УДК 57.083.134

КУЛЬТИВИРОВАНИЕ *GRIFOLA FRONDOSA* НА СУБСТРАТЕ С БЕРЕЗОВЫМИ ОПИЛКАМИ

Д.В. Минаков*, К.В. Севодина, В.П. Севодин

Бийский технологический институт (филиал)
ФГБОУ ВО «Алтайский государственный
технический университет им. И.И. Ползунова»,
659305, Россия, г. Бийск, ул. Трофимова, 27

**e-mail: assassin0526@mail.ru*

Дата поступления в редакцию: 05.11.2015
Дата принятия в печать: 20.01.2016

Использование отходов лиственных пород деревьев, произрастающих на территории России, для культивирования грибов *Grifola frondosa* (Dicks: Fr.) является актуальной проблемой. Целью данной работы являлось изучение возможности использования березовых опилок в качестве субстрата для выращивания культуры гриба *G. frondosa*. В статье представлена зависимость степени зарастания субстрата (%) от времени культивирования (сутки). Наиболее быстрое зарастание субстрата мицелием происходило в образцах № 1 и 5 на 17-е сутки культивирования. Относительно медленное зарастание субстрата зафиксировано на 23-е сутки культивирования в образцах № 2, 3 и 4. Показано, что продуктивность по биомассе грибов повышается путем обогащения субстрата дополнительными компонентами. Предложено выделять три стадии зрелости *G. frondosa* – биологическая, техническая и полная. Приведена характеристика потребительских свойств плодовых тел *G. frondosa* на разных стадиях зрелости. Установлено, что стадии полной технической зрелости достигают преимущественно плодовые тела первой волны, тогда как внешний вид и линейные размеры грибов второй волны соответствуют стадии технической и биологической зрелости. Общий выход грибов в зависимости от массы субстрата составил 26,8 %. Установлено, что грибы *G. frondosa* могут давать до пяти волн плодовых тел. Выход грибов в зависимости от волны плодоношения составил: для первой – 60 %, для второй – 25 %, для третьей – 6,2 %, для четвертой – 5,7 %, для пятой – 3,1 %. Полученные результаты представляют безусловный практический интерес, а также вносят вклад в развитие биотехнологии и товароведения товарной группы «Грибы».

Grifola frondosa, культивирование, субстрат, мицелий, плодовое тело

Введение

Гриб мейтаке (лат. *Grifola frondosa*) относится к категории сапротрофов [8]. Основными регионами обитания являются Япония, Корея и Китай. В естественных условиях мейтаке произрастает преимущественно на мертвой древесине твердых лиственных пород [7]. В живом дереве мицелий сначала паразитирует в сердцевинных слоях древесины, убивая его, затем проникает в близлежащие слои по направлению к коре, разлагает лигнин и полностью разрушает древесные волокна. Благодаря такой способности в качестве основы субстратов для культивирования мейтаке могут использоваться как обрубки деревьев, так и блоки из опилок дуба, бука и других пород, произрастающих в естественном ареале обитания этого гриба [6].

Искусственное культивирование *Grifola frondosa* (далее – *G.f.*) предполагает создание условий, максимально приближенных к естественной среде. По большей части это относится к оптимальным температурно-влажностным режимам и рецептурам субстратов [5, 8].

Целью работы было изучение возможности использования березовых опилок в качестве субстрата для выращивания культуры гриба (*G.f.*).

Объекты и методы

В ходе исследования использовали штамм базидиомицета (*G.f.*), приобретенный через интернет-магазин «Хутор Столбово». Для наращивания биомассы применяли стандартные питательные среды [1]. Зерновой мицелий получали путем заражения подготовленного зерна пшеницы мицелием (*G.f.*) в стерильных условиях. В качестве инкубационных камер для проращивания мицелия использовали термостаты марки ТС-80М-2. Стерилизацию проводили в автоклаве ВК-70. Для определения степени зарастания мицелием субстрата использовали 15 образцов. Образцы представляли собой частично колонизированный мицелием субстрат, от которого биомасса мицелия отделялась с помощью отсеивания. После чего навеску мицелия высушивали до постоянной массы при температуре 105 °С [3]. Степень зарастания субстрата в банках мицелием оценивали по массе высушенного мицелия в образцах.

Отделение и высушивание биомассы мицелия проводили каждые 2 суток до полного освоения субстрата мицелием.

Контроль качества материала для инокуляции производили методом микроскопирования (микроскоп Микмед 6).

В качестве компонентов для приготовления субстратов использовали древесные опилки, стружку и щепу березы, гипс, минеральные соли, моносахариды, пшеницу цельную и пшеничные отруби, просо в разных соотношениях. Зерновой мицелий вносили в количестве 5 % от массы субстрата.

Для определения линейных размеров и выхода плодовых тел по отношению к субстрату использовали стандартные измерительные методы [4].

Эксперимент осуществляли в 5-кратной повторности.

Обсуждение результатов

Для получения плодовых тел съедобных грибов в искусственных условиях используют преимущественно технологию интенсивного выращивания, которая предполагает соблюдение стерильности на всех стадиях производственного цикла. Несоблюдение режимов автоклавирования приводит к развитию плесеней и как следствие, происходит подавление жизнеспособности мицелия.

Культивирование мейтаке интенсивным способом осуществляли согласно схеме, приведенной на рис. 1.

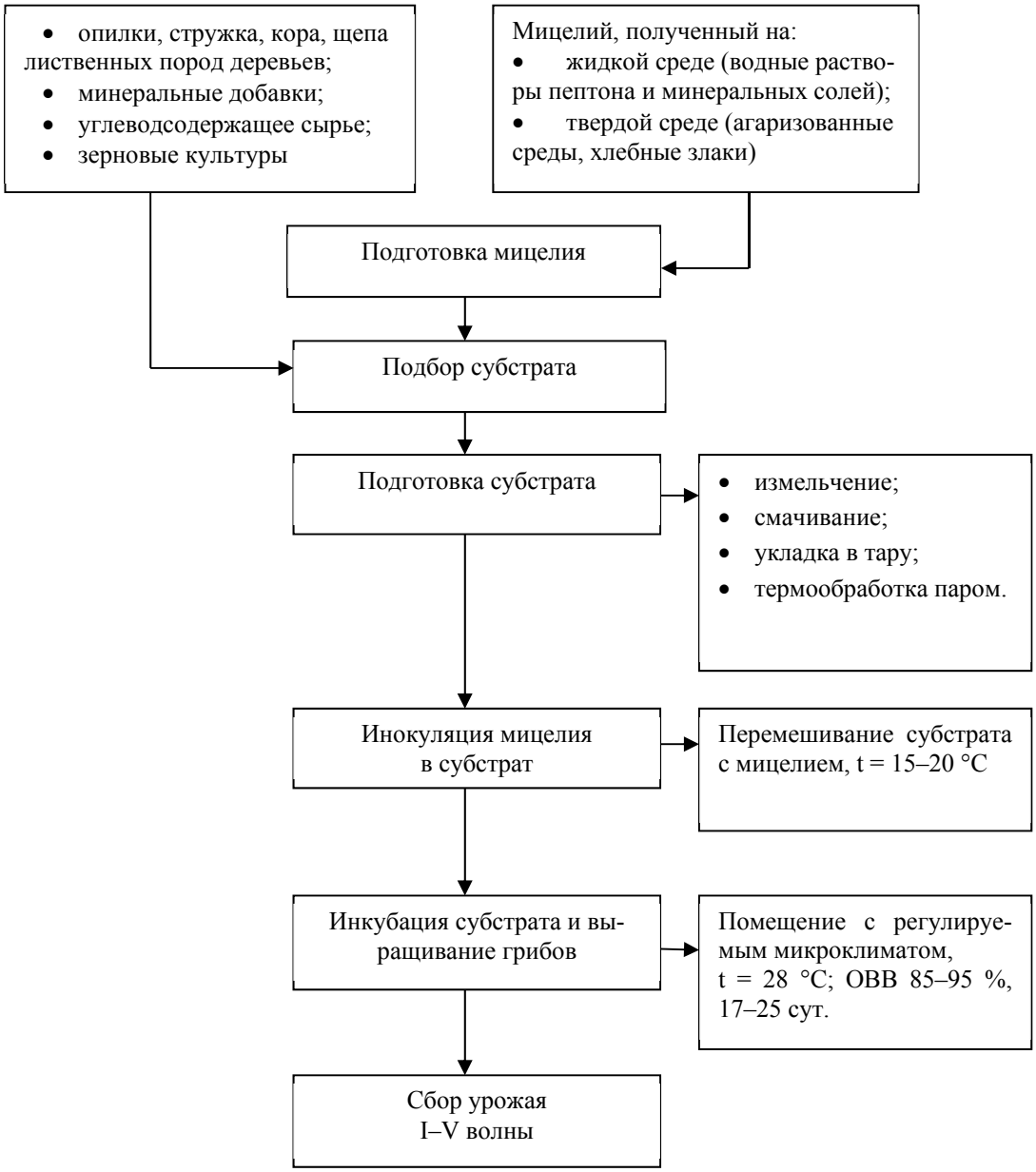

Рис. 1. Технологическая схема получения плодовых тел гриба мейтаке

Известно несколько способов получения мицелия: классический, предполагающий получение спор грибной культуры из стерильных «кусочков ткани» плодовых тел; тканевый, основанный на способности гиф мицелия разрастаться в благоприятных условиях среды; ферментативный – на субстрате Тилля. Наибольшее распространение в промышленных условиях получили способы получения мицелия на жидких и твердых средах [1].

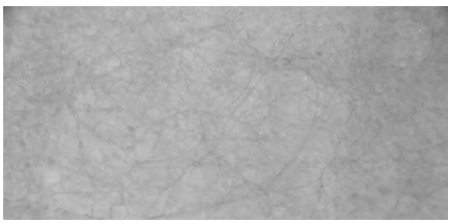

Рис. 2. Снимок активного мицелия (*G.f.*) (увеличение, крат/числовая апертура: 40/0,65)

Очищенное от примесей зерно (1 кг) засыпали в 1,5 л воды, доводили до кипения и варили при перемешивании и слабом кипении в течение 25 мин. Избыток воды отделяли, а оставшееся разваренное зерно подсушивали, рассыпав тонким слоем на чистой поверхности. Подсушенное зерно смешивали с регуляторами кислотности: мелом (3 г) и гипсом (12 г). Далее субстрат засыпали в колбы с ватно-марлевыми пробками. Колбы стерилизовали в автоклаве (при температуре 121 °С и давлении 1 атм.) в течение 60 мин. Затем охлаждали до температуры 25 °С и производили инокуляцию мицелием культуры гриба (*G.f.*), выращенным на сусло-агаровой среде, в стерильном помещении. Заинокулированные колбы термостатировали при температуре 28 °С до полного освоения зернового субстрата мицелием (рис. 2).

Полученный зерновой мицелий использовали для инокуляции субстрата из березовых опилок. Нами березовые опилки применялись вместо обычно используемых отходов переработки дуба, бука или некоторых плодовых деревьев.

В табл. 1 приведена сравнительная характеристика химического состава древесины лиственных пород деревьев, на которых могут выращиваться мейтаке.

Таблица 1

Химический состав лиственной древесины (% от абсолютно сухой древесины) [2]

Компоненты	Химический состав, %		
	Береза	Дуб	Бук
Зольные вещества	0,34	0,52	0,50
Легкогидролизуемые полисахариды	27,14	20,79	23,25
Трудногидролизуемые полисахариды	36,24	37,35	44,20
Целлюлоза	32,01	36,70	42,60
Лигнин	25,78	27,51	24,00
Гексозаны	36,76	39,92	48,20
Пентозаны (без уроновых кислот)	22,38	16,33	16,67
Азотсодержащие вещества в пересчете на белок (N×6,25)	1,35	-	-
Общий выход РВ при количественном гидролизе	70,42	64,60	75,20
Содержание моносахаридов в гидролизате легкогидролизуемых полисахаридов:			
D-галактозы	1,04	1,67	3,29
D-глюкозы	2,13	1,27	}2,88
D-маннозы	1,36	0,59	
L-арабинозы	1,14	0,98	0,72
D-ксилозы	22,17	16,21	15,75
L-рамнозы	Следы	-	0,82
Содержание моносахаридов в гидролизате трудногидролизуемых полисахаридов:			
D-глюкозы	35,57	40,82	47,39
D-ксилозы	2,12	1,37	2,47
D-маннозы	0,75	Следы	Следы

Одним из важнейших факторов, влияющих на заселение древесины грибами мейтаке, является различный химический состав лиственных пород деревьев. Главным критерием подбора субстратов перспективных для культивирования плодовых тел мейтаке должно быть содержание целлюлозы, лигнина, углеводов, азота и минеральных элементов.

По данным табл. 1 видно, что химический состав березы по содержанию основных компонентов сопоставим с древесиной бука и дуба.

Обобщение и анализ данных табл. 1 позволили определить основные подходы к выбору рецептурных компонентов для приготовления субстратов на основе древесины березы. В качестве азотистых, углеводсодержащих компонентов и минеральных солей использовали пшеничные отруби, мел, соли серной кислоты, моносахариды.

Составы приготовленных субстратов приведены в табл. 2.

Таблица 2

Составы субстратов для получения плодовых тел мейтаке

Рецептурные компоненты	Массовая концентрация компонентов, %				
	1	2	3	4	5
Древесина березы*	28,20	26,50	46,24	34,68	51,41
Пшеничные отруби	4,80	-	11,56	23,12	12,85
$CaCO_3$	0,40	-	1,15	1,15	-
$CaSO_4$	2,1	-	3,46	3,46	1,28
Суперфосфат кальция	-	-	-	-	0,25
KH_2PO_4	-	0,21	-	-	-
$MgSO_4 \times 7H_2O$	-	0,07	-	-	-
Пептон основной сухой	0,1	0,36	-	-	-
Сахароза	-	-	-	-	0,77
Глюкоза	0,20	0,70	-	-	-
Вода	64,2	72,16	37,57	37,57	33,44

*Опилки, стружка, щепа

Субстрат помещали в стеклянные банки объемом 1 дм^3 и проводили автоклавирование при температуре 121 °С и давлении 1 атм. в течение 1,5 часов. После автоклавирования значение *pH* среды находилось в пределах 6,5–6,7. Субстрат охлаждали до 25 °С и производили инокуляцию субстрата зерновым мицелием (*G.f.*). Подготовленные образцы помещали в термостаты при температуре 28 °С до момента полной колонизации субстрата мицелием.

Было отмечено, что скорость образования и размножения мицелия (*G.f.*) зависит от компонентов, входящих в состав питательной среды. На рис. 3 представлен график, отражающий зависимость процента освоения субстрата мицелием от времени.

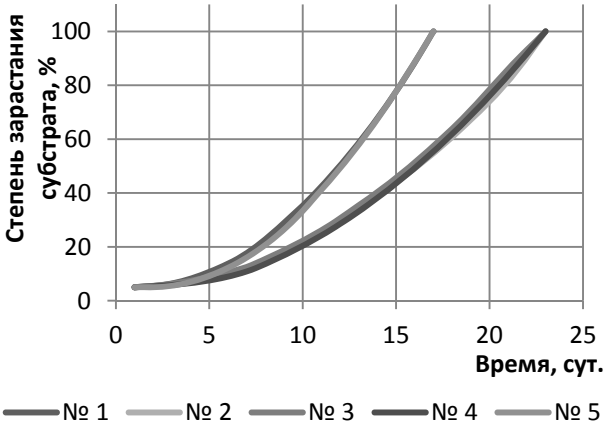

Рис. 3. Динамика образования мицелия (*G.f.*) в субстратах разного состава

Из данных рис. 3 следует, что наиболее быстрый рост мицелия происходил в образцах № 1 и 5. При этом процесс протекал интенсивнее в период с 15 по 17-е сутки. Полное освоение субстрата было зафиксировано на 17-е сутки культивирования.

Развитие мицелия в образцах №2, 3 и 4 имело несколько иную динамику. Полная колонизация была отмечена на 23-и сутки культивирования. Ускорение зарастания субстрата происходило на 9-е сутки размножения мицелия.

Полученные результаты позволяют сделать вывод о том, что введение в состав субстрата наряду с древесиной дополнительных компонентов ускоряет процесс культивирования культуры гриба (*G.f.*).

После измерения основных параметров субстраты были помещены в камеры с контролируемым микроклиматом (температура 15 °С, ООВ 90 %). Появление первых примордиев отмечено на 5-е сутки эксперимента (рис. 4). При этом их формирование происходило в течение 3 суток.

Рис. 4. Примордии плодовых тел мейтаке на 5-е сутки инкубирования

Количественным пересчетом было установлено число сформировавшихся примордиев, которое составило от 50 (образец № 4) до 100 (образец № 1) штук. Первая волна плодоношения была отмечена на 15-е сутки эксперимента (рис. 5).

a b c d

Рис. 5. Поэтапное формирование плодовых тел мейтаке: a – сформировавшиеся примордии после 8 суток инкубации; b – формирование плодовых тел после 11 суток инкубации; c – формирование плодовых тел после 13 суток инкубации; d – формирование плодовых тел после 15 суток инкубации в камере роста

Вторая волна образования плодовых тел наблюдалась после 36 суток инкубации в камере роста.

Сбор плодовых тел осуществляли на разных стадиях зрелости для оценки их потребительских свойств. Грибы минимального размера имели следующие средние параметры: масса 6,44 г, длина ножки 35 мм, диаметр шляпки 10 мм, грибы максимального размера – масса 79,65 г, длина ножки 60 мм, диаметр шляпки 110 мм (рис. 6).

Рис. 6. Линейные размеры плодовых тел (*G.f.*)

Применение технологии интенсивного выращивания мейтаке на древесных отходах березы в качестве основного компонента питательного субстрата позволило получить следующие результаты (табл. 3). В таблице приведены параметры плодовых тел мейтаке, полученных при сборе первой и второй волны.

Таблица 3

Характеристика потребительских свойств плодовых тел мейтаке на разных стадиях зрелости

Показатель	Стадии зрелости		
	биологическая	техническая	полная
Внешний вид	Плодовые тела целые, в виде вдавленной, воронковидной, рожковидной шляпки, по краю часто лопастной с ножкой центральной, реже смещенной от центрального положения, сплошной. Плодовое тело может состоять из достаточно большого количества частично прикрывающих друг друга шляпок, расположенных на разветвляющихся ножках, смещенных в сторону от центров шляпок и прикрепленных к одной основе.		
Окраска	Темная серо-коричневая	От светло-серого до светло-коричневого	Беловатая, палевая до светло-серого
Плотность мякоти	Мякоть белая, плотная		
Цвет гименофора	Белый	от белого до светло-коричневого	Пластинки нисходящие далеко по ножке, редкие, узкие, от белого до светло-коричневого или светло-серого
Размер шляпки по наибольшему поперечному диаметру, мм	10–30	31–60	61–110
Размер ножки, мм	10–30	31–50	51–70
Вкус и запах	Хорошо выраженные, свойственные наименованию		

В процессе эксперимента было отмечено, что стадии полной технической зрелости достигают преимущественно плодовые тела первой волны, тогда как внешний вид и линейные размеры грибов второй волны соответствуют стадии технической и биологической зрелости. Выход составляет 35 и 65 % от массы урожая второй волны соответственно. При этом сами тела деградируют и редко достигают стадии технической зрелости, поэтому их использование в качестве товарной продукции нецелесообразно.

Дальнейшее наблюдение показало, что мейтаке в отличие от других базидиальных грибов может давать до пяти волн плодовых тел (табл. 4).

Грибы третьей, четвертой и пятой волны достигают размеров, соответствующих биологической стадии зрелости. Более длительная выгонка плодовых тел приводит к их гниению.

Общий выход грибов в зависимости от массы субстрата составляет 26,8 %. В свежем или мороженом виде можно использовать 22,3 % (выход грибов первой и второй волны), оставшиеся 4,5 %

можно реализовывать в качестве сухого порошкообразного продукта.

Таблица 4

Выход грибов в зависимости от волны плодоношения

Волна плодоношения	Выход грибов, % от общего объема	Выход грибов технической и полной зрелости, %	Выход грибов, % от массы субстрата
Первая	60	80	15,8
Вторая	25	20	6,5
Третья	6,2	–	2,25
Четвертая	5,7	–	1,45
Пятая	3,1	–	0,80

Выводы

Установлена принципиальная возможность использования древесных отходов березы для культивирования (*G.f.*). Получена зависимость состава субстрата и скорости его колонизации мицелием гриба (*G.f.*). Ускорение процесса освоения субстрата гифами можно достичь путем введения в состав субстрата минеральных солей.

Ускорение процесса формирования грибницы зафиксировано на 9-е сутки эксперимента.

Культивирование мейтаке в искусственных условиях возможно исключительно в стерильных условиях при контролируемых температурно-влажностных режимах. Оптимальной температурой для роста мицелия является 28 °С, а для получения плодовых тел 15 °С.

Предложено выделять три стадии зрелости мейтаке – биологическую, техническую и полную.

Для реализации грибов в свежем товарном виде наиболее приемлемой является стадия технической зрелости.

Показано, что выход грибов в зависимости от волны плодоношения составляет: для первой – 60 %, для второй – 25 %, для третьей – 6,2 %, для четвертой – 5,7 %, для пятой – 3,1 %.

Список литературы

1. Дудка, И.А. Методы экспериментальной микологии: справочник / И.А. Дудка, С.П. Вассер, И.А. Элланская. – Киев: Наукова думка, 1982. – 550 с.

2. Шарков, В.И. Количественный химический анализ растительного сырья / В.И. Шарков, Н.И. Куйбина, Ю.П. Соловьева, Т.А. Павлова. – М.: Лесная промышленность, 1976. – 72 с.

3. ГОСТ 31640-2012. Методы определения содержания сухого вещества. – М.: Стандартинформ, 2012. – 5 с.

4. Бриш, В.Н. Выбор универсальных средств измерения линейных размеров: учеб. пособие / В.Н. Бриш, А.Н. Сигов; ВоГТУ. – Вологда, 2008. – 64 с.

5. Ильина, Г.В. Биологические особенности видов ксилотрофных базидиомицетов лесостепи правобережного Поволжья insitu и exsitu / Г.В. Ильина, Ю.С. Лыков // Поволжский экологический журнал. – 2010. – № 3. – С. 263–273.

6. Мурадов П.З. Основы биоконверсии растительных субстратов / П.З. Мурадов. – Баку: Элм, 2005. – 114 с.

7. Shen, Q. Effects of nutrient supplements on biological efficiency, quality and crop cycle time of maitake («Grifola frondosa») / Q. Shen, D. Royse // Applied Microbiology and Biotechnology. – 2001. – №57. – P. 74–78.

8. Mayuzumi, Y. Gultivation Methods of Maitake (*«Grifola frondosa»*) / Y. Mayuzumi, T. Mizuno // Food Reviews International. – 2006. – № 13. – P. 357–364.

THE CULTIVATION OF *GRIFOLA FRONDOSA* ON A SUBSTRATE WITH BIRCH SAWDUST

D.V. Minakov*, K.V. Sevodina, V.P. Sevodin

Biysk Technological Institute (branch),
Altai State Technical University named after I.I. Polzunova,
27, Trophimova Str., Biysk, 659305, Russia

**e-mail: assassin0526@mail.ru*

Received: 05.11.2015
Accepted: 20.01.2016

The use of wastes of hardwood trees growing on the territory of Russia for the cultivation of mushroom *Grifola frondos*a (Dicks: Fr.) is an actual problem. The aim of the research was to study the possibility of using birch sawdust as a substrate for growing mushroom cultures *G. frondosa*. The article presents the dependence of the substrate overgrowing degree on the cultivation time (twenty four hours). In 17 days of cultivation, the most rapid substrate overgrowth with mycelium occurred in samples no. 1 and no. 5. The relatively slow substrate overgrowth was fixed in samples no. 2, no. 3 and no. 4 in 23 days of cultivation. It has been shown that the productivity of mushroom biomass is increased by the enrichment of the substrate with additional components. It has been proposed to allocate three stages of *G. frondosa* maturity – biological, technical and complete. It has been established that mainly the fruit bodies of the first wave achieve the stages of complete technical maturity, while the appearance and the linear dimensions of mushroom of the second wave correspond to the stage of technical and biological maturity. The total mushroom yield depending on the substrate mass was 26.8%. It has been found that *G. frondosa* mushroom can give up to five waves of fruit bodies. Depending on the fruiting wave the mushroom yield for the first wave is 60%, for the second – 25%, for the third – 6.2%, for the fourth – 5.7%, for

the fifth – 3.1%. The results obtained are of a practical value and contribute to the development of biotechnology and commodity science of the "Mushrooms" commodity group.

Grifola frondosa, cultivation, substrate, mycelium, fruiting body

References

1. Dudka I.A., Vasser S.P., Ellanskaya I.A. *Metody eksperimental'noy mikologii* [Methods of experimental mycology]. Kiev, Naukova dumka Publ., 1982. 550 p.

2. Sharkov V.I., Kuybina N.I., Solov'eva Yu.P., Pavlova T.A. *Kolichestvennyy khimicheskiy analiz rastitel'nogo syr'ya* [Quantitative chemical analysis of plant materials]. Moscow, Lesnaya promyshlennost' Publ., 1976. 72 p.

3. *GOST R 31640–2012. Metody opredeleniya soderzhaniya sukhogo veshchestva* [State Standard R 31640–2012. Methods for determination of dry matter]. Moscow, Standartinform Publ., 2012. 5 p.

4. Brish V.N., Sigov A.N. *Vybor universal'nykh sredstv izmereniya lineynykh razmerov* [Selecting a universal means of linear measurements]. Vologda, VoGTU Publ., 2008. 64 p.

5. Il'ina G.V., Lykov Yu.S. Biologicheskie osobennosti vidov ksilotrofnykh bazidiomitsetov lesostepi pravoberezhnogo Povolzh'ya insitu i exsitu [Biological features of kinds xylotrophic basidiomycetes forest right bank of the Volga insitu and exsitu]. *Povolzhskiy ekologicheskiy zhurnal* [Volga Journal of Ecology], 2010, no. 3. pp. 263–273.

6. Muradov P.Z. *Osnovy biokonversii rastitel'nykh substratov* [Fundamentals of bioconversion of plant substrates]. Baku, Elm Publ., 2005. 114 p.

7. Shen Q., Royse D. Effects of nutrient supplements on biological efficiency, quality and crop cycle time of maitake («Grifola frondosa»). *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2001, no. 57, pp. 74–78.

8. MayuzumiY., Mizuno T. Gultivation Methods of Maitake («*Grifola frondosa*»). *Food Reviews International*, 2006, no. 13, pp. 357–364.

Дополнительная информация / Additional Information

Минаков, Д.В. Культивирование *Grifola frondosa* на субстрате с березовыми опилками / Д.В. Минаков, К.В. Севодина, В.П. Севодин // Техника и технология пищевых производств. – 2016. – Т. 40. – № 1. – С. 39–45.

Minakov D.V., Sevodina K.V., Sevodin V.P. The cultivation of Grifola frondosa on a substrate with birch sawdust. *Food Processing: Techniques and Technology*, 2016, vol. 40, no. 1, pp. 39–45 (In Russ.).

Минаков Денис Викторович
аспирант кафедры «Биотехнология», Бийский технологический институт (филиал) ФГБОУ ВПО «Алтайский государственный технический университет им. И.И. Ползунова», 659305, Россия, г. Бийск, ул. Трофимова, 27, e-mail: assassin0526@mail.ru

Севодина Ксения Валерьевна
канд. техн. наук, доцент кафедры «Биотехнология», Бийский технологический институт (филиал) ФГБОУ ВПО «Алтайский государственный технический университет им. И.И. Ползунова», 659305, Россия, г. Бийск, ул. Трофимова, 27

Севодин Валерий Павлович
канд. хим. наук, профессор кафедры «Биотехнология», декан факультета «Химическая технология и машиностроение», Бийский технологический институт (филиал) ФГБОУ ВПО «Алтайский государственный технический университет им. И.И. Ползунова», 659305, Россия, г. Бийск, ул. Трофимова, 27

Denis V. Minakov
Graduate student of the Department of Biotechnology, Biysk Technological Institute (branch), Altai State Technical University named after I.I. Polzunova, 27, Trophimova Str., Biysk, 659305, Russia, e-mail: assassin0526@mail.ru

Ksenya V. Sevodina
Cand.Sci.(Eng.), Associate Professor of the Department of Biotechnology, Dean of the Faculty of Chemical Technology and Mechanical Engineering, Biysk Technological Institute (branch), Altai State Technical University named after I.I. Polzunova, 27, Trophimova Str., Biysk, 659305, Russia

Valeriy P. Sevodin
Cand.Sci.(Chem.), Professor of the Department of Biotechnology, Dean of the Faculty of Chemical Technology and Mechanical Engineering, Biysk Technological Institute (branch), Altai State Technical University named after I.I. Polzunova, 27, Trophimova Str., Biysk, 659305, Russia