

Н.А Бісько<sup>1</sup>, П.Д Пашнев<sup>2</sup>, В.П Попович<sup>3</sup>, Н.О Федоритенко<sup>3</sup>

## РОЗРОБКА БІОТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ВИРОЩУВАННЯ ГРИБІВ ШИІТАКЕ

<sup>1</sup> – Інститут ботаніки ім. Н.Г. Холодного<sup>2</sup> – Національний фармацевтичний університет<sup>3</sup> – Національний медичний університет ім. О.О. Богомольця**Ключові слова:** гриб Шиітаке, глибинне культивування, ліофільне сушіння.**Ключевые слова:** гриб Шиитаке, биотехнологическая схема, лиофильная сушка биомассы гриба.**Key words:** Shiitake mushroom, biotechnological scheme, drying of mushroom biomass.

Проведені дослідження визначення оптимальних умов для росту біомаси гриба Шиітаке. В результаті розроблена біотехнологічна схема вирощування та визначені умови ліофільного сушіння біомаси гриба.

Проведены исследования по определению оптимальных условий для роста биомассы гриба Шиитаке. В результате разработана биотехнологическая схема выращивания и определены условия лиофильной сушки биомассы гриба.

Researches on definition of optimum conditions for growth of a biomass of mushroom Shiitake are carried out. The biotechnological scheme of cultivation is developed and conditions of drying of mushroom biomass are defined as a result.

У багатьох країнах світу їстівні гриби використовуються не тільки як продукти харчові - джерела харчового білка, але і як цінна сировина для одержання речовин лікувально-профілактичної й лікарської дії.

Новим і досить перспективним напрямком у виробництві грибної біомаси є глибинне рідкофазне культивування міцелію вищих грибів на основі методів мікробіологічного синтезу [3,4]. Використання харчової сировини, що мало утилізується, в складі рідких живильних середовищ і висока швидкість росту грибної біомаси поставили цей процес у ряд конкурентноспроможних технічних рішень промислового одержання протеїну.

Дослідження проводились на базі Інституту ботаніки ім. Н.Г.Холодного НАН України (м. Київ). Нашою метою було отримати суху біомасу гриба Шиітаке методом глибинного культивування. Вибір методу культивування базувався на тому, що швидкість росту міцелію гриба в декілька разів швидше, ніж при екстенсивному та інтенсивному способах культивування за однакових показників продуктивності. Глибинне культивування запобігає потраплянню сторонньої мікрофлори на стерильний субстрат.

Для того, щоб визначити на якому живильному середовищі найвищі показники продуктивності біомаси за певний період часу, ми висіяли на різних живильних середовищах однаковий штаму гриба Шиітаке 353. Тип посівного міцелію - рідкий інокулюм, що одержують у процесі глибинного культивування вищих їстівних базидіоміцетів. У дослідях з вивчення росту гриба *Lentinus edodes* як живильні середовища використовували неохмільне пивне сусло, глюкозо-пептидне середовище, відвар крохмалю, відвар борошна в об'ємі 100 мл кожне.

Середовища розливали по 100 мл в колби, щільно закривали і простерилізували в автоклаві 30 хв при 0,7 атмосфер та 124° С.

Як посівний матеріал брали музейний штаму 353 гриба Шиітаке. Посів штаму проводили одночасно на всі середовища. Інкубацію культури здійснювали при температурі 27°С. Облік робили на 3, 9, 15-у добу. Спостереження за ростом колоній припинили після досягнення його максимального розміру. Максимальний ріст колоній спостерігали на 15 добу. Вивчення морфології міцелію проводили візуально на середовищах.

Як видно на малюнках, найбільш інтенсивний ріст біо-

маси спостерігався на середовищі пивне сусло неохмілене. Менш інтенсивний ріст спостерігали на глюкозо-пептидному середовищі, середовищі з відвару борошна, середовищі з відвару крохмалю.

Швидкість росту міцелію визначалася по формулі:

$$PK=dhg/t$$

де PK – коефіцієнт росту,

d - діаметр колонії (мм),

h - висота колонії (мм),

g - щільність колонії (бал),

t - вік колонії (доба).

Щільність колоній визначали візуально за трибальною шкалою (1 бал - рідка, 2- середня, 3-щільна).

Одержані результати наведені в таблиці 1.

Таблиця 1.

## Показники росту міцелію штаму 353 гриба Шиітаке на різних живильних середовищах.

Живильні середовища	Показники росту міцелію				
	діаметр колонії (мм) d	висота колонії (мм) h	щільність колонії (бал) g	вік колонії (доба) t	коефіцієнт росту PK
Пивне сусло неохмілене	90	5	3	15	90
Відвар борошна	20	2	1	15	2,6
Глюкозо-пептидне середовище	30	2	1	15	4
Відвар крохмалю	15	2	1	15	2

Виходячи з одержаних результатів, як живильне в подальших дослідженнях ми використовували середовище з найвищим коефіцієнтом росту – 90 - пивне сусло неохмілене в загальному об'ємі 2000 мл. Пивне сусло розливали по 100 мл в мікробіологічні матраци, щільно закривали і стерилізували. Стерилізацію проводили в автоклаві ГК-100 30 хв при 0,7 атмосфер та 124°С. Вплив рН на ріст міцелію на середовищі пивного сусла визначали потенціометричним методом, корегуванням показника концентрації водневих іонів від 3 до 9. За допомогою рН-метра («Іонометр універсальний» ЭВ – 74) визначили рН пивного сусла, який після стерилізації становив 5,1. Для перевірки чистоти та підготовки активного посівного матеріалу проводили розсівання міцелію на свіжий



сусло-агар та вирощували міцелій 8 діб у термостаті при  $27 \pm 1^\circ\text{C}$ .

Одним із факторів, що визначають високу врожайність міцелію при глибинному способі вирощування, так само як і при екстенсивному, є якість і правильна доза внесення посівного міцелію. Кількість посівного матеріалу, необхідного для його швидкого росту й одержання гарного врожаю при глибинному способі культивування, становить 3 - 5% від маси субстрату. Зі збільшенням дози внесення міцелію прискорюється вивільнення  $\text{CO}_2$  із субстрату й підвищується його температура. Зменшення кількості посівного матеріалу до 1 - 1,5% приводить до повільного освоєння поживного середовища грибом і підвищення небезпеки його заселення конкурентними мікроорганізмами.

Вирощену виробничу культуру Шіітаке подрібнювали та поміщали в стерильний посуд гомогенізатора і гомогенізували 1,5 хв. при 6000 об./хв. Гомогенізовану виробничу культуру переносили з стакана гомогенізатора в колбу.

З колби, за допомогою аптечної піпетки на 10 мл, переносили по 5 мл гомогенізату в мікробіологічні матраці (19 матраців) з пивним сушлом неохміленим, в стерильних умовах, над спиртовою горілкою. Після цього всі матраці були щільно закриті і перенесені в термостатичне приміщення з постійною температурою  $26^\circ\text{C}$ . Освітлю-

ваність приміщення становила 200-300 люкс. Контроль проводився на 12-й, 21-й, 28-й день. На 12-й день спостерігалось збільшення біомаси на 30%. На 21-й день біомаса збільшувалась на 60%. На 28-й день біомаса збільшувалась на 100%.

На 28 день росту проводилось вилучення міцелію гриба Шіітаке з середовища. Із 19 матраців були придатні для подальшої роботи з міцелієм 12. Вилучення проводилось в асептичних умовах. Для цього з мікробіологічних матраців за допомогою попередньо оброблених гачка та ложки виймався міцелій і поміщався в заздалегідь підготовлену та зважену скляну банку. Культуральна рідина проціджувалась в іншу банку через медичну марлю. Залишки міцелію на марлі після проціджування поміщались в банку з вийнятим попередньо міцелієм. Після вилучення міцелію з усіх мікробіологічних матраців, банка з міцелієм зважувалась на технічних вагах і розраховувалась маса міцелію гриба Шіітаке яка становила близько 109 г.

На основі результатів дослідження, що проведені у відділі мікології Інституту ботаніки ім. Н.Г.Холодного НАН України та випробувань на колекційному штамі вищого базидіального гриба *Lentinus edodes* розроблена біотехнологічна схема вирощування грибів Шіітаке.

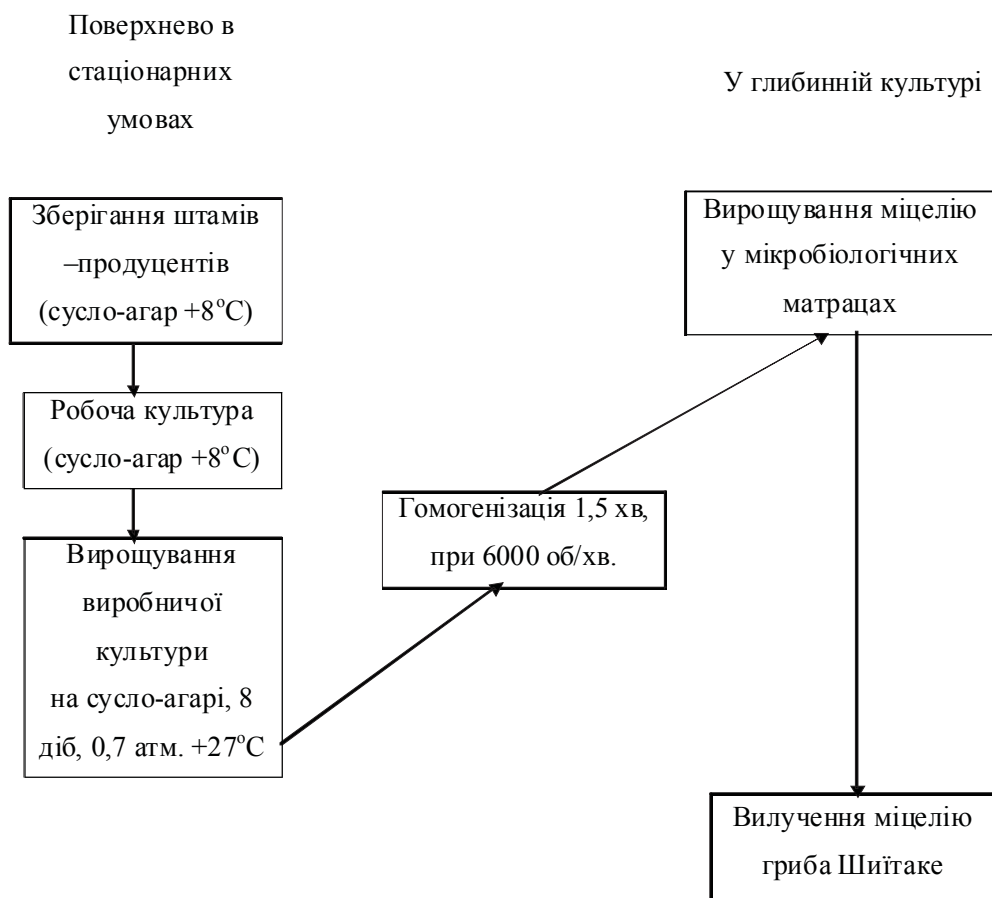


Рис 8. Біотехнологічна схема вирощування біомаси гриба Шіітаке.



Технологічний процес вирощування міцелію гриба Шіітаке, складається з наступних стадій:

- підготовка поживних середовищ та посуду;
- підготовка інокулюму:

а) на скошеному агарізованому середовищу;

б) на рідкому середовищі у колбах поверхневим методом:

в) гомогенізація частини виробничої культури для отримання інокулюму для послідовних етапів вирощування глибокої культури;

- вирощування міцелію у мікробіологічних матрацах;
- вилучення міцелію гриба Шіітаке.

Сушіння міцелію гриба Шіітаке проводилось на базі лабораторії ПП «Букур» м.Київ (завод «Fresh Up»). Для сушіння біомаси гриба Шіітаке був вибраний метод ліофілізації, який дозволяє зберігати основні біологічні властивості сировини.

Для сушіння міцелію гриба Шіітаке використовувалась ліофільна сушарка моделі «ИНЕЙ – 6», яка призначена для сублімаційного сушіння в робочій камері продуктів, що містять воду і попередньо заморожені, з метою їх тривалого зберігання.

У піддон місткістю 300 мл поміщався попередньо заморожений міцелій гриба Шіітаке вагою 109 г. Піддон швидко погружався в охолоджену камеру сублиматора, який загерметизовувався. Сушіння проводилось при температурі конденсатора - 50°C. Тиск в системі становив 30 Па,

ліофілізація тривала 1,5 год.

Отриманий ліофілізований порошок зважувався на терезах ВЛР 200. Маса отриманого ліофілізованого порошку становила 13,1г

#### ВИСНОВОК

Таким чином, глибоке культивування є новим біотехнологічним методом вирощування біомаси грибів у замкнутій системі на рідкому живильному середовищі. Цей спосіб інтенсивно розвивається в багатьох країнах як самостійна галузь біотехнологічної промисловості. Глибоке культивування спрямоване на одержання великої кількості грибної маси для отримання біологічно активних речовин.

#### ЛІТЕРАТУРА

1. *Рисман М.* Биологически активные добавки. Неизвестное об известном.-Арт Бизнес Центр:1998.-с.129-136.

2. *Leatham G.* Cultivation of Shiitake, the Japanese forest mushroom, on logs.-USA:Forest Products Journal, 1982.-32(8)- p. 29-35.

3. *Cotter V. T., et al.* Shiitake farming in Virginia.- Blacksburg, VA: Virginia Tech and Virginia State University, Virginia Cooperative Extension Service, 1987.- 438 p.

4. *Baughman, M.* Financial analysis of shiitake mushroom production. In Shiitake Mushrooms: Proceedings of a National Symposium and Trade Show.--St. Paul, MN: University of Minnesota, Educational Development System, 405 Coffey Hall, 1989 p. 169 179.

5. *Harris, B.* Growing shiitake commercially. Madison, WI: Science Tech Publishers 1986. p 134-136.

**Інформація про авторів:** Н.А Бісько, д-р біолог. наук, – Інститут ботаніки ім. Н.Г. Холодного, м. Київ, 8-044-272-32-03

П.Д Пашнев, д-р фармац. наук, проф., Національний фармацевтичний університет, м. Харків, 8-0572-67-88-52.

В.П. Попович, канд. фармац. наук, доц., Н.О Федоритенко, асп. Національний медичний університет ім. О.О. Богомольця, м.Київ, 8-044-235-90-66