasy *Ascomycetes* w biotechnologii farmaceutycznej jest w pełni doceniane. Przyczyna jest prosta: antybiotyki ciągle jeszcze stanowią w służbie zdrowia około 1/3 rynku produktów biotechnologicznych, a grzyby strzępkowe, obok promieniowców, są najlepszymi producentami antybiotyków.

Inaczej ma się sprawa z grzybami klasy *Basidiomycetes* - ich potencjalne znaczenie w lecznictwie jest doceniane w krajach azjatyckich, ze względu na liczącą kilka tysięcy lat

tradycję stosowania preparatów pochodzenia grzybowego w terapii różnych chorób. Kultura Zachodu odnosi się jednak do grzybów, jako do surowca leczniczego, ze sporą dozą nieufności.

Do klasy *Basidiomycetes* należą między innymi tzw. grzyby wyższe. Stanowią one około 10% wszystkich gatunków grzybów. Około 700 spośród nich biosyntezuje metabolity o działaniu farmakologicznym, bardzo często (651 gatunków) przeciwnowotworowym i immunostymulującym. To właśnie dla tych grzybów zarezerwowane jest określenie „grzyby lecznicze”, będące tłumaczeniem używanego w piśmiennictwie angielskim określenia „medicinal mushroom”. Wśród mykologów, fitochemików i - coraz częściej - biotechnologów jest dość liczna grupa zajmująca się badaniami naukowymi tych organizmów. Od dziesięciu lat istnieje wydawane przez wydawnictwo *Begell House* czasopismo naukowe o międzynarodowym zasięgu, zajmujące się wyłącznie grzybami leczniczymi - *International Journal of Medicinal Mushroom*. Do najważniejszych spośród aktualnie znanych i opisanych grzybów leczniczych należy około 30 gatunków. Biosyntezują one związki o działaniu przeciwnowotworowym, immunomodulacyjnym, przeciwwirusowym (w tym przeciw HIV), przeciwbakteryjnym, przeciwzapalnym, przeciwgrzybicznym, przeciw cukrzycowemu, hepatoprotekcyjnym, nerwotonicznym, obniżającym ciśnienie krwi oraz poziom cholesterolu i triglicerydów we krwi.

Zestawienie najważniejszych gatunków grzybów leczniczych wraz z ich działaniem farmakologicznym przedstawia Tabela 1, cytowana według Wasser i Weiss [4]. Z cytowanej poniżej tabeli wynika, że do gatunków najcenniejszych z punktu widzenia zarówno aktywności farmakologicznej jak i jej wykorzystania w istniejących już preparatach należą: *Lentinula edodes*, *Ganoderma lucidum*, *Trametes versicolor*, *Schizophyllum commune*, *Hericium erinaceus* i *Grifola frondosa*.

Istnieją cztery preparaty (zarejestrowane w niektórych krajach jako leki) stosowane w terapii nowotworów, izolowane z owocników lub grzybni grzybów klasy *Basidiomycetes*:

- Lentinan - frakcja polisacharydowa izolowana z *Lentinula edodes*;
- Schizofyfan (SPG, sonifilan, sizofilan) - frakcja polisacharydowa izolowana z *Schizophyllum commune*;
- Grifolan - frakcja polisacharydowa izolowana z *Grifola frondosa*;
- Krestin (PSK - polisacharyd i PSP - kompleks wielocukier-białko) izolowany z *Trametes versicolor*.

Dość powszechnie stosowane są w wielu krajach (w większości krajów azjatyckich, USA, Nowej Zelandii, Australii czy wreszcie, coraz częściej, w Europie) preparaty złożone o działaniu immunostymulacyjnym, będące ekstraktami z owocników i grzybni grzybów leczniczych. Rynek tych preparatów był pod koniec lat dziewięćdziesiątych dwudziestego wieku oceniany przez FDA na około 6,5 miliardów dolarów - i od tej pory stale rośnie [5].

Trwające od kilkunastu lat badania fitochemiczne grzybów leczniczych doprowadziły do identyfikacji wielu związków chemicznych odpowiedzialnych za poszczególne kierunki działania farmakologicznego. Badania tego typu prowadzone są w dalszym ciągu bardzo intensywnie, głównie w Japonii, Korei Południowej i innych krajach azjatyckich, Stanach Zjednoczonych Ameryki, Rosji i krajach eu-

ropejskich, o czym świadczy wysoka liczba publikacji naukowych dotyczących tej tematyki ukazujących się corocznie. Podobnie jak w przypadku leku roślinnego, często preparaty złożone uzyskiwane z grzybów wykazują większą aktywność farmakologiczną od czystych, izolowanych substancji.

Jako obiekt swoich badań wybrałam gatunek grzyba leczniczego o bardzo cennych właściwościach zarówno leczniczych jak i dietetycznych - *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler.

## 2. Charakterystyka gatunku *Lentinula edodes*

*Lentinula edodes* (Berk.) Pegler jest grzybem saprofitycznym, żyjącym w naturalnych warunkach na drewnie martwych drzew liściastych z rodziny *Fagaceae*, wykorzystującym je jako źródło cukrów, hemicelulozy, celulozy i ligniny. Tworzy on owocniki o średnicy około 3-20 cm o barwie od jasnobrązowej do ciemnoczerwono-brunatnej. Pochodzi ze wschodniej Azji. Pierwotnym obszarem występowania tego gatunku jest japońska wyspa Amami [6]. *L. edodes* występuje naturalnie na terenie Japonii, Chin, Korei, częściowo państw Półwyspu Indochińskiego i Indii. Gatunek ten po raz pierwszy został opisany przez angielskiego botanika M. J. Berkeley w 1878 roku jako *Agaricus edodes*. *Lentinula edodes* posiada wiele nazw synonimicznych, spośród których są: *Cortinellus shiitake* P. Henn., *C. berkeleyanus* Ito et Imai, *C. edodes* (Berk.) S. Ito et Imai, *Lentinus tonkinensis* Pat., oraz najczęściej spotykana *Lentinus edodes* (Berk.) Singer. Przynależność taksonomiczna tego gatunku w różnych okresach ulegała zmianie. Grzyb ten umieszczano w rodzajach: *Armillaria*, *Collybia*, *Cortinellus*, *Lepiota*, *Pleurotus*, *Tricholoma*, oraz w różnych rodzinach rzędu *Agaricales* [7,8].

W roku 1976 Pegler dokonał kolejnej rewizji taksonomicznej tego gatunku [6].

Według systematyki grzybów, którą opracowali Kirk i wsp. (2001) *Lentinula edodes* zalicza się do rodziny twardzioszkowatych - *Marasmiaceae*, do rzędu *Agaricales* - pieczarkowców [9]. W roku 2007 Hibbett i współpracownicy [10] dokonali kolejnej rewizji w systematyce grzybów i zaliczyli typy *Basidiomycota* i *Ascomycota* do podkrólestwa *Dikarya*, co aktualnie zamyka listę zmian w systematyce gatunku *L. edodes*:

Królestwo: *Fungi* (grzyby)  
 Podkrólestwo: *Dikarya*  
 Typ: *Basidiomycota* (grzyby podstawkowe)  
 Klasa: *Basidiomycetes* (podstawczaki)  
 Podklasa: *Agaricomycetidae*  
 Rząd: *Agaricales* (pieczarkowce)  
 Rodzina: *Marasmiaceae* (twardzioszkowate)  
 Rodzaj: *Lentinula*  
 Gatunek: *Lentinula edodes* (syn. *Lentinus edodes*) twardziak jadalny.

*Lentinula edodes* jest też znany pod japońską nazwą zwyczajową „shiitake”. Termin shiitake lub shii-take pochodzi od „shii” lub „shii” - japońskiej nazwy rodzajowej drzewa *Quercus cuspidata* (*Passania cuspidata*), na którym grzyb ten występuje w warunkach naturalnych, oraz „take”, co po japońsku oznacza grzyb. W Chinach występuje pod kilkoma nazwami: xianggu - shiang-ku („fragrant mush-

Tabela 1. Grzyby lecznicze należące do klasy *Basidiomycetes* i ich działanie farmakologiczne (wg. Wasser i Weis, 1999) [1].

	KIERUNEK DZIAŁANIA															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	
	Przeciwwirusowe	Przeciwbakteryjne	Przeciwzapalne	Przeciwnowotworowe	Przeciwwirusowe (w tym HIV)	Przeciwbakteryjne	Regulujące ciśnienie krwi	Kardiotoniczne	Obniżające poziom cholesterolu	Przeciwcukrzycowe	Immunomodulacyjne	Nefrotoniczne	Hepatoprotekcyjne	Nerwotoniczne	Potencjacja seksualna	Antyastmatyczne
<i>Auricularia auricula-judas</i> (Bull.)Wettst.				+			+	X	X							X
<i>Tremella fuciformis</i> Berk.			+	+					+							X
<i>Tremella mesenterica</i> Rits.i Fr.							+									+
<i>Schizophyllum commune</i> Fr.fr.			X	X		X					X	X	X			
<i>Dendropolyporus umbellatus</i> (Pers.:Fr.)				X							X		X			X
<i>Grifola frondosa</i> (Dicks.:Fr.) S.F. Gray	+		X	X	X	X	X			X	X		+			+
<i>Fomes fomentarius</i> (L.:Fr.) Fr.					+		+						+			
<i>Fomitopsis pumicola</i> (Schw.:Fr.) P.Karst.			+	+		+										
<i>Trametes versicolor</i> (L.:Fr.) Lloyd				X	X	X						X	X			
<i>Piptoporus betulinus</i> (Bull.:Fr.) P. Karst	+			+			+									
<i>Hericium erinaceus</i> (Bull.:Fr.) Pers.				+							X			X		X
<i>Inonotus obliquus</i> (Pers.:Fr.) Bond. Sing.			X	X							X		X			
<i>Lenzites betulina</i> (L.:Fr.) Fr.				+												
<i>Laetiporus sulphureus</i> (Bull.:Fr.) Murr.	+			+				+								
<i>Ganoderma lucidum</i> (Curt.:Fr.) P.Karst			X	X	X	X	X				X	X	X	X	X	X
<i>Ganoderma applanatum</i> (Pers.) Pat.				+	+	+		X			+					
<i>Lentinula edodes</i> (Berk.) Pegl.			X	X	X	X	X		X	X	X	X	X		X	
<i>Pteurotus ostreatus</i> (Jacq.:Fr.) Kumm.				+	+	+			+					+		
<i>Pteurotus pulmonarius</i> (Fr.:Fr.) Quel	+			+					+							
<i>Flammulina velutipes</i> (Curt.:Fr.).Karst.	+		X	X	+						X					
<i>Oudemansiella mucida</i> (Schrad.:Fr.)	X															
<i>Armillariella mellea</i> (Vahl.:Fr.) P.Karst.	+						X								X	
<i>Hypsizygus marmoreus</i> (Peck) Bigel.				X				X						X		
<i>Marasmius androsaceus</i> (L.:Fr.) Fr.			X													
<i>Agaricus blazei</i> Murr.				X												
<i>Agaricus bisporus</i> (J.Lge) Imbach				+							X	X				
<i>Votvariella volvacea</i> (Bull.:Fr.) Sing.				+	+	+										
<i>Agrocybe aegerita</i> (Brit.) Sing.	+			+												

X - działanie zbadane, wykorzystywane w lekach lub suplementach diety

+ - działanie znane, dotychczas brak wykorzystania

room” - grzyb aromatyczny), dōnggū („winter mushroom” - grzyb zimowy), huāgū („flower mushroom”). Polska nazwa gatunkowa to twardziak jadalny. W obrębie gatunku *L. edodes* istnieją 63 rasy geograficzne i szereg szczepów hodowlanych [6].

Pierwsze wzmianki o hodowli twardziaka jadalnego pochodzą z Chin z czasów panowania dynastii Song (960-1127) [11]. Nieco później umiejętność uprawy grzyba shiitake przejęli Japończycy. Ponadto od wielu wieków uprawia się shiitake także w Korei i na Tajwanie. Obecnie gatunek ten jest hodowany na skalę produkcyjną w krajach Dalekiego Wschodu, gdzie głównym jego producentem jest Japonia. Wprowadzenie intensywnych metod uprawy twardziaka japońskiego pozwoliło rozszerzyć uprawę grzyba poza jego naturalną strefę klimatyczną i rozpowszechnić go w Stanach Zjednoczonych Ameryki i Europie. Obecnie twardziak zajmuje obok pieczarek czołowe miejsce wśród około 30 gatunków grzybów uprawianych na świecie w celach przemysłowych. Produkcję tego grzyba szacuje się na ponad 200 000 ton świeżej masy owocników rocznie [12, 13].

## 2.1. Skład chemiczny i wartości odżywcze *Lentinula edodes*

Cytowane w tym rozdziale dane dotyczą owocników *L. edodes*. Skład chemiczny biomasy grzybni hodowanej metodami biotechnologicznymi może w znaczący sposób różnić się od składu owocników i - podobnie jak skład owocników - jest zależny od składu podłoża hodowlanego i warunków hodowli.

Świeże owocniki twardziaka japońskiego zawierają 88 - 92% wody. Zawartość wybranych składników w suchej masie grzyba przedstawia *Tabela 2*.

### Skład aminokwasowy *L. edodes*

W ocenie różnych badaczy zawartość białka w owocnikach *L. edodes* waha się w granicach 18,2 - 23,9% [15] lub 13,4 - 17,5% s.m. [16]. W części opracowań oceniano liczbę aminokwasów wchodzących w ich skład na 17 [17]. Według późniejszych doniesień liczba ta została oceniona na 20 [13]. Różnica w ocenie wynikała z metodyki oznaczeń. Wysoka zawartość aminokwasów przy stosunkowo małym u-

Tabela 2. Skład chemiczny owocników *L. edodes* (wg Chang i Miles, 2004) [14].

Składnik	Zawartość (% suchej masy)
Białko	13,4 - 17,5
Węglowodany	67,5 - 78,0
Włókno	7,3 - 8,0
Popiół	3,7 - 7,0
	kcal/100 g s.m.
Wartość kaloryczna	387 - 392

dziale azotu ogólnego (2,9 - 4,4%) [14] oznacza, że owocniki *L. edodes* zawierają najmniej związków azotowych nie wchodzących w skład białek spośród wszystkich dotychczas zbadanych grzybów. Obecność tego typu substancji (np. chityny) jest przyczyną niezbyt wysokiej strawności owocników, mimo wysokiej zawartości białka. Wyliczony wskaźnik wartości odżywczej na podstawie zawartości aminokwasów, plasuje twardziaka zaraz za produktami mięsnymi, zaś przed produktami mlecznymi [11]. W skład owocników *L. edodes* wchodzi wszystkie egzogenne aminokwasy. Zawartość niezbędnych aminokwasów w ich całkowitej ilości wynosi 39%. W porównaniu z innymi gatunkami grzybów *L. edodes* charakteryzuje się wysoką zawartością leucyny i fenyloalaniny, przy niskiej zawartości lizyny [14].

#### Węglowodany

Ogólna zawartość węglowodanów w suchej masie owocników twardziaka jadalnego wynosi 67,5 - 78%, z czego 15,87% przypada na cukry proste [11]. Analiza chromatograficzna składu monosacharydowego hydrolizatów *L. edodes* wykazała obecność cukrów prostych: glukozy, mannozy, galaktozy, ksylozy, rybozy, fukozy i ramnozy. W ekstraktach z owocników twardziaka wykryto także dwucukry - sacharozę i maltozę, oraz trisacharyd rafinozę. Wysoki procent cukrów stanowią polisacharydy, w tym (1-3)- $\beta$ -D-glukany, które odpowiadają między innymi za lecznicze właściwości grzyba. W owocnikach i grzybni *L. edodes*, w strukturze ściany komórkowej i wewnątrzkomórkowo występują zarówno rozpuszczalne w wodzie  $\alpha$ - i  $\beta$ -glukany, galaktany, mannany, ksyloglukany, jak i nierozpuszczalne heteroglikany, poliuronidy i  $\beta$ -glukany [10,11].

#### Lipidy

Zawartość lipidów w owocnikach twardziaka jadalnego waha się w granicach 4,8 - 8,0%. W ich skład wchodzi kwasy tłuszczowe, mono-, di- oraz triglicerydy, fosfolipidy i sterole. Aż 78% przypada na tłuszcze zawierające w swojej strukturze nienasycone kwasy tłuszczowe. Największy udział w składzie tłuszczów ma kwas linolenowy (18:2) - około 68%, kwas olejowy (18:1) 5,5%, zaś z nasyconych - kwas palmitynowy (16%) [18].

#### Witaminy

Owocniki *L. edodes* są dobrym źródłem witamin, głównie z grupy witamin B ( $B_1$ ,  $B_2$ ,  $B_{12}$ ). Szczególnie wysoka jest w nich zawartość niacyny, kwasu foliowego oraz ryboflawiny (witamina  $B_2$ ), której ilość jest większa niż w warzywach. Według Furlani i Godoy [19] zawartość witaminy  $B_1$  w *L. edodes* jest porównywalna z zawartością w ziarnach zbóż i podobna do obecnej w owocach, natomiast większa niż w jajach. Zawierają także witaminę C. Dostępność bio-

logiczna folianów z biomasy *L. edodes* jest porównywalna do ich przyswajalności z warzyw. Bardzo zadowalający wydaje się być także fakt, że *Lentinula edodes* zawiera witaminę  $B_{12}$  która, jak sądzono do niedawna, może być biosyntezowana wyłącznie przez bakterie. Jest to szczególnie ważne dla osób stosujących dietę wegetariańską [20].

Grzyby, obok zwierząt, są jedynymi organizmami posiadającymi zdolność biosyntezy witaminy  $D_2$  (ergokalciferolu) [21]. Grzyby hodowane przy dostępie światła słonecznego zawierają więcej tej witaminy, gdyż przejście ergosterolu, charakterystycznego dla grzybów sterolu, składnika między innymi ściany komórkowej, w ergokalciferol wymaga indukcji promieniowaniem ultrafioletowym [22]. Ergosterol spotykany jest w komórkach grzybów w stanie wolnym, w postaci nadtlenków, estrów z wyższymi kwasami tłuszczowymi, glikozydów lub kompleksów z polisacharydami. Owocniki *L. edodes* zawierają 6,79 mg ergosterolu w 1 g suchej masy, co stanowi 83 - 89% całkowitej zawartości steroli. [23].

Tabela 3. Zawartość witamin w 100 g owocników *Lentinula edodes* (według Matilla i wsp.) [17].

Witamina	Zawartość w świeżym owocniku	Zawartość w suchej masie
Witamina $B_1$ [mg]	0,05	26
Witamina $B_2$ [mg]	0,15	1,8
Kwas foliowy [ $\mu$ g]	25	300
Niacyna [mg]	2,6	31
Witamina $B_{12}$ [ $\mu$ g]	0,07	0,8
Witamina C [mg]	2,1	25
Witamina D [ $\mu$ g]	0,1	1
Sucha masa [%]	8,4	

#### Mikroelementy

*Lentinula edodes*, podobnie jak inne grzyby, ma dużą zdolność do kumulowania różnych pierwiastków. Ich zawartość w grzybie jest zależna od składu podłoża hodowlanego. W porównaniu z innymi grzybami twardziak jadalny charakteryzuje się bardzo dużą zawartością wapnia, oraz w znaczących ilościach zawiera potas, magnez, sód, cynk i fosfor [14,19]. Warto również zwrócić uwagę na charakterystyczny dla *L. edodes*, niespotykany w żywności stosunek molowy potasu do sodu, rzędu 70-90:1 [24].

Tabela 4. Zawartość wybranych składników mineralnych w soku *Lentinula edodes* według Siwulski i Reguła [25], oraz \* Matilla i wsp. [17].

Składniki mineralne	Zawartość [mg/kg suchej masy]
Potas	31 551 $\pm$ 303
Magnez	1 622 $\pm$ 5,09
Sód	135,6 $\pm$ 1,66
Wapń	157,7 $\pm$ 0,17
Cynk	125,9 $\pm$ 13,0
Żelazo	39,5 $\pm$ 0,45
Miedź	13,7 $\pm$ 0,74
Selen	0,039*

Substancjami nadającymi charakterystyczny zapach i smak owocnikom *L. edodes* są cykliczne sulfidy, z których największe znaczenie ma 1,2,3,5,6-pentatiepan czyli lentionina [26]. Ponadto w shiitake występują 1,2,4-tritioalan, 1,2,4,6-tetratiepan.

## 2.2. Właściwości lecznicze *Lentinula edodes*

Tradycja wykorzystania grzyba shiitake (*L. edodes*) w celach leczniczych w krajach Dalekiego Wschodu (Chiny, Japonia, Korea) liczy parę tysięcy lat. Pierwsze wzmianki na ten temat pochodzą z roku 119. Znacznie później, w czasie panowania dynastii Ming, lekarz Wu Juei napisał, że grzyb shiitake może być wykorzystywany jako lek na choroby wątroby, układu krążenia, układu oddechowego i zmęczenie. Przypisywano shiitake też właściwość wzmagania sił życiowych i hamowania procesu starzenia [27].

W okresie ostatnich trzydziestu lat *L. edodes* stał się jednym z najdokładniej zbadanych gatunków grzybów leczniczych. Wyodrębniono z owocników i grzybni szereg związków, którym można przypisać działanie farmakologiczne, głównie immunomodulacyjne i przeciwnowotworowe. Szczególne znaczenie w lecznictwie mają frakcje polisacharydowe (lentinan) i ekstrakty z grzybni i podłoża hodowlanego (LEM, LAP, KS-2), które względu na swoje właściwości stanowią surowiec do otrzymywania preparatów leczniczych [28,29]. Obecnie zarejestrowane są one na terenie krajów azjatyckich oraz Stanów Zjednoczonych.

Z preparatów złożonych uzyskiwanych z grzybni *L. edodes* szczególnie istotne są dwa:

**LEM** - wyciąg wodny otrzymany z grzybni shiitake hodowanej na podłożach stałych. Skład ekstraktu jest złożony. Zawiera on aminokwasy, witaminy, polisacharydy o różnej strukturze, glikoproteiny, polifenole, ergosterol. Do substancji czynnych tego wyciągu należą też rozpuszczalne w wodzie ligniny [26,30].

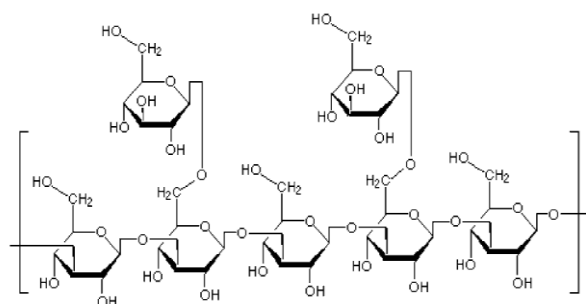
**LAP** - nierozpuszczalna w alkoholu frakcja, uzyskiwana przez wytrącanie z wodnego wyciągu (LEM) etanolem w stosunku objętościowym 4:1 (etanol/woda). Ekstrakt ten zawiera wiele różnorodnych składników m. in. lentioninę i frakcje polisacharydowe o różnej budowie.

Obydwa preparaty, LEM i LAP, stosowane zarówno doustnie, jak i w postaci iniekcji wykazują silne działanie przeciwnowotworowe, immunomodulujące jak np. indukcja interferonu i hamowanie zakaźności i efektu cytopatologicznego wirusa HIV, blokują uwolnienie wirusa *Herpes simplex* typu I z tkanek; mają także właściwości bakterio-bójcze [26-31].

Zidentyfikowane do chwili obecnej biologicznie czynne związki zawarte w owocnikach i grzybni gatunku *Lentinula edodes* to:

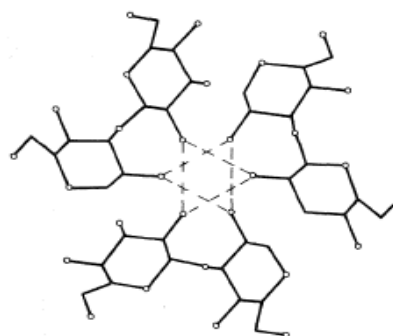
**Lentinan** - rozgałęziony  $\beta$ -D-glukan o masie 400 - 800 kDa - immunomodulator, indukuje odpowiedź immunologiczną ustroju. Stosowany jako lek przeciwnowotworowy.

Lentinan został wyizolowany w 1970 r. przez G. Chihare i współpracowników na drodze frakcjonowania rozpuszczalnych w wodzie polisacharydów, pochodzących ze ścian komórkowej owocników *L. edodes* [32,33]. Podstawową strukturę polisacharydu stanowi łańcuch  $\beta$ -(1-3)-D-glukanu z dwoma bocznymi rozgałęzieniami, występującymi co 5 jednostek cukrowych, połączonymi z łańcuchem głównym wiązaniami  $\beta$ -(1-6)-glikozydowymi (Ryc. 1) [34].



Ryc. 1. Budowa liniowa  $\beta$ -glukanów, lentinan (wg. Borchers i wsp. [35]).

Niezwykle istotną rolę w działaniu biologicznym wielocukrów, w tym lentinanu, odgrywa struktura przestrzenna. Sześć wielocukrów otrzymanych z grzybów, stosowanych w leczeniu nowotworów: schizofylan, lentinan, skleroglukan, kurdlan, cynerean i  $\beta$ -(1-3)-D-ksylan przyjmuje w roztworze konformację helikalną (Ryc. 2). Konformacja ta odgrywa rolę w działaniu przeciwnowotworowym [36].



Ryc. 2. Helikalna struktura (1-3)- $\beta$ -D-glukanów (wg. Bluhm i Sarko [37]).

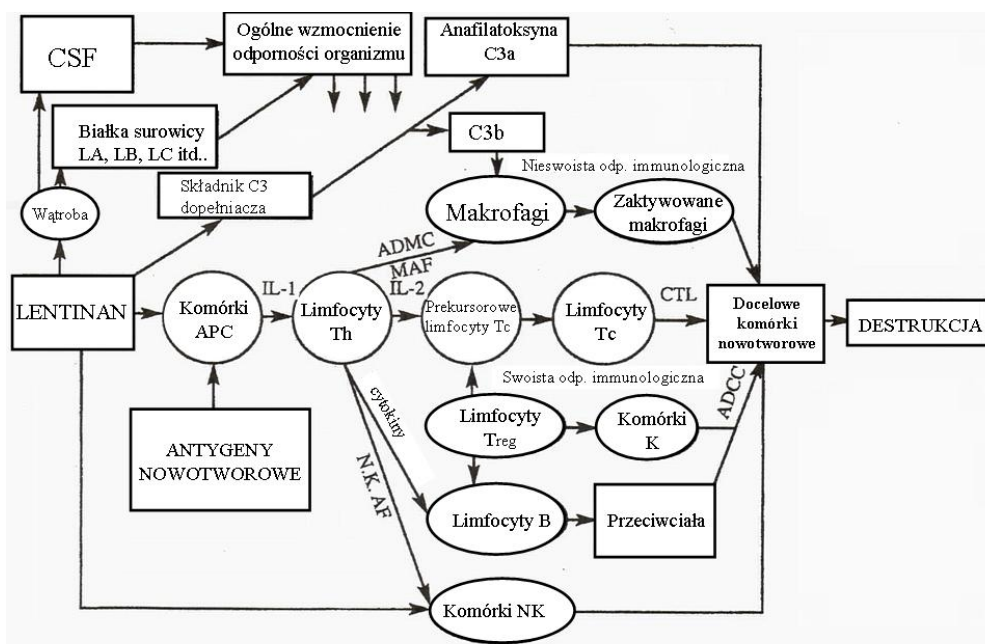
Działanie przeciwnowotworowe lentinanu związane jest z aktywnością immunomodulacyjną. Ze względu na mechanizm działania lentinan zaliczany jest do grupy BRM (biological response modifiers) - związków pochodzenia naturalnego oddziałujących na odpowiedź immunologiczną organizmu. Lentinan wiążąc się prawdopodobnie z receptorami CR-1 i CR-3 komórek gospodarza, aktywuje makrofagi, komórki NK oraz wzmacnia odpowiedź zależną od limfocytów T [38]. Prowadzi to do wzrostu stężenia interleukin (IL-1, IL-2), TNF- $\alpha$ , IGF- $\gamma$ , które odpowiadają między innymi za hamowanie proliferacji komórek nowotworowych oraz apoptozę (Ryc. 3) [10,39]. W Japonii lentinan jest od lat 80-tych XX wieku stosowany jako lek parenteralny w terapii nowotworów, głównie w terapii skojarzonej z chemioterapią, radioterapią oraz po chirurgicznym usunięciu guza. W przeprowadzonych w Japonii badaniach prospektywnych zaobserwowano prawie dwukrotne wydłużenie czasu przeżycia oraz poprawę jakości życia w przypadku stosowania terapii skojarzonej, w porównaniu z efektami leczenia pacjentów, u których stosowano wyłącznie cisplatynę i tegafur [40,41].

Lentinan stosowany jest w leczeniu nowotworów piersi, płuc, jelita grubego. Wykazuje także działanie przeciwwirusowe, między innymi działa na wirusa HIV. W skojarzeniu z azydodymidyną (AZT) lentinan hamuje ekspresję antygeny p24 w większym stopniu niż sama azydodymidyna. Pro-

wadzone w Stanach Zjednoczonych Ameryki badania kliniczne II fazy w których lentinan podawany był wraz z didanozyną wskazały natomiast jego wpływ na poziom limfocytów CD<sub>4</sub> [43]. Korzystny efekt lentinanu w terapii AIDS jest też związany z jego właściwościami immunomodulacyjnymi [44]. Lentinan, podobnie jak inne izolowane z *L. edodes* frakcje polisacharydowe, zwiększa również wytwarzanie przeciwciał skierowanych przeciwko WZW B [10].

KS-2 - jest działającym przeciwnowotworowo mannopeptydem o masie cząsteczkowej 60-95 kDa, złożonym głównie

z łańcuchów  $\alpha$ -D-mannozy i niewielkiej ilości peptydów zawierających serynę, treoninę, alaninę, prolinę i śladowe ilości innych aminokwasów. Został wyizolowany z ekstraktów podłoża hodowlanego hodowli mycelialnej *L. edodes*, przez wytrącanie metanolem [45]. Stymuluje wydzielanie interferonu i aktywuje makrofagi, jednak mechanizm działania przeciwnowotworowego KS-2 nie jest całkowicie wyjaśniony [46]. Wyodrębniono frakcje KS-2-A (wzmacnia funkcje obronne organizmu), KS-2B i KS-2D (zwiększają wydzielanie interferonu).



Ryc. 3. Prawdopodobny mechanizm działania lentinanu (wg Chihara i wsp.[42]).

LE - kompleks polisacharydowo-białkowy wyizolowany z grzybni *L. edodes*. Jest to  $\beta$ -(1-3)-D-glukan z łańcuchami bocznymi  $\beta$ -(1-6)-D-glukozy. W części peptydowej LE występują aminokwasy jak Asp, Glu, Ala i inne. W badaniach zauważono, że LE zwiększa ekspresję genów dla IL-2 i TNF- $\alpha$ , co może sugerować mechanizm indukcji odpowiedzi immunologicznej Th [47].

L-II -  $\alpha$ -(1-3)-D-glukan o masie 203 kDa wyizolowany z owocników *L. edodes* - immunomodulator, wykazuje działanie antyoksydacyjne. Związek ten powoduje stymulację odpowiedzi komórek T, zwiększa wytwarzanie TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  ale nie wpływa na IL-2. L-II wpływa także na wytwarzanie NO, zwiększa aktywność katalazy w makrofach (działanie antyoksydacyjne). Mechanizm ten wskazuje na możliwość zastosowania L-II w leczeniu nowotworów. W badaniach prowadzonych na zwierzętach potwierdzono także, że L-II wpływa na zwiększenie masy śledziony i grasicy [48].

JLS-18 - (rozpuszczalna w wodzie lignina) - blokuje namnażanie wirusa Herpes simplex, hamuje replikację HIV *in vitro*, jest aktywatorem makrofagów [49]. JLS i JLS-18 są to wodne ekstrakty z grzybni *L. edodes*. JLS-18 zawiera 65 - 75% lignin, 15 - 30% polisacharydów i 10 - 20% białek [50].

Lentin - białko o masie 27,5 kDa. Jest to proteina wyizolowana w 2003 roku z owocników *L. edodes* przez Ngai i Ng [51]. Swoją budową przypomina inne odkryte wcześniej białka o właściwościach przeciwgrzybiczych. Związek ten charakteryzuje się właściwościami przeciwgrzybiczymi,

przeciwbakteryjnymi, hamuje odwrotną transkryptazę HIV-1. Hamuje także proliferację komórek białaczki [52].

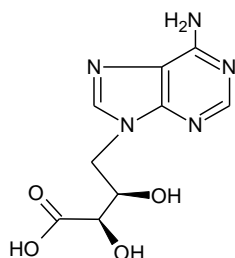
Lentionina - egzobiopolimer o masie 10 kDa, zawiera siarkę - działa przeciwbakteryjnie i przeciwgrzybiczo. Wykryta została w owocnikach a także w hodowli komórkowej. Związek ten posiada w swojej budowie siarkę, ma właściwości przeciwbakteryjne, przeciwgrzybicze. Silniejszą aktywnością odznacza się pochodna lentioniny - bis-[(metylosulfonylo)metylo]disiarczek - która działa na bakterie *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* i *Escherichia coli* [49].

Lentiozyna - związek purynowy - działa antybiotycznie.

Eritadenina (lentinacin) - kwas 2(R),3(R)-dihydroksy-4-(9-adanylo)mastowy (Ryc. 4) - obniża ciśnienie krwi i poziom triglicerydów oraz wolnego cholesterolu w surowicy krwi. Charakteryzuje się małą toksycznością, przy dobrej efektywności, pomimo, że wchłanianie eritadeniny wynosi zaledwie 10%. Początkowo przypuszczano, że mechanizm działania eritadeniny polega na hamowaniu biosyntezy cholesterolu, jednakże badania na szczurach przeprowadzone przez Sugiyama i wsp. nie potwierdziły tej hipotezy [50]. Zauważono natomiast, że podawanie eritadeniny szczurom wpływa na fosfolipidy wątrobowe i powoduje obniżenie stosunku fosfatydylocholiny do fosfatydyloetanoloaminy. Może to sugerować, że eritadenina obniża poziom cholesterolu oddziałując na metabolizm fosfolipidów wątrobowych

[53] przyspieszając wydalanie oraz rozkład cholesterolu [44,50].

**Glikoproteina**, (EBP) - egzobiopolimer o masie 52 kDa - działa przeciw cukrzycowo. Związek ten według doniesienia Yang i współpracowników (2002) obniża stężenie glukozy we krwi oraz podwyższa poziom insuliny [54].



Ryc. 4. D-eritadenina.

**Fracje polisacharydowe** - wykazują działanie ochronne na wątrobę, zwiększają wytwarzanie przeciwciał przeciwko WZW, wykazują też działanie antyoksydacyjne [10].

**Lentinamycyna A i B** - związki o działaniu przeciwbakteryjnym, pochodne poliacyetylenowe [10].

**Polifenole** - podobnie jak inne gatunki grzybów, *Lentinula edodes* zawiera związki o działaniu antyoksydacyjnym [55]. Wyróżnia się tu związki będące polifenolami. Obecność w grzybie tokoferoli oraz  $\beta$ -karotenu może wzmacniać właściwości przeciwutleniające polifenoli i frakcji polisacharydowych [56, 57].

### 2.3. Zastosowanie w leczeniu i suplementacji diety

Wiele preparatów otrzymywanych z *L. edodes*, zawierających opisywane w poprzednim rozdziale związki farmakologicznie czynne, jest aktualnie na etapie badań klinicznych. Dopuszczone w wielu krajach preparaty (nie dotyczy to na razie Polski) są głównie rejestrowane jako suplementy diety. Wyjątkowy jest przypadek lentinanu - licencyjnego preparatu japońskiej firmy Ajinomoto [58].

Jak wspomniane zostało w poprzednim rozdziale, lentinan, stosowany w niektórych krajach w terapii nowotworów, jest wysoko oczyszczoną frakcją polisacharydową - rozgałęzionym  $\beta$ -D-glukanem. Lentinan jest podawany w iniekcjach - raz lub dwukrotnie w tygodniu, najczęściej równocześnie z chemioterapią. Stosowany jest głównie w przypadkach raka przewodu pokarmowego (żołądka, jelita grubego), płuca i piersi. Dawka optymalna wynosi 1 mg, w iniekcji dożylniej lub domięśniowej [59]. Wyższe dawki (np. 10 mg) mogą wpływać depresyjnie na układ odpornościowy [10]. Najlepsze rezultaty notowano, gdy lentinan podawany był przed rozpoczęciem chemo- lub radioterapii, lub po zabiegu operacyjnym. Notowano również znaczące przedłużenie życia w przypadku pacjentów z nieoperacyjnymi, zaawansowanymi nowotworami [60]. Inne zastosowania lentinanu (w terapii HIV czy WZW-B) są testowane klinicznie. Zasadniczą wadą lentinanu jest jego stosunkowo wysoka cena. Jest uzasadniona złożoną procedurą izolacji lentinanu i jej niską wydajnością. Według Chihary 31 gramów lentinanu jest izolowane z 200 kg świeżych owocników *L. edodes* [30]. Inne preparaty, w tym opisywane w poprzednim rozdziale ekstrakty z grzybni i podłoża hodowlanego *L. edodes* (LEM, LAP) są suplementami diety. Mają postać tabletek powlekanych, kapsulek, koncentratów, sproszkowa-

nych ekstraktów czy syropów. Wiele z nich jest standaryzowanych i przebadanych klinicznie. Ich główny kierunek działania to stymulacja układu odpornościowego, działanie przeciwnowotworowe i chemoprewencyjne. Zalecane są również w chorobach infekcyjnych, nadciśnieniu, hipercholesterolemii i hiperlipidemii, co jest uzasadnione zawartością opisywanych w poprzednim rozdziale związków czynnych. Zawierają też wspomniane w rozdziale 2.1. składniki odżywcze. W przypadku ekstraktów z grzyba i grzybni (LEM), w zależności od jednostki chorobowej, są stosowane dawki rzędu 0,5-6 g/dzień [57]. Dla preparatów otrzymywanych ze sproszkowanych owocników shiitake dawka dzienna wynosi 6-16 g, co odpowiada 90 g świeżych owocników [10].

### 3. Biotechnologia grzybów wyższych - stan obecny i perspektywy

W 1966 roku Gregory opublikował wyniki poszukiwań substancji o działaniu przeciwnowotworowym w owocnikach ponad 200 gatunków grzybów należących do klasy *Basidiomycetes*. Aktywnych farmakologicznie substancji poszukiwał też w około 7000 pochodowlanych pożywkach płynnych, stosowanych do fermentacji węgłnej różnych gatunków grzybów [61]. Testy działania przeciwnowotworowego dla izolowanych substancji były przeprowadzone na trzech modelach gryzoni i ujawniły, że wielocukry izolowane z owocników 22 gatunków grzybów i 50 pożywek pochodowlanych wykazują hamujący wpływ na komórki guza, włączając takie rodzaje nowotworów jak mięsak S-180, gruczolak 755 i białaczka L-1210.

Badania Gregory'ego można uznać za pierwsze próby stosowania hodowli węgłnych grzybów wyższych do poszukiwania substancji farmakologicznie czynnych. Współcześnie coraz częściej mycelia lub podłoża pochodowlane, pochodzące z hodowli węgłnej grzybni grzybów wyższych są wykorzystywane do otrzymywania biologicznie czynnych substancji [62-64].

Powodów zainteresowania biotechnologicznymi metodami hodowli grzybów leczniczych jest kilka:

- Odmową zaletą jest krótki czas hodowli czystych kultur mycelialnych w fermentorach, zarówno na podłożach płynnych jak i stałych. W porównaniu z czasem hodowli owocników grzybów daje to ogromne skrócenie czasu uzyskiwania porównywalnej biomasy.
- Hodowle mycelialne w bioreaktorach mogą być prowadzone w wysoce powtarzalnych warunkach, co skutkuje stałym składem hodowanej biomasy. Ułatwia to standaryzację preparatów leczniczych uzyskiwanych z grzybów.
- Optymalizacja składu podłoża hodowlanych i warunków fizykochemicznych hodowli umożliwia regulację metabolizmu hodowanej grzybni. W efekcie umożliwia to znaczne podwyższenie wydajności biosyntezy związków biologicznie czynnych (np. metabolitów wtórnych).
- Możliwa jest kontrola i zachowanie biochemicznej i genetycznej identyczności hodowanej w fermentorze grzybni.

Istnieją też poważne trudności ze stosowaniem tego typu metod:

- Nie wszystkie gatunki grzybów wyższych mają zdolność efektywnego wzrostu w postaci kultur mycelialnych w bioreaktorze.
- W przypadku niektórych gatunków grzybów istnieją znaczące różnice w składzie chemicznym owocników grzyba i mycelium hodowanego metodami biotechnologicznymi. Nie zawsze różnice te są korzystne w przypadku stosowania



hodowli mycelialnych do otrzymywania farmakologicznie czynnych związków.

- Szlaki metaboliczne biosyntezy wielu farmakologicznie czynnych substancji przez grzyby wyższe są ciągle jeszcze - w porównaniu z roślinami, czy nawet drożdżami - słabo poznane i opisane. Znacząco utrudnia to projektowanie i optymalizację warunków procesu biotechnologicznego, dobór prekursorów biosyntezy czy promotorów wzrostu szczepu.

Niemniej coraz częściej producenci substancji leczniczych (Lentinan, LEM, Grifon, PSK, PSP) i suplementów diety pochodzenia grzybowego wprowadzają metody biotechnologiczne do produkcji [65]. Zgodnie ze zwyczajem stosowanym od dawna w biotechnologii farmaceutycznej (np. przez producentów antybiotyków), warunki procesu rzadko są opisywane w publikacjach, a czasami nie są nawet patentowane - co ułatwia zachowanie ich w tajemnicy. Ze względu na rozliczne zalety metod biotechnologicznych zapewne tylko kwestią czasu jest rozszerzenie tego typu metod na uzyskiwanie większości produktów leczniczych pochodzenia grzybowego czy roślinnego.

\* *Prezentowana praca stanowi fragment rozprawy habilitacyjnej pt „Kultury mycelialne *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler - optymalizacja biosyntezy biologicznie czynnych produktów, akumulacja biopierwiastków, perspektywy aplikacyjne”.*

#### 4. Stosowane skróty

ADCC	cytotoksyczność zależna od przeciwciał (Antibodies Dependent Cell Cytotoxicity)
APC	komórki reprezentujące antygen
AZT	azydotymidyna
BRM	związki pochodzenia naturalnego oddziałujące na odpowiedź immunologiczną organizmu (Biological Response Modifiers)
C3a, C3b	anafilatoksyny
NK	główna grupa komórek układu odpornościowego odpowiedzialna za zjawisko naturalnej cytotoksyczności (Natural Killer)
IL-1	interleukina 1 - zbiorcza nazwa, którą określa się cytokiny o kluczowym znaczeniu dla procesu zapalnego i szerokim spektrum działania
IL-2	interleukina 2 - cytokina będąca najważniejszym czynnikiem wzrostu dla limfocytów T, zwłaszcza cytotoksycznych, oraz komórek NK
Komórki K	jednojądrzaste komórki układu immunologicznego (Killer Cells)
Limfocyty Tc	limfocyty cytotoksyczne odpowiedzialne za niszczenie komórek zakażonych przez drobnoustroje oraz za niszczenie komórek nowotworowych
Limfocyty Th	subpopulacja limfocytów T
Limfocyty T <sub>reg</sub>	limfocyty T regulatorowe
TNF- $\alpha$	czynnik martwicy guza, czynnik nekrozy nowotworów (Tumor Necrosis Factor)

#### 5. Bibliografia

- Branco S. (2011). Fungal Diversity - An Overview, The Dynamical Processes of Biodiversity - Case Studies of Evolution and Spatial Distribution, PhD. Oscar Grillo (Ed.), ISBN: 978-953-307-772-7, In-Tech, Available from: <http://www.intechopen.com/books/the-dynamical-processes-of-biodiversity-case-studies-of-evolution-and-spatial-distribution/fungal-diversity-an-overview>
- Kirk P. M., Cannon P. F., Minter D. W., Stalpers J. A. (2008). Dictionary of the Fungi. 10th Edition. CABI Publishing. Wallingford, UK.
- Hawksworth D.L. Fungal diversity and its implications for genetic resource collections Studies in Mycology. 2004; 50: 9-18
- Wasser S. P., Weiss A. L. Medicinal Properties of Substances Occurring in Higher Basidiomycetes Mushrooms: Current Perspectives (Review). International Journal of Medicinal Mushroom. 1999; 1: 31-62
- <http://vm.cfsan.fda.gov>
- Brodziak Ł. Lentinus edodes (Berk.) Sing. - Shiitake - interesujący grzyb jadalny. Wiadomości Botaniczne. 1984; 28(3): 227-236
- Woźniak W., Gapiński M., Pelowska A., Kossowska I. Jakość owocników shiitake w zależności od składu podłoża. Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych. 1999; 466: 561-568
- Kopiński L. Niekonwencjonalna hodowla grzybni twardziaka jadalnego Lentinus edodes w stałym podłożu. Przemysł fermentacyjny i owocowo-warzywny. 1993; 1: 13-15
- Kirk P. M., Cannon P. F., David J. C., Stalpers J. A.: Ainsworth's and Bisby's Dictionary of the Fungi, 9th ed. CABI Publishing, New York, 2001
- Hibbett D. S. A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. Mycological Research. 2007; 111(5): 509-547
- Hobbs C. Medicinal Mushroom: An exploration of tradition, healing and culture. 2<sup>nd</sup> ed. Botanica Press Inc.: Santa Cruz Ca, USA, 1995
- Kalbarczyk J. Wpływ wybranych dodatków do podłoża na jakość owocników Lentinula edodes (Berk.) Sing. Acta Scientiarum Polonorum, Hortorum Cultus. 2004; 3(2): 189-196
- Wasser S. P. Shiitake (Lentinus edodes). Encyclopedia of Dietary Supplements. Marcel Dekker, New York: 2005. pp 653-664
- Chang S. T., Miles P. G. Mushrooms. Cultivation, nutritional value, medicinal effect, and environmental impact. Boca Raton, Florida. CRC Press, 27-36, 2004
- Brodziak Ł., Majchrzak R. Badania wartości odżywczej twardziaka Lentinus edodes (Berk) Sing. - shiitake, na tle innych gatunków grzybów jadalnych, Roczniki PZH. 1984; T. XXXV, Nr 1
- Manzi P., Gambelli L., Marconi S., Vivanti V., Pizzoferrato L. Nutrients in edible mushrooms: an inter-species comparative study. Food Chemistry. 1999; 65: 477-482
- Siwulski M., Czerwińska-Nowak A., Sobieralski K. Biologia i uprawa twardziaka jadalnego - Shiitake. PWRiL Poznań 2007 pp. 9-10; 20-23; 200-208
- Longvah T., Deosthale Y. G. Compositional and nutritional study on edible wild mushroom from northeast India. Food Chemistry. 1998; 63(3): 331-334
- Furlani R., Godoy H. Vitamins B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> contents in cultivated mushrooms. Food Chemistry. 2008; 106: 816-819
- Mattila P., Könkö K., Euro M., Pihlaja J., Astola J., Vahteristo L., Hietaniemi V., Kumpulainen J., Valtonen M., Piironen V. Contents of Vitamins, Mineral Elements, and Some Phenolic Compounds In Cultivated Mushrooms. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2001; 49: 2343-2348
- Mattila P. H., Piironen V. I., Uusi Rauva E. J., Koivistoinen P. E., Vitamin D contents in edible mushrooms. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 1994; 42: 2449-2453
- Mattila P., Suonpää K., Piironen V. Functional properties of edible mushrooms. Nutrition. 2000; 16: 694-696
- Mattila P., Lampi A-M., Ronkainen R., Toivo J., Piironen V. Sterol and vitamin D<sub>2</sub> contents in some wild and cultivated mushrooms. Food Chemistry. 2002; 76: 293-298
- Vetter J. Data on sodium content of common edible mushrooms, Food Chemistry. 2003; 81: 589-593



25. Siwulski M., Reguła J. Dried shiitake (*Lentinula edodes*) and oyster (*Pleurotus ostreatus*) mushrooms as a good source of nutrient. *Acta Scientiarum Polonorum, Technologia Alimentaria*. 2007; 6(4): 135-142
26. Morita K., Kobayashi S. Isolation, structure and synthesis of lenthionine and its analogs. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 1967; 15: 988-993
27. Hobbs Ch., *Medicinal Mushroom: An exploration of tradition, healing and culture*. 2<sup>nd</sup> Ed. Botanica Press Inc.: Santa Cruz, Ca, USA, 1995
28. Wasser S. P., Weis A. L. *Medicinal Mushrooms. Lentinus edodes* (Berk.) Singer. Nevo E., Ed.; Peledfus Publ. House: Haifa, Israel, 1997
29. Mizuno T. Shiitake, *Lentinus edodes*: functional properties for medicinal and food purposes. *Food Reviews International*. 1995; 11: 7-21
30. Mizuno T. A development of antitumor polysaccharides from mushroom fungi. *Food and Food Ingredients Journal of Japan*. 1996; 167: 69-85
31. Pegler D. The genus *Lentinula* (Tricholomataceae tribe Collybiaeae). *Sydowia - an International Journal of Mycology*. 1983; 36: 227-239
32. Chihara G., Maeda Y., Hamuro J., Sasaki T., Fukuoka F. Inhibition of mouse sarcoma 180 by polysaccharides from *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. *Nature*. 1969; 222(5194): 687-688
33. Chihara G., Hamuro J., Maeda Y., Arai Y., Fukuoka F. Fractionation and purification of the polysaccharides with marked antitumor activity, especially lentinan, from *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. (an edible mushroom). *Cancer Research*. 1970; 30(11): 2776-81
34. Sasaki T., Takasuka N., Further study of the structure of an antitumor polysaccharide from *L. edodes*. *Carbohydrate Research*. 1976; 47(1): 99-104
35. Borchers A. T., Keen C. L., Gershwin M. E. *Mushrooms, Tumors, and Immunity: An update*. Society for Experimental Biology and Medicine. 2004; 393-406
36. Zhang L., Li X., Xu X., Zeng F. Correlation between activity, molecular weight, and conformation of Lentinan. *Carbohydrate Research*. 2005; 340(8): 1515-1521
37. Bluhm T. L., Sarko A. The triple helical structure of lentinan, a linear B-(1-3)-D-glucan. *Canadian Journal of Chemistry*. 1976; 55: 293-299
38. Zheng R., Jie S., Hanchuan D., Moucheng W. Characterization and immunomodulating activities of polysaccharide from *Lentinus edodes*. *International Immunopharmacology*. 2005; 5(5): 811-820
39. Yan J., Zong H., Shen A., Chen S., Yin X., Shen X., Liu W., Gu X., Gu J. The beta-(1→6)-branched beta-(1→3) glucohexaose and its analogues containing an alpha-(1→3)-linked bond have similar stimulatory effects on the mouse spleen as Lentinan. *International Immunopharmacology*. 2003; 3: 1861-1871
40. Yoshino S., Tabata T., Hazama S., Iizuka N., Yamamoto K., Hirayama M., Tangoku A., Oka M. Immunoregulatory effects of the antitumor polysaccharide lentinan on Th1/Th2 balance in patients with digestive cancers. *Anticancer Research*. 2000; 20: 4707-4711
41. Nakano H., Namatame K., Nemoto H., Motohashi H., Nishiyama K., Kumada K. A multi-institutional prospective study of lentinan in advanced gastric cancer patients with unresectable and recurrent diseases: effect on prolongation of survival and improvement of quality of life. *Hepatogastroenterology*. 1999; 46(28): 2662-2668
42. Chihara G., Hamuro J., Maeda Y. Y., Shio T., Suga T., Takasuka N., Sasaki T. Antitumor and metastasis-inhibitory activities of lentinan as an immuno-modulator: an overview. *Cancer Detection and Prevention Supp*. 1987. 1; 423-443
43. Tochikura T. S. Inhibition (in vitro) of replication and of the cytopathic effect of human immunodeficiency virus by an extract of the culture medium of *Lentinus edodes* mycelia. *Medical Microbiology and Immunology*. 1988; 777: 235-244
44. Gordon M., Bihari B., Goosby E., Gorter R., Greco M., Guralnik M., Mimura T., Rudinicki V., Wong R., Kaneko Y. A placebo-controlled trial of the immune modulator, lentinan, in HIV-positive patients: a phase I/II trial. *Journal of Medicine*. 1998; 29(5-6): 305-330
45. Fujii T., Maeda H., Suzuki K., Ishida N. Isolation and characterization of a new antitumor polysaccharide, KS-2, extracted from culture mycelia of *Lentinus edodes*. *The Journal of Antibiotics*. 1978; 31: 1079-1090
46. Suzuki C. Killing activity of experimental tumor cells given to macrophage by new antitumor immunopotentiator, KS-2. *Japanese Journal of Bacteriology*. 1978; 33: 78-85
47. Liu M., Li J., Kong F., Lin J., Gao Y. Induction of immunomodulating cytokines by a new polysaccharide-peptide complex from culture mycelia of *Lentinus edodes*. *Immunopharmacology*. 1998; 40: 187-198
48. Zheng R., Jie S., Hanchuan D., Moucheng W. Characterization and immunomodulating activities of polysaccharide from *Lentinus edodes*. *International Immunopharmacology*. 2005; 5(5): 811-820
49. Sarkar S., Koga J., Whitley R. J., Chatterjee S. Antiviral effect of the extract of culture medium of *Lentinus edodes* mycelia on the replication of herpes simplex virus type 1. *Antiviral Research*. 1993; 20: 293-303
50. Hanafusa T. Intestinal absorption and tissue distribution of immunoactive and antiviral water-soluble [<sup>14</sup>C] lignins in rats. *Yakubutsu Dotai (Xenobiotic Metabolism and Disposition)*. 1990; 5: 409-436
51. Ngai P. H. K., Ng T. B. Lentin, a novel and potent antifungal protein from shitake mushroom with inhibitory effects on activity of human immunodeficiency virus-1 reverse transcriptase and proliferation of leukemia cells. *Life Sciences*. 2003; 73: 3363-3374
52. Hatvani N. Antibacterial effect of the culture fluid of *Lentinus edodes* mycelium grown in submerged liquid culture. *Antimicrobial Agents*. 2001, 17: 71-74.
53. Sugiyama K., Akachi T., Yamakawa A. Eritadenine-induced alteration of hepatic phospholipid metabolism in relation to its hypocholesterolemic action in rats. *Nutritional Biochemistry*. 1995; 6:80-87
54. Yang B. K., Kim D. H., Jeong S. C., Das S., Choi Y. S., Shin J. S., Lee S. C., Song C. H. Hypoglycemic effect of a *Lentinus edodes* exo-polymer produced from a submerged mycelial culture. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*. 2002; 66(5): 937-42
55. Cheung L. M., Cheung P. C. K., Ooi Y. E. C., Antioxidant activity and total phenolics of edible mushroom extracts. *Food Chemistry*. 2003; 81(2): 249-255
56. Yang J., Lin H., Mau J. Antioxidant properties of several commercial mushrooms. *Food Chemistry*. 2002; 77: 229-235
57. Kitzberger C., Smania A., Pedrosa R. C., Ferreira S. R. S. Antioxidant and antimicrobial activities of shiitake (*Lentinula edodes*) extracts obtained by organic solvents and supercritical fluids. *Journal of Food Engineering*. 2007; 80: 631-638.
58. Ajinomoto Company Information Publication, 1984. Lentinan: A new type of anticancer drug, Ajinomoto Co. Inc. 1-15, Kyobashi, Chuo-ku Tokyo, Japan.
59. Aoki T. (1984). Lentinan. In: *Immune Modulation Agents and Their Mechanisms*. eds R. L. Fenichel and M. A. Chirgos, Marcel Dekker, New York. pp 63-77
60. Hobbs C. Medicinal value of *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. A literature review. *International Journal of Medicinal Mushroom*. 2000; 2: 287-302
61. Gregory F. J., Studies on antitumor substances produced by Basidiomycetes. *Mycologia*. 1966; 58: 80-91
62. Kim S. W., Hwang H. J., Park J. P., Cho Y. J., Song C. H., Yun J. W. Mycelial growth and exo-biopolymer production by submerged culture of various edible mushrooms under different media. *Letters in Applied Microbiology*. 2002; 34; 56-61
63. Kim S. W., Hwang H. J., Na Y. S., Song S. K., Yun J. W. Influence of nutritional conditions and exopolysaccharide production in *Paecilomyces sinclairii*. *Letters in Applied Microbiology*. 2002; 34: 389-393
64. Shih, I-L., Chou, B-W., Chen, C-C, Wu, J-Y., Hsieh, C. Study of mycelial growth and bioactive polysaccharide production in bath and fed-bath culture of *Grifola frondosa*. *Bioresource Technology*. 2008; 99: 785-793
65. [http://www.icnet.uk/labs/med\\_mush/final\\_pdfs/chapt9.pdf](http://www.icnet.uk/labs/med_mush/final_pdfs/chapt9.pdf)