



Patent dodatkowy
do patentu nr _____

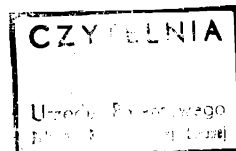
Zgłoszono: 25.03.76 (P. 188247)

Pierwszeństwo _____

Zgłoszenie ogłoszono: 31.01.77

Opis patentowy opublikowano: 30.09.1983

Int. Cl.³ A01H 15/00



Twórcy wynalazku: Jerzy Trojanowski, Andrzej Leonowicz, Stanisław Łabendziński

Uprawniony z patentu: Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, Lublin (Polska)

Sposób wytwarzania biomasy bogatej w białko z odpadów ligninocelulozowych

1 Przedmiotem wynalazku jest sposób wytwarzania biomasy bogatej w białko z odpadów ligninocelulozowych.

Dotychczas odpady ligninocelulozowe, a zwłaszcza trociny i gałęziówka wykorzystywane były między innymi jako dodatek do podłoża w sztucznej uprawie nielicznych grzybów jadalnych, takich jak *Agaricus campestris* (Europa i Ameryka Półn.), *Cortinellus shiitake* (Japonia) i *Volvaria volvacea* (Chiny i Południowo-wschodnia Azja); R. Grzybowski, Przemysł Spożywczy 31, 371—374, 1977.

Ostatnio czynione są próby przemysłowej uprawy owocników *Pleurotus ostreatus* na podłożu zawierającym trociny, co znane jest między innymi z opisu patentowego węgierskiego nr 158 952. Są to jednak wypadki sporadyczne. Ogromna większość gatunków nie nadaje się do uprawy w sposób klasyczny. Nie znany jest bowiem bliżej mechanizm inicjacji owocników.

Korzystniejszym ekonomicznie sposobem jest sztuczna hodowla grzybni wegetatywnej gatunków nietoksycznych. Grzybnia taka jest biochemicznie prawie identyczna jak owocniki i tworzy biomasę, która w odróżnieniu od biomasy bakteryjnej i drożdżowej zawiera wielokrotnie mniej szkodliwych z punktu widzenia wartości odżywczej kwasów nukleinowych. Pozwala to na jej ewentualne spożywanie bez ujemnych skutków dla zdrowia.

Znanych jest wiele przykładów zastosowania hodowli grzybni wegetatywnej w celu produkcji bio-

2 masy. Wymienić należy dla przykładu hodowlę grzybni na odciekach posulfitowych, według patentu PRL nr 72 496, wywarze gorzelniczym według opisów patentowych PRL nr-y 93054, P-197 684 i P-222 637, melasie według opisu patentowego PRL nr 102 706 oraz serwatce, według patentów PRL nr-y 92 225 i P-197 683.

Biomasę na podłożu hodowlanym stanowiącym wywar gorzelniczny czy serwatkę, według wyżej podanych opisów patentowych otrzymuje się drogą hodowli wgłębną, napowietrzanej jałowo grzybni *Inonotus obliquus* (patenty nr 93 054 oraz 92 225).

W podanych procesach, każdorazowo jako inoculum stosowano grzybnię wyhodowaną w hodowlach stacjonarnych drogą kilkakrotnego pasażowania szczepu na podłożu hodowlanym. Uzyskana biomasę charakteryzuje się przyjemnym grzybowym zapachem, wysoką zawartością białka i chętnie jest spożywana przez zwierzęta hodowlane. Można ją odwirować i wysuszyć bez konieczności odparowywania całej ilości roztworu. Dzięki czemu zużycie energii jest niewielkie.

Należy wspomnieć również o prowadzonych pracach nad hodowlą wgłębną *Pleurotus ostreatus* na pożywce mineralno-sacharozowej wzbogaconej serwatką i ługami posulfitowymi. Wykazano, że grzyben na podanej pożywce rośnie z wydajnością 14 g suchej masy na litr podłoża w ciągu trzech dni (H. Urbanek, G. Yirdow i A. Borowińska, Przem. Ferm. Rolny, 21(8), 22—22, 1977).

Powyższe dane świadczą o możliwości wydajnych hodowli grzybów wyższych nie tylko na drogich pożywkach syntetycznych, ale również na produktach ubocznych, a nawet odpadach. Taką najtańszą substancją, która mogłaby być przetworzona na białko przez grzyby jest ligninoceluloza. Według Bellamy (W.D. Bellamy Biotechnol. Bioeng 16(7), 869—880) światowa produkcja celulozy przez rośliny na kuli ziemskiej wynosi 24 tony w przeliczeniu na jedną osobę w stosunku rocznym. Przerabiana w przemyśle celulozowym drobna część tej masy, powoduje powstawanie odpadów w ilości około 500 milionów ton rocznie w skali światowej. Jednym z kierunków mających szansę na rozwiązanie tego problemu są badania biotechnologiczne.

Dotychczasowe poszukiwania miały głównie na celu znalezienie organizmów możliwie wydajnych utylizujących ligninocelulozę, bądź odpadowe produkty jej przerobu. Takimi organizmami mogą być grzyby nadrzewne, których naturalnym środowiskiem wzrostu jest ligninoceluloza, przy czym dużo łatwiej atakowany jest przez większość z nich celulozowy składnik kompleksu. Na ten więc składnik w głównej mierze skierowana jest, jak dotychczas uwaga biotechnologów. Wymienić tutaj należy przede wszystkim technologię przetwarzania odpadów papierniczych w glukozę przy użyciu wyselekcjonowanych gatunków grzybów niższych (Canadian Forest Industries, 95(2), 76—77, 1975) oraz opracowaną w Szwecji metodę utylizacji odpadów z papieru na drodze bezpośredniej hodowli grzyba *Phanerochaete Chrysosporium* określanego przez autorów jako *Sporotrichum* (M. Ek i K.-E. Eriksson, Applied Polym. Symp., 28, 197—203, 1975).

Inny gatunek — *Trichoderma viride* wydajnie wegetował na słomie potraktowanej uprzednio w autoklawie 5% NaOH. Po 6 dniach wzrostu zawartość białka w biomase wynosiła 25%, a stopień rozkładu podłoża około 75% (C.S. Peitersen, Biotechnol. Bioeng 17, 361—374, 1975).

Wymienione prace oraz inne nie rozstrzygają jednak problemu ligninowego składnika podłoża, stanowiącego uciążliwy odpad, bądź obciążającego biomasę, co wielokrotnie obniża jej wartość pokarmową.

Znane są próby delignifikacji drewna przez takie gatunki jak: *Trametes Versicolor* (W.G. Campoell, Biochem. J.(Cambridge), 24, 1235—1243, 1930) oraz *Trametes pini* (J. Wiertelak., Bull. Int. Acad. Polon. Sci. Lettr. Cl. Sci. Nat., Kraków, B(1), 19—36, 1932), lub niektórych jego odpadów na przykład trocin bukowych przez takie gatunki jak *Polyporus abietinus*, *Stereum rugosum* i *Marasmius scorodoni* (H. Robak, Vestl. Forestl. Forsoksstat. Bergen, meld. 25, Bergen, 1942; G. Fahraeus i wsp., Svensk Botanisk Tidskrift., 43(2, 3) 343—356, 1949). W pracach tych po raz pierwszy wykazano równoległość postępu delignifikacji i rozkładu celulozy. Proces trwał 9 miesięcy, przy czym konsumpcja obu składników drewna wynosiła w zależności od gatunku 45 do 65%. Prace miały wyłącznie charakter poznawczy.

Z przytoczonego już opisu patentowego PRL nr 80 151 znany jest sposób zbiłczania słomy metodą hodowli grzybni. Sposób polega na mieszanej

hodowli na słomie gatunków grzybów, które wytwarzają bakterio- i mykotoksyny z gatunkami dającymi właściwą biomasę. Hodowlę opisanym sposobem prowadzi się niesterylnie w odpowiednio wybranych ocienionych miejscach.

Zamierzony skład populacji w hodowli zapewnić mają antybiotyki wydzielane do środowiska przez gatunki *Piptoporus betulinus* i *Heterobasidion ananosus*. W postępowaniu z góry zakłada się obecność w hodowli nie obojętnych dla organizmu zwierzęcego mykotoksyn. Takimi wysokotoksycznymi substancjami produkowanymi przez stosowany gatunek grzyba są alkaloidy tropinowe typu hioscyaminy, względnie skopolaminy (J.F. Spolbury i S. Wilkinson, J. Chem. Soc., 2085, 1961).

Teoretycznie, sposób ten powinien pozwolić na bezpośrednie przetwarzanie słomy w produkt nadający się do eksploatacji jako pasza, z uwagi jednak na obecność w nim substancji wysokotoksycznych, praktyczna realizacja sposobu musi napotkać na zasadnicze trudności.

Celem wynalazku było opracowanie metody bezpośredniego wykorzystania materiałów ligninocelulozowych do produkcji biomasy grzybowej, zapewniającej wysoką wydajność, jednocześnie przetwarzanie ligniny i celulozy z podłoża, sterylność kultury i nietoksyczność produktu.

Sposób wytwarzania biomasy według wynalazku, polega na bezpośrednim zastosowaniu trocin jako podłoża do hodowli grzybni gatunków z klasy podstawczaków (*Basidiomycetes*), a zwłaszcza z podgrupy tak zwanej „białej zgnilizny”. Jak stwierdzono, gatunki te wydzielają do podłoża enzymy pozwalające im na wykorzystywanie jako źródła pokarmu obok celulozy również ligninę. Do klasy podstawczaków należy między innymi większość gatunków jadalnych.

Według wynalazku, niemodyfikowane trociny drzewne, zwłaszcza sosnowe, świerkowe, bukowe, brzoźowe lub dębowe, zwilża się do fazy półpłynnej, korzystnie wzbogaca się solami azotowymi, i/lub organicznym źródłem azotu, węgla i biostymulatorem wzrostu, po czym całość sterylizuje się przegrzaną parą wodną i na tak przygotowanym podłożu prowadzi się hodowlę wymienionych grzybów, stosując jako szczepionkę, grzybnię ze skosu agarowego, wzbogaconego solami mineralnymi i glukozą, pasażowaną przez pożywkę płynną, a następnie kilkakrotnie, korzystnie pięciokrotnie pasażowaną w warunkach sterylnych na podłożu hodowlanym. Proces prowadzi się w temperaturze 15—28°C w warunkach jałowych, metodą wgłębną.

Dogodnymi źródłami azotu są azotany wapnia lub magnezu w ilościach 0,1 do 1,5% w stosunku do wilgotnej masy podłoża, błoto pofiltracyjne będące odpadem po hydrolizie kwaśnej białka sojowego, wywar melasowy z produkcji spirytusu lub odciek po jego drożdżowaniu, autolizat z drożdży paszowych pochodzących z drożdżowania wywaru melasowego lub odcieku posulfitowego albo wywar ziemniaczany z gorzelnii rolniczych w ilości 0,1 do 2% w przeliczeniu na wilgotną masę podłoża.

Natomiast dodatkowym źródłem węgla są, korzystnie odcieki posulfitowe z celulozowni w ilości 0,1 do 1,5% w przeliczeniu na wilgotną masę podłoża.

5 za. Do zwiłzania podłoża stosować można wodę pochodzenia naturalnego, wodę zawartą w błocie po-filtracyjnym, serwatce, odcieku posulfitowym, wy-warze melasowym, odciekach po drożdżowaniu tych wywarów, wywarze z gorzelnii rolniczych, ściekach celulozowych z celulozowni lub innych odpadach przydatnych dla rozwoju grzybów.

W czasie hodowli następuje stopniowa zamiana podłoża na biomasę zawierającą białko i wszystkie składniki chemiczne grzybni. Ilość ligniny i celulo-
10 zy w grzybowanym materiale zmniejsza się w cza-sie hodowli w tempie uzależnionym od rodzaju podłoża i temperatury. Na ogół proces trwa od siedmiu do dwudziestu ośmiu dni. Po zakończeniu hodowli, część przerośniętego grzybnia podłoża
15 można przeznaczyć na szczepionkę, pozostałość zaś nadaje się do bezpośredniego spasanania lub do dal-szego przerobu.

Produkt po wysuszeniu ma charakterystyczny grzybowy aromat.

Ważną zaletą sposobu, w odróżnieniu od trady-cyjnej hydrolizy i drożdżowania materiałów lignino-celulozowych jest niewielkie zapotrzebowanie na energię i pracę ludzką oraz brak jakiegokolwiek odcieku. Powyższe cechy w połączeniu z rozwiąza-niem kwestii zagospodarowania składnika lignino-
20 wego kwalifikują sposób jako uzasadniony ekono-micznie.

Przykład I. Strzępek grzybni *Trametes ver-sicolor* ze skosu agarowego zawierającego w litrze roztworu wodnego 10 g glukozy, 1 g asparaginy, 0,5 g siarczanu magnezu siedmiowodnego, 0,45 g kwaśnego fosforanu potasu, 0,47 g kwaśnego fos-foranu sodu dwunastowodnego, 2×10^{-5} g wapnia, $2,7 \times 10^{-5}$ g żelaza, cynku i miedzi, 5×10^{-5} g aneu-
30 ryny i 20 g agaru, hodowany przez 10 dni na tym skosie w temperaturze 28°C przeniesiono na 100 ml jałowej pożywki o składzie jak wyżej tylko bez agaru. Hodowlę prowadzono w zaciemnionym miej-scu w sposób stacjonarny w temperaturze 28°C .

Po 10 dniach strzępek grzybni z hodowli przenie-siono na 100 ml wysterylizowanej pożywki wypeł-nionej w całości szklanymi kulkami o średnicy 5 mm, zawierającej w litrze zawiesiny wodnej 20 g suchych trocin sosnowych, 10 g suchej substancji błota pofiltracyjnego i 10 g suchej substancji ser-watki. Hodowlę prowadzono jak poprzednio. Otrzy-maną w ten sposób grzybníę homogenizowano ste-rylnie wytrząsając ze szklanymi kulkami i przeno-szono 10 ml homogenatu do 90 ml pożywki, zawie-
40 rającej trociny i resztę składników jak poprzednio.

Cykl powtórzono jeszcze czterokrotnie. W ostat-nim pasażu uzyskano szczep przystosowany do ho-dowli na trocinach i składnikach jak wyżej. Homo-genat grzybni z ostatniego pasażu w ilości 10% w przeliczeniu na objętość nowej hodowli przeno-szono sterylnie do uprzednio wysterylizowanego w parze wodnej podłoża zawierającego w 1000 g za-wiesiny 200 g suchych trocin sosnowych, 20 g su-chej substancji błota pofiltracyjnego, 10 g suchej
50 substancji serwatki i 700 ml wody pochodzącej z błota pofiltracyjnego i serwatki. Szczepionkę wy-mieszano starannie z podłożem w warunkach ste-rylnych i prowadzono hodowlę wgłębną stacjonar-ną (w fazie półpłynnej), w wysterylizowanym

6 uprzednio tanku, zamkniętym filtrem bakteryjnym, w ciemności przy temperaturze 28°C .

Po 14 dniach hodowli stwierdzono, że grzybowa-ny materiał zawierał w przeliczeniu na suchą masę 11,3% białka oraz o 33,3% mniej ligniny i 32,7%
5 mniej celulozy jak trociny przed hodowlą. Prze-dłużenie czasu inkubacji do 28 dni powodowało zwiększenie zawartości białka o dalsze 4%, oraz ob-niżenie zawartości ligniny o dalsze 6% i celulozy
10 o dalsze 7,3%.

Przykład II. Grzybníę *Pholiota mutabilis* wyhodowaną (jak w przykładzie I) w hodowli na nagarze na pożywce płynnej mineralnej, pasażowa-no na pożywce półpłynnej zawierającej zamiast tro-cin sosnowych trociny świerkowe z kulkami szkla-nymi oraz pięciokrotnie na podłożu z trocinami świerkowymi i dodatkami jak w przykładzie I. Po 14 dniach hodowli stwierdzono w podłożu zawartość 12,4% białka oraz 34,3% mniej ligniny i o 32,7%
20 mniej celulozy jak w trocinach świerkowych przed hodowlą. Przedłużenie czasu inkubacji do 28 dni powodowało zwiększenie zawartości białka o dal-sze 6% oraz obniżenie zawartości ligniny o dalsze 5% i celulozy o 4%.

Przykład III. Grzybníę *Pleurotus ostreatus* wyhodowaną jak w przykładzie I na podłożu aga-rowym, mineralnym, pasażowano na trocinach bu-kowych. Po 14 dniach hodowli stwierdzono w pod-łożu zawartość 9,4% białka oraz o 27,3% mniej lig-niny i 24,7% mniej celulozy jak w trocinach buko-
30 wych przed hodowlą. Po 28 dniach inkubacji stwierdzono dalszy przyrost białka o 3,1% i ubytek ligniny o dalsze 4% oraz celulozy o dalsze 4%.

Przykład IV. Grzybníę *Xerocomus badius* wyhodowaną jak w przykładzie I na podłożu aga-rowym, mineralnym, pasażowano na trocinach brzo-zowych. Po 14 dniach hodowli stwierdzono w pod-łożu zawartość 8,3% białka oraz o 24,7% mniej ligniny i 24,9% mniej celulozy jak w trocinach brzo-zowych przed hodowlą. Po 28 dniach inkubacji
40 stwierdzono przyrost białka o dalsze 3,1% i ubytek ligniny o dalsze 2,7% oraz ubytek celulozy o dalsze 3,6%.

Przykład V. Grzybníę *Lecinum scabrum* wy-hodowaną jak w przykładzie I na podłożu agaro-wym, mineralnym pasażowano na trocinach dębo-wych. Po 14 dniach hodowli stwierdzono w podłożu zawartość 6,3% białka oraz o 2,7% mniej ligniny i 21,4% mniej celulozy jak w trocinach bukowych przed hodowlą. Po 28 dniach inkubacji stwierdzono przyrost białka o dalsze 2,7% i ubytek ligniny o dal-sze 2,4% oraz ubytek celulozy o dalsze 2,6%.

Przykład VI. Grzybníę *Trametes versicolor* wyhodowaną sterylnie (jak w przykładzie I) w ho-dowli stacjonarnej na agarze, pożywce płynnej mi-neralnej, pasażowane na pożywce półpłynnej za-wierającej trociny sosnowe z kulkami szklanymi. Rozdrobnioną sterylnie grzybníę (na drodze wytrzą-sania z kulkami) przenoszono w ilości 50% w prze-liczeniu na objętość nowej hodowli do sterylnego podłoża zawierającego w 1000 g zawiesiny 20 g su-
55 chych trocin sosnowych, 20 g suchej substancji błota pofiltracyjnego, 10 g suchej substancji serwatki i 950 ml wody pochodzącej z błota pofiltracyjnego i serwatki znajdującego się w tanku fermentacyj-

nym zaopatrzonym w mieszało i bełkotkę doprowadzającą sterylne powietrze.

Hodowlę węglaną mieszaną (150 obr. na minutę) i napowietrzną (2 litrami powietrza na litr hodowli na minutę) prowadzono przez 7 dni. Po tym czasie grzybowany materiał zawierał w przeliczeniu na suchą masę 20,2% białka oraz o 36,3% mniej ligniny i 36,2% mniej celulozy jak trociny przed hodowlą.

Przykład VII. Grzybnie *Pholiota mutabilis* wyhodowaną sterylne w hodowlach stacjonarnych na agarze i pożywce płynnej mineralnej jak w przykładzie I pasażowano na pożywce półpłynnej stacjonarnej oraz węglanej jak w przykładzie VI, zawierającej zamiast trocin sosnowych trociny świerkowe. Po 7 dniach hodowli grzybowany materiał zawierał 16,7% białka oraz o 31,4% mniej ligniny i 32,1% mniej celulozy jak trociny przed hodowlą.

Przykład VIII. Grzybnie *Armillariella mellea* wyhodowaną sterylne w hodowlach stacjonarnych na agarze i pożywce płynnej mineralnej jak w przykładzie I oraz pożywce półpłynnej stacjonarnej i węglanej jak w przykładzie VI, zawierającej zamiast trocin świerkowych trociny bukowe. Po 7 dniach hodowli grzybowany materiał zawierał w przeliczeniu na suchą masę 12,4% białka i o 23,4% mniej ligniny i 28,7% mniej celulozy jak trociny przed hodowlą.

Przykład IX. Grzybnie *Inonotus obliquus* hodowano sterylne w hodowlach stacjonarnych na agarze i pożywce płynnej mineralnej jak w przykładzie I i półpłynnej stacjonarnej oraz węglanej napowietrzanej jak w przykładzie VI, zawierającej zamiast trocin sosnowych trociny brzożowe. Po 7 dniach hodowli grzybowany materiał zawierał w przeliczeniu na suchą masę 12,4% białka oraz o 25,3% mniej ligniny i 24,7% mniej celulozy jak trociny przed hodowlą.

Przykład X. Grzybnie *Fomes fomentarius* hodowano sterylne w hodowlach stacjonarnych na agarze i pożywce płynnej mineralnej jak w przykładzie I, a następnie pasażowano na pożywce półpłynnej stacjonarnej oraz węglanej napowietrzanej jak w przykładzie VI zawierającej zamiast trocin świerkowych trociny dębowe. Po 7 dniach hodowli grzybowany materiał zawierał w przeliczeniu na suchą masę 10,2% białka oraz o 21,3% mniej ligniny i 22,4% mniej celulozy jak trociny przed hodowlą.

Przykład XI. Grzybnie *Trametes versicolor* hodowano jak w przykładzie I na pożywkach mineralnych, a następnie pasażowano na podłożu zawierającym trociny sosnowe bez żadnych dodatków tylko zwilżone wodą. Po 14 dniach hodowli stwierdzono w podłożu 3,2% białka oraz o 5% mniej ligniny i o 6% mniej celulozy.

Przykład XII. Grzybnie *Pleurotus ostreatus* hodowano jak w przykładzie I na pożywkach mineralnych, a następnie pasażowano na podłożu zawierającym trociny sosnowe oraz zamiast błota pofil-

tracyjnego 10 g, azotanu wapnia. Po 14 dniach hodowli stwierdzono w grzybowanym materiale 9,7% białka oraz o 21,5% mniej ligniny i 27,3% celulozy.

Przykład XIII. Grzybnie *Trametes versicolor* hodowano jak w przykładzie I na pożywce mineralnej oraz pasażowano na podłożu zawierającym trociny sosnowe i zamiast błota pofiltracyjnego 10 g azotanu magnezu. Po 14 dniach hodowli stwierdzono w grzybowanym materiale 12,3% białka oraz mniej o 32,7% ligniny i 34,3% celulozy.

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób wytwarzania biomasy bogatej w białko z odpadów ligninocelulozowych przez hodowlę grzybów nietoksycznych, **znamienny tym**, że niemodyfikowane trociny drzewne, zwłaszcza sosnowe, świerkowe, bukowe, brzożowe lub dębowe zwilża się do fazy półpłynnej, krystalnie wzbogaca się solami azotowymi i/lub organicznym źródłem azotu, węglą i biostymulatorem wzrostu, po czym całość sterylizuje się przegrzaną parą wodną i następnie na tak przygotowanym podłożu prowadzi się kulturę grzyba z klasy podstawczaków, a zwłaszcza z pod-

grupy tak zwanej białej zgnilizny, stosując jako szczepionkę grzybnie ze skosu agarowego wzbogaconego solami mineralnymi i glukozą, pasażowaną przez pożywkę płynną a następnie kilkakrotnie, korzystnie pięciokrotnie pasażowaną w warunkach sterylnych na podłożu hodowlanym, przy czym proces prowadzi się w temperaturze 15—28°C w warunkach jakowych metodą węglaną.

2. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że jako dodatkowe źródło azotu stosuje się korzystnie azotan wapnia lub magnezu w ilości 0,1—1,5% w przeliczeniu na wilgotną masę podłoża, błoto pofiltracyjne będące odpadem po hydrolizie kwasnej białka sojowego, wywar melasowy z produkcji spirytusu lub odciek po jego zdrożdżowaniu, bądź autolizat z drożdży paszowych pochodzących z drożdżowania wywaru melasowego lub odcieku posulfitowego lub wywar ziemniaczany z gorzelnii rolniczych w ilości 0,5—2,5% wagowych w przeliczeniu na wilgotną masę podłoża.

3. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że jako biostymulator wzrostu grzybów stosuje się, korzystnie serwatke pochodzącą z przemysłowej produkcji przetworów mlecznych w ilości 0,1—2% w przeliczeniu na wilgotną masę podłoża.

4. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że jako dodatkowe źródło węgla stosuje się, korzystnie, ścieki fenolowe z celulozowni w ilości 0,1—1,5% w przeliczeniu na wilgotną masę podłoża.

5. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że jako płyn zwilżający podłoże stosuje się wodę ze źródeł naturalnych i/lub wodę zawartą w błocie pofiltracyjnym, serwatce, wywarze posiarzynowym, wywarze melasowym, odciekach po zdrożdżowaniu tych wywarów z gorzelnii rolniczych, ścieków fenolowych z celulozowni lub innych odpadów przydatnych dla rozwoju grzybów.