

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
«Алтайский государственный технический университет им. И.И. Ползунова»
Бийский технологический институт (филиал)

На правах рукописи



Минаков Денис Викторович

ВЛИЯНИЕ ЭКОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ
БИОКОНВЕРСИИ РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ НА ВЫХОД БИОМАССЫ
ПЛОДОВЫХ ТЕЛ КСИЛОТРОФНЫХ БАЗИДИОМИЦЕТОВ

03.02.08 – Экология (биология)

Диссертация
на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель
доктор химических наук, профессор
Верещагин Александр Леонидович

Бийск – 2018

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	5
ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	13
1.1 Базидиальные грибы как средства переработки и утилизации лигноцеллюлозных отходов	13
1.2 Грибная индустрия	18
1.3 Методы культивирования мицелия и плодовых тел высших базидиомицетов	21
1.4 Таксонометрия, морфология и биологически активные соединения грибов <i>Armillaria mellea</i> , <i>Lentinula edodes</i> и <i>Grifola frondosa</i>	25
1.5 Влияние абиотических факторов на рост и развитие высших базидиомицетов	31
1.5.1 Температура	31
1.5.2 Влажность	32
1.5.3 Кислотность среды	33
1.5.4 Освещенность	35
1.5.5 Состав газовой среды	37
1.6 Влияние регуляторов роста на интенсификацию процессов развития грибов	38
ГЛАВА 2 ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ	42
2.1 Объекты исследований	42
2.2. Методы исследований	43
2.3 Методы анализа	46
ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ	48
3.1 Разработка методов интенсивного культивирования грибов	48
3.2 Влияние абиотических факторов на морфогенез культур грибов	49

3.3 Выбор лигноцеллюлозных компонентов субстрата для культивирования грибов	55
3.4 Получение посевного мицелия грибов на питательных средах различного состава.....	62
3.4.1 Динамика роста и накопления биомассы в поверхностной культуре	62
3.4.2 Динамика роста и накопления биомассы мицелия в глубинной культуре	65
3.5 Изучение влияния витаминов на рост и развитие мицелия грибов в условиях глубинного культивирования	70
3.6 Изучение влияния состава субстратов на время культивирования и выход плодовых тел грибов.....	77
3.7 Изучение влияния витаминов на выход грибов	88
3.8 Выделение хитозан-глюкановых комплексов из биомассы плодовых тел грибов	91
3.9 Физико-химические свойства образцов хитозан-глюкановых комплексов.....	93
3.10 Исследование сорбционной способности хитозан-глюкановых комплексов по извлечению ионов тяжелых металлов из водных растворов	95
ГЛАВА 4 ХИМИЧЕСКИЙ СОСТАВ БИОМАССЫ МИЦЕЛИЯ, ПЛОДОВЫХ ТЕЛ И ОТРАБОТАННЫХ СУБСТРАТОВ ПОСЛЕ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ГРИБОВ	101
4.1 Химический состав биомассы мицелия и плодовых тел	101
4.2 Химический состав и пищевая ценность продуктов биоконверсии субстратов.....	113
4.3 Использование продуктов биоконверсии в птицеводстве	118
4.4 Оценка экономической эффективности производства плодовых тел грибов	120
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	124

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	128
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	129
ПРИЛОЖЕНИЕ А Акт внедрения результатов диссертационной работы в ООО «Биотехнологии переработки облепихи»	151
ПРИЛОЖЕНИЕ Б Акт внедрения результатов диссертационной работы в учебный процесс Бийского технологического института (филиала) Алтайского государственного технического университета им. И.И. Ползунова	152
ПРИЛОЖЕНИЕ В Затраты на обустройство климатической камеры.....	153
ПРИЛОЖЕНИЕ Г ИК-спектры хитозан-глюкановых комплексов	156

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования. Загрязнение окружающей среды, обеднение лесных угодий, массовая вырубка лесов привели к тому, что население городов России все меньше использует дикорастущие съедобные грибы для пищевых целей. Кроме того, во всем мире в условиях быстрого роста численности населения проблема дефицита и качества белковых продуктов продолжает оставаться актуальной. Традиционное сельскохозяйственное производство белка в виде продукции растениеводства, животноводства и птицеводства не справляется с потребностями современного общества в полноценном питании. По данным ФАО/ВОЗ население многих стран в различной степени нуждается в дополнительных источниках белка. Недостаток белка в питании является одним из основных факторов снижения средней продолжительности жизни и крайне необходим детям для умственного и физического развития. Известно, что пищевая промышленность нуждается в новых функциональных и профилактических продуктах питания, в том числе из грибов, которые при регулярном применении могут оказывать оздоровительное действие на организм человека.

В настоящее время мировые объемы отходов производств сельского и лесного хозяйств составляют наибольшую группу ежегодно возобновляемого растительного сырья – 2,5 и 3,2 млрд. тонн, соответственно. В Российской Федерации эти показатели составляют около 773,0 млн. тонн для сельского хозяйства и 1167,0 млн. тонн для лесных угодий. Ежегодное накопление лигноцеллюлозных отходов в Алтайском крае составляет более 10 млн. тонн, в том числе опилки древесных пород, плодовые оболочки овса, пшеничная солома, лузга подсолнечника и др., которые уходят в отвалы или сжигаются, что приводит к загрязнению окружающей среды. Возможность их использования при получении продуктов на основе отходов перечисленных выше производств, с сохранением чистоты окружающей среды является актуальной задачей для Российской Федерации.

Среди альтернативных методов получения белка и биологически активных веществ особенно перспективными являются производство мицелия и плодовых тел ксилотрофных видов грибов, в условиях регулируемого микроклимата. В этих методах особое значение придается оптимизации условий культивирования с использованием абиотических факторов и эндогенных регуляторов роста.

В России широко применяют в пищу в основном шампиньоны (*Agaricus bisporus*) и вешенки (*Pleurotus ostreatus*), технологии выращивания которых постоянно совершенствуются. В то же время во многих странах мира проводятся активные исследования по культивированию тех видов грибов, которые широко использовались в народной медицине. Однако их культивирование осложняется дефицитом сырья и проблемами биобезопасности из-за аллергического действия спор грибов.

Среди активно культивируемых грибов к числу наиболее перспективных, безусловно, относят и лекарственные виды базидиомицетов, таких как шиитаке (*Lentinula edodes* (Berk.) Pegler) (мировое производство 700 тыс. в год) и мейтаке (*Grifola frondosa* (Dicks: Fr.) Gray) (125 тыс. тонн в год), сочетающие в себе высокую скорость роста, биологическую активность и отсутствие токсикантов, являясь сырьем для получения лекарственных препаратов. Культивирование этих видов грибов в промышленных масштабах осуществляется в основном в странах Юго-Восточной Азии, Европе и Америке на местном лигноцеллюлозном сырье (древесина бука, дуба, клена, рисовая шелуха, солома и др.). В настоящее время в России принципиальное значение приобретает культивирование опенка осеннего (*Armillaria mellea* (Vahl: Fr.) P. Kumm) в связи с его высокими органолептическими свойствами. Однако, промышленное производство опенка до настоящего времени во всем мире отсутствует.

Разработка технологичных методов производства вышеперечисленных видов грибов, с использованием лигноцеллюлозных отходов, приведет к повышению экологической и экономической целесообразности получения высококачественных продуктов для нужд пищевой, комбикормовой и фармацевтической промышленности в круглогодичном режиме.

Цель работы: Изучение влияния эколого-биохимических параметров биоконверсии растительного сырья на выход биомассы плодовых тел ксилотрофных базидиомицетов.

Задачи работы:

1. Изучить влияние витаминов и абиотических факторов на рост мицелия и плодовых тел грибов;
2. Определить кинетические и продукционные показатели накопления биомассы мицелия в поверхностных и глубинных условиях культивирования на средах регулируемого состава;
3. Разработать методы интенсивного культивирования грибов *A. mellea* D-13, *L. edodes* F-1000 и *G. frondosa* 2639 на лигноцеллюлозных отходах производств Алтайского края;
4. Выделить хитозан-глюкановые комплексы из биомассы плодовых тел грибов, проанализировать их физико-химические показатели и исследовать сорбционную способность по отношению к ионам тяжелых металлов;
5. Изучить химический состав биомассы мицелия, плодовых тел, мицелиально-субстратных комплексов грибов и исследовать возможность их применения в качестве продуктов питания и кормовых добавок для сельскохозяйственной птицы;
6. Определить экономическую эффективность организации нового производства плодовых тел грибов.

Научная новизна исследования. Впервые выявлены эколого-биохимические параметры роста и развития грибов *A. mellea* D-13, *L. edodes* F-1000 и *G. frondosa* 2639 и разработаны методы их интенсивного культивирования на лигноцеллюлозных отходах с использованием регуляторов роста.

На основании анализа химического состава установлено, что белки и липиды мицелия и плодовых тел грибов характеризуются высокой биологической ценностью, а отработанные субстраты показывают перспективность создания экологичных производств в сельском хозяйстве.

Впервые исследованы физико-химические показатели хитозан-глюкановых комплексов, выделенных из плодовых тел грибов и изучены закономерности сорбционного концентрирования ионов тяжелых металлов в зависимости от кислотности среды и природы кислоты.

Новизна технических решений подтверждается двумя патентами на изобретение (Патент РФ №2586483 «Питательная среда для глубинного культивирования мицелия *Armillaria mellea*», патент РФ №2595737 «Субстрат для выращивания грибов *Grifola frondosa*»).

Теоретическая и практическая значимость работы.

Полученные результаты дополняют имеющиеся знания об условиях культивирования грибов-ксилотрофов и методах интенсификации их роста, выделения из мицелия и плодовых тел биологически активных веществ, нашедших применение в медицине, биологии и сельском хозяйстве.

Разработанные методы интенсивного культивирования грибов *A. mellea* D-13, *L. edodes* F-1000 и *G. frondosa* 2639 с использованием лигноцеллюлозных отходов растительного сырья Алтайского края: опилки березы (*Betula pendula*), шелуха овса (*Avena sativa*), лузга подсолнечника (*Helianthus annuus*), солома и отруби пшеницы (*Triticum aestivum*), ветки облепихи (*Hippophae rhamnoides*), пивная дробина, позволяют определить эколого-биохимические параметры роста этих видов грибов и вносят вклад в развитие современных биотехнологий.

Определены физико-химические показатели хитозан-глюкановых комплексов, выделенных из плодовых тел грибов, которые соответствуют показателям пищевого хитозана (ТУ 9289-067-00472124). Полученные данные по сорбционной способности могут использоваться для разработки методик извлечения ионов Co^{2+} и Fe^{3+} из объектов сложного состава.

Культивируемые грибы, хитозан-глюкановые комплексы и отработанные субстраты перспективны для применения в пищевой, фармацевтической и комбикормовой отраслях, что представляет собой не только экономическую, но и экологическую значимость.

Методы интенсивного культивирования грибов *L. edodes* F-1000 и *G. frondosa* 2639 апробированы на ООО «Биотехнологии переработки облепихи» и рекомендованы для применения, как на предприятиях малого бизнеса, так и в личных подсобных хозяйствах.

Материалы диссертационного исследования используются в учебном процессе Бийского технологического института (филиала) Алтайского государственного технического университета им. И.И. Ползунова при проведении лабораторных работ по дисциплине «Промышленная биотехнология» для студентов, обучающихся на 2-4 курсах по направлению подготовки 19.03.01 Биотехнология (профиль Биотехнология) и 19.04.01 Биотехнология (магистерская программа «Химия и технология биологически активных веществ»).

Методология и методы диссертационного исследования. Методологической основой диссертации являются труды отечественных и зарубежных исследователей – работы по культивированию высших грибов, изучению влияния абиотических и биотических факторов на рост и развитие грибов, выделению из грибов биологически активных соединений и изучению их физико-химических свойств, изучению биохимического состава грибов, а также работы по практическому применению грибов в различных отраслях народного хозяйства. Работа выполнялась с использованием современных микробиологических, микологических, химических и физико-химических методов анализа (высокоэффективная жидкостная хроматография, рентгено-флуоресцентная спектроскопия, инфракрасная спектроскопия), приборов и оборудования.

Степень разработанности темы. Большой теоретический и практический вклад в развитие технологий интенсивного культивирования высших базидиальных грибов, изучение их биохимического состава и выделение из грибов биологически активных соединений сделан отечественными и зарубежными исследователями, такими как: В.И. Билай, А.С. Бухало, С.П. Вассер, И.А. Дудка, А.С. Бондарцева, И.Э. Цапалова, Н.В. Сабуров, Ю.Т. Жук, А.А. Ячевский, Р.Е. Stamets, Q.Y. Yang, Y. Li, R. Singer.

Однако до сих пор исследования, посвященные поискам и разработкам технологий интенсивного культивирования съедобных и лекарственных видов грибов, следует считать крайне актуальными и своевременными. Остается важным расширение ассортимента культивируемых грибов в Российской Федерации.

В связи с этим разработка высокотехнологичных и экологичных методов производства высших базидиомицетов с использованием лигноцеллюлозных отходов открывает перспективы для реализации их природного потенциала при получении продуктов для пищевой, фармацевтической и сельскохозяйственной промышленности.

Степень достоверности результатов исследований. Достоверность результатов диссертационного исследования обеспечивается применением современных микробиологических, микологических, химических и физико-химических методов анализа, выполненных на оборудовании с высоким классом точности и воспроизводимостью результатов.

Экспериментальные данные, выводы и рекомендации основаны на общепринятых теоретических закономерностях, не противоречат и согласуются с известными концепциями, апробированы и подтверждены в промышленных условиях.

Исследования проводились в четырехкратной повторности. Статистическую обработку экспериментальных данных осуществляли с использованием компьютерных программ Excel Microsoft Office, Statistica 8.0.

Внедрение результатов исследований. Методы интенсивного культивирования грибов *L. edodes* F-1000 и *G. frondosa* 2639 подтверждены актами внедрения, утвержденными директором ФГБОУ ВО Бийского технологического института (филиал) «Алтайский государственный технический университет им. И.И. Ползунова» и директором ООО «Биотехнологии переработки облепихи».

Положения, выносимые на защиту.

На защиту выносятся следующие результаты исследования:

1. Разработаны методы интенсивного культивирования грибов-ксилотрофов *A. mellea* D-13, *L. edodes* F-1000 и *G. frondosa* 2639 на отходах деревоперерабатывающей промышленности и сельскохозяйственного производства, позволяющие осуществлять экологически значимое и экономически эффективное производство продуктов питания и кормовых добавок.

2. Определены физико-химические показатели хитозан-глюкановых комплексов, выделенных из грибов, которые соответствуют свойствам пищевого хитозана (ТУ 9289-067-00472124). Установлены закономерности влияния кислотности среды и природы кислоты на сорбционную способность хитозан-глюкановых комплексов по отношению к ионам Co^{2+} и Fe^{3+} .

3. Изучен химический состав биомассы мицелия, плодовых тел и отработанных субстратов, обосновывающий их высокую пищевую и биологическую ценности. Показана возможность использования мицелия и плодовых тел грибов для обогащения белком и биологически активными веществами различных функциональных пищевых продуктов, а отработанных субстратов для получения кормовых добавок.

Личный вклад автора. Анализ научной литературы, формулировка цели и задач исследования проводились совместно с научным руководителем. Постановка проблемы, разработка основных положений диссертации, планирование экспериментов, выполнение исследований и обобщение их результатов выполнены автором самостоятельно.

Апробация работы. Основные положения и результаты диссертационной работы докладывались и обсуждались на XIII международной научно-практической конференции «Пища. Экология. Качество» (Красноярск, 2016), международной конференции «Ломоносовские чтения на Алтае: фундаментальные проблемы науки и образования» (Барнаул, 2017), X и XI Всероссийских научно-практических конференциях студентов, аспирантов и молодых ученых с международным участием «Технологии и оборудование химической, биотехнологической и пищевой промышленности» (Бийск, 2017, 2018).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 13 научных работ, в том числе 4 статьи в журналах, включенных в Перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук (из них 2 статьи в журнале, входящем в Agris), 1 статья в научном журнале, 6 статей в сборниках материалов международных и всероссийских с международным участием научных и научно-практических конференций; получено 2 патента.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, четырех глав, заключения, списка сокращений и условных обозначений, списка литературы и четырех приложений. Работа изложена на 156 страницах машинописного текста, содержит 43 таблицы (из них 3 таблицы в приложениях) и 43 рисунка (из них 2 рисунка в приложениях). Список литературы включает 200 библиографических ссылок (из них 62 на английском языке).

Благодарности. Автор выражает искреннюю благодарность научному руководителю доктору химических наук, профессору А.Л. Верещагину; заведующему лабораторией микологии Государственного научного центра вирусологии и биотехнологии «Вектор» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (п. Кольцово, Новосибирская область), доктору биологических наук, профессору Т.В. Тепляковой; заведующему лабораторией нанобиотехнологии и биоллюменесценции Института биофизики СО РАН (г. Красноярск), доктору биологических наук В.С. Бондарь и старшему научному сотруднику лаборатории управления биосинтезом фототрофов Института биофизики СО РАН (г. Красноярск), кандидату биологических наук Н.С. Мануковскому за поддержку и помощь при выполнении данной работы.

Отдельную признательность автор выражает своему первому научному руководителю профессору кафедры биотехнологии Бийского технологического института (филиала) Алтайского государственного технического университета им. И.И. Ползунова», кандидату химических наук, доценту В.П. Севодину за идею работы, а также за неоценимую всестороннюю помощь в проведении исследований и выполнении работы на всех ее этапах.

ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Базидиальные грибы как средства переработки и утилизации лигноцеллюлозных отходов

Древесные и травянистые растения являются основными источниками субстратов для культивирования высших базидиальных грибов. Алтайский край обладает огромными, ежегодно возобновляемыми видами лигноцеллюлозного сырья. Это в основном отходы деревоперерабатывающей промышленности и сельскохозяйственного производства, которые уходят в отвалы или сжигаются, что приводит к загрязнению окружающей среды. Все районы Алтайского края обладают своим спектром потенциально пригодного лигноцеллюлозного сырья. Наиболее распространенные и доступные ресурсы представлены в таблице 1.1.

Таблица 1.1 – Сырье для культивирования съедобных и лекарственных грибов, используемое в качестве субстрата

№	Источник сырья	Материал
1	Деревоперерабатывающая промышленность	Древесина лиственных пород деревьев: тополь, ольха, береза, осина, липа, вяз.
2	Сельскохозяйственное производство	Обрезь плодовых культур. Солома зерновых культур: пшеница, рожь, овес, ячмень, просо. Отходы переработки зерна: отруби, поллова, шелуха, жмых. Кукурузные кочерыжки, стебли, листья технических культур, многолетних, однолетних трав.
3	Парфюмерная и медицинская промышленности	Отходы экстракции эфирномасличных культур
4	Текстильная промышленность	Отходы переработки хлопка: очесы, орешек, угары, подметь, костра льна
5	Пивоваренное производство	Пивная дробина, солодовые ростки

Сырье, содержащее большое количество лигнина и целлюлозы и небольшое количество легкоусвояемых соединений углерода (крахмал, сахара) и азота (белки, аминокислоты), используется как основа субстрата. Это преимущественно

вегетативные части растений [77, 126]. Сырье, богатое легкоусвояемыми соединениями углерода и азота, и содержащее низкий уровень лигнина и целлюлозы, используют в качестве питательной белковой или белково-жировой добавки. Это, как правило, генеративные части растений [77, 125].

Культивирование базидиальных грибов на лигноцеллюлозном сырье гарантирует эффективную утилизацию отходов, загрязняющих окружающую среду. Применение в качестве сырья для культивирования съедобных грибов малоценных, местных, восполняемых ресурсов (отходов), позволяет получать ценный, белковый, деликатесный, пищевой продукт (грибы), а переработанный субстрат использовать как органическое удобрение для открытого и закрытого грунта (микоудобрение), как субстрат для вермикультуры (микосубстрат) или как питательную добавку в корма сельскохозяйственным животным (микокорм).

Наиболее перспективными продуцентами в процессах биоконверсии растительного сырья являются базидиальные грибы, относящиеся к экологической группе – ксилотрофы. Эти грибы используют в своем питании целлюлозу и лигнин, что дает возможность выращивать их на различных растительных субстратах, включая отходы деревоперерабатывающей промышленности и сельскохозяйственного производства.

Лигноцеллюлозное сырье состоит, преимущественно, из целлюлозы (30–50%), гемицеллюлоз (15–35 %) и лигнина (10–20 %), в меньших количествах содержит пектин, белки, экстрактивные вещества и золу [60].

Лигнин (*lignum* – древесина) – сложное полимерное аморфное соединение фенольного ряда (производное ароматических спиртов), нерастворимое в воде (рисунок 1.1).

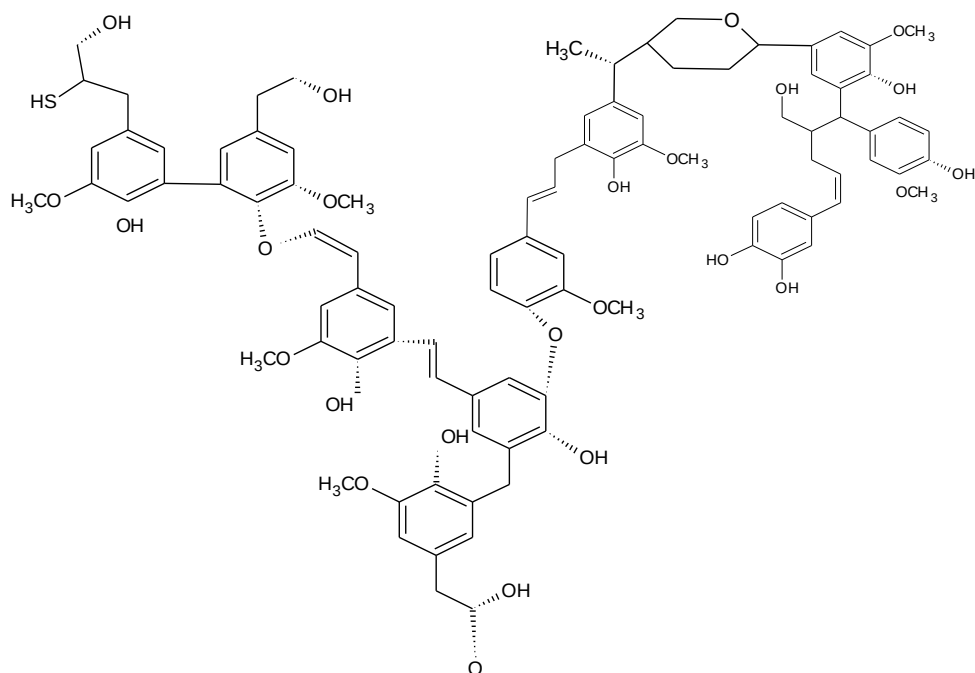


Рисунок 1.1 – Структурная формула лигнина

По распространенности среди полимеров древесных клеток он уступает только целлюлозе. Лигнин увеличивает твердость, повышает жесткость клеточной оболочки и содержится в клетках, выполняющих опорную функцию [13, 66]. Он расположен в микроцеллюлярных пространствах целлюлозы, а также на поверхности первичной целлюлозной клеточной стенки [4].

При воздействии лигнинразрушающих грибов (например *Panus tigrinus*, *Armillaria mellea*, *Lentinula edodes*, *Grifola frondosa*) на древесину, биодеструкция лигнина происходит постепенно. Если лигнин клеточной стенки не разрушен, то древесина принимает буроватую окраску. При разрушении лигнина грибами древесина превращается в белую гниль. Вероятно, что первичное воздействие при разложении лигнина выполняют экзоферменты. Как правило, грибы разрушающие лигнин, выделяют фенолоксидазы, поэтому полагают, что именно эти ферменты ответственны за отщепление ароматических соединений [4, 60, 69, 75].

Важную роль при проникновении гиф через клеточную оболочку играют микрофибриллы [105, 160]. Микрофибриллы, расположенные на поверхности гиф грибов ксилотрофов, представлены экстрацеллюлярными волокнами. Их длина

составляет несколько мкм, а толщина от 200 до 500 А. Микрофибриллы способствуют энзиматическому разложению клеточной оболочки, т. е. проникновению и распространению в нее ферментов. Рост гифов ксилотрофных грибов, как правило, наблюдается в полости клеток, а иногда и в пектиновом слое клеточных оболочек [200].

Изучая процесс биодеструкции лигнина ксилотрофными грибами, Куликова Н.А. и др. установили следующие закономерности: 1) на первых этапах происходит деметоксилирование и последующее гидроксилирование лигнина, что сопровождается увеличением количества гидроксильных групп и снижением метоксильных; 2) затем происходит разрыв связи α C- β C с окислением первого гидроксила до карбонильной группы; 3) в дальнейшем наблюдается разрыв ароматического кольца в структуре лигнина [57].

Способность базидиальных грибов разрушать лигнин в настоящее время стала предметом широких исследований в биотехнологии.

Целлюлоза является химически гомогенным полимерным углеводом, структурной единицей которого являются остатки β -D-глюкозы (рисунок 1.2).

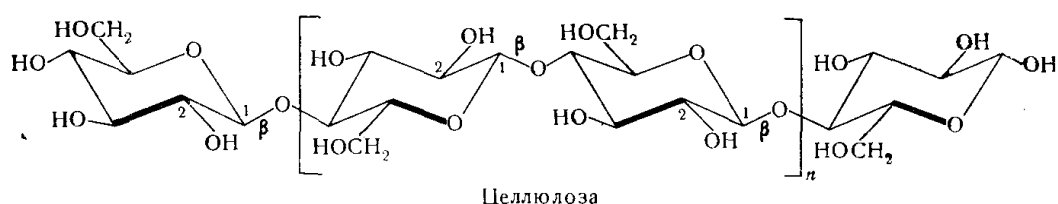


Рисунок 1.2 – Структурная формула целлюлозы

Свойства полимеров частично зависят от типа связи между мономерами; каркасом служат неразветвленные или слабоветвленные цепочки, а другие компоненты – укрепляющими наполнителями клеточной стенки [165]. Целлобиоза – промежуточный продукт инверсии целлюлозы [57, 105, 112]. Особенностью исходного состояния целлюлозы служит то, что в состав клеточной стенки растений входят волокна целлюлозы, состоящие в комплексе с другими полисахаридами (гемицеллюлозой, пектином), лигнином, разнообразными растворимыми веществами органической и минеральной природы, а также водой [103, 105, 194].

Целлюлозоразрушающие грибы или грибы, вызывающие бурую гниль, подвергают деструкции только целлюлозу. Древесина изменяет цвет от красноватой до ржаво-красной и, в конечном итоге, становится темно-бурой от освобожденного лигнина, хрупкой, легко крошится и ломается, заметно теряет в объеме и массе, нередко призматически трескается.

Некоторые грибы, воздействуют одновременно как на лигнин, так и на целлюлозу: вешенка (*Pleurotus ostreatus*), трутовик лакированный (*Ganoderma lucidum*), опенок осенний (*Armillaria mellea*).

Такие грибы, как *Armillaria mellea*, способны заражать древесину, в которой находятся еще живые клетки растительной ткани, содержащие необходимый объем запасных веществ [4, 61]. С помощью экзоферментов грибы переводят субстрат из нерастворимой формы в растворимую. Также грибам доступны продукты энзиматического расщепления древесины, которые являются для них источником энергии и питания [61].

Таким образом, древесина является естественным окружением для грибов ксилотрофов, которая выполняет несколько существенных функций. Во-первых, древесина выступает в качестве структурной матрицы для роста грибов. Во-вторых, организмы, произрастающие на древесине, потребляют целлюлозу, лигнин и другие полисахариды как источник питания, разрушая их до легкоусвояемых сахаров с использованием ферментов.

На сегодняшний день в Российской Федерации оптимальные методы культивирования грибов являются малоизученными. Основная причина заключается в том, что грибоводство в России длительное время не развивалось, было сведено к положению побочного (второстепенного) и не рассматривалось как самостоятельная отрасль сельского хозяйства. В связи с этим, в области промышленного производства грибов и его материально-технического обеспечения в России имеются значительные отставания. Поэтому разработка методов интенсивного культивирования ксилотрофных видов грибов с применением различных активно воздействующих абиотических и биотических факторов роста (максимально приближенных к природным), приведет к

интенсификации процессов развития мицелия и плодовых тел, что, в свою очередь, позволит получать дополнительные продукты для пищевых, фармацевтических и сельскохозяйственных целей.

1.2 Грибная индустрия

Потребность в грибах постоянно растет. В связи с этим появилась необходимость перехода искусственного выращивания съедобных грибов на промышленную основу. Производство грибов, независимо от климатических условий, осуществляется круглый год. В условиях современных грибоводческих комплексов с интенсивной технологией и оборудованием урожай грибов может достигать 2,5 тыс. тонн в год [82]. На рисунке 1.3 показана схема получения биомассы грибов и их продуктов.

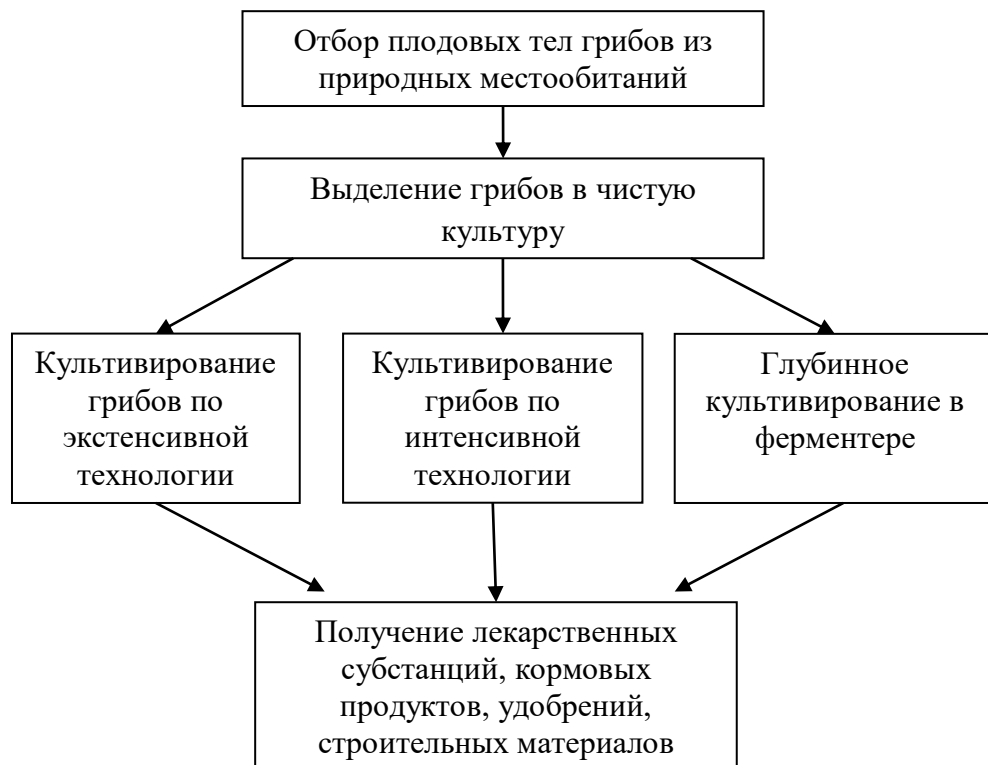


Рисунок 1.3 – Схема получения биомассы грибов и их продуктов

В настоящее время используют около 40 видов грибов, из которых в промышленном масштабе выращивают 10–12 видов – около 5 млн. т/год. Среднедушевое потребление культивируемых грибов в экономически развитых

странах (Франция, Германия, Япония, Голландия, США) составляет от 2 до 4,5 кг. В РФ этот показатель составляет менее 1 кг на человека [9].

По объемам производства первое место в мире среди культивируемых грибов занимает шампиньон (*Agaricus bisporus*) – 37,6 %, за ним следуют шиитаке (*Lentinula edodes*) – 16,8 %, вешенка (*Pleurotus ostreatus*) – 16,2 %, иудино ухо (*Auricularia auricula*) – 8,6 %, опенок зимний (*Flammulina velutipes*) – 4,7 % и снежный гриб (*Tremella fuciformis*) – 3,2 %. На остальные грибы – гриб-баран (*Grifola frondosa*), навозник белый лохматый (*Coprinus comatus*), опенок летний (*Kuehneromyces mutabilis*), буковый гриб (*Hygrophorus leucophaeus*), кольцевик (*Stropharia rugoso-annulata*) приходится около 7 %. В странах Юго-восточной Азии преобладает производство шиитаке (Япония) и вешенки (Тайланд, Китай). Их искусственное выращивание достигает 260 тыс. тонн в год. В Индонезии и Бирме культивируют травяной шампиньон (*Volvariella volvacea*), а в Корее и на Тайване в искусственных условиях выращивают зимний опенок (*Flammulina velutipes*). В странах Северной Америки и Европы первенство принадлежит шампиньонам [82].

Наибольшее распространение среди культивируемых грибов в России получили шампиньоны и вешенки, производство которых, в основном сосредоточено в окрестностях г. Москвы и г. Санкт-Петербурга. К наиболее крупным хозяйствам по культивированию этих видов грибов относятся: АЗОТ «Заречье» им. Кушнарева (г. Одинцово), «Орикс Групп» (Самарская область), «Агротехмаркет «Подмосковье»» (Московская область), «Агрокомбинат «Здоровое питание»» (г. Воронеж), «Полонис Групп» (г. Санкт-Петербург), «Грибная радуга» (Курская область), «Воронежская фруктовая компания» (г. Воронеж), «Агропром-МДТ» (г. Москва, г. Липецк), «Агро-Регион» (Московская область), «Шампиньоны Татарстана» (Республика Татарстан).

Из экзотических видов грибов вышеперечисленные производители выращивают только *Flammulina velutipes* и *Lentinula edodes*, доля в общем объеме производства которых, составляет всего лишь 0,45 и 0,03 %, соответственно (таблица 1.2). Это связано с тем, что в РФ только сейчас проявляют интерес к

выращиванию этих видов грибов в промышленных объемах.

Таблица 1.2 – Производство грибов в РФ за 2016 г. [94]

№	Культуры грибов	Производство, тонн в год	Доля в общем объеме производства, %
1	<i>Agaricus bisporus</i>	10283	71,91
2	<i>Pleurotus ostreatus</i>	3949	27,62
3	<i>Flammulina velutipes</i>	64	0,45
4	<i>Lentinula edodes</i>	4	0,03
5	Всего	14300	

Для стран Юго-Восточной Азии опенок зимний и шиитакэ входят в повседневный рацион питания, в то время как для жителей США, Канады (начало выращивания 70 лет назад) и для жителей Европы (10–15 лет назад) эти грибы являются экзотикой.

Развитие промышленного культивирования съедобных грибов вызвано несколькими факторами:

- возможность производства грибов круглый год;
- высокая урожайность (до 33 кг с 1 м²);
- для культивирования съедобных грибов используются отходы сельского хозяйства и деревообрабатывающей промышленности, то есть решается проблема вовлечения в производство отходов;
- технологию культивирования грибов можно полностью механизировать;
- субстраты после сбора грибов можно использовать в качестве удобрения или белковой добавки на корм скоту;
- грибы являются источником белка, биологически активных веществ, микроэлементов [122].

В настоящее время на мировом рынке широко используются несколько типов продуктов из грибов в форме: сушеных биомассы мицелия и плодовых тел в виде таблеток или капсул; порошка культивируемых грибов; концентратов и их смесей; сушеных комбинированных препаратов из субстратной грибницы; спиртовых и водных экстрактов биомассы мицелия и плодовых тел [43].

Однако на Российском рынке грибов выделяют всего четыре сегмента: свежие, консервированные, замороженные и сушеные грибы (рисунок 1.4) [43].

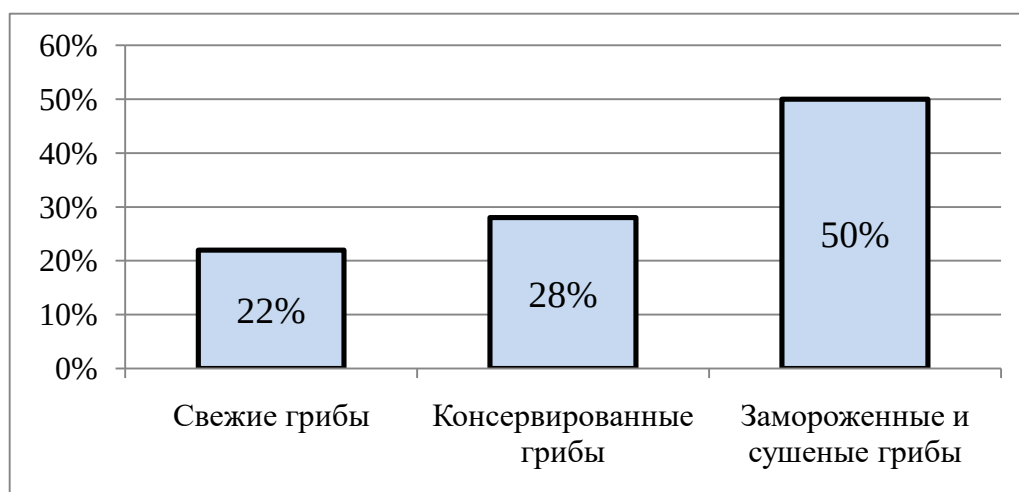


Рисунок 1.4 – Структура российского рынка грибов, % [30]

Из данных рисунка 1.4 видно, что основную часть рынка занимают замороженные и сушеные грибы. Это связано с тем, что в России традиционным является сбор и употребление в пищу лесных грибов. При этом наиболее простыми и распространенными способами хранения грибов у населения являются – заморозка и высушивание. К сожалению, использование в пищу дикорастущих грибов в некоторых районах стало снижаться, в связи с ограниченностью природных ресурсов и серьезным ухудшением экологической среды. Из-за своей способности адсорбировать токсины и тяжелые металлы, грибы могут вызывать пищевые отравления. В противовес этой проблеме промышленное грибоводство способно принести стабильное производство экологически чистого белкового продукта. Наиболее перспективными методами получения таких продуктов является твердофазное и глубинное культивирование.

1.3 Методы культивирования мицелия и плодовых тел высших базидиомицетов

Грибы, обладающие активными полиферментными системами, составляют важное звено биологического разложения органического вещества в природе

[104]. Поэтому применение грибов, как биологических агентов в биоконверсии отходов производств (отходы сельскохозяйственного производства и деревоперерабатывающей промышленности), должно решать проблему безотходных технологий и предусматривать изучение биотехнологических и медико-биологических проблем [31, 104]. В связи с этим многообещающим биотехнологическим процессом может стать твердофазная ферментация растительных ресурсов.

Твердофазное культивирование – это биотехнологический процесс, который протекает в массе измельченного и влажного твердого субстрата, имеющего различную форму и размеры частиц. Этот метод культивирования предназначен для биоконверсии растительного сырья в более ценные продукты, такие как: плодовые тела, кормовые добавки, вторичные ферменты и метаболиты [179,].

Последовательность технологических операций при получении плодовых тел грибов этим методом определяется биологией культивируемых видов. В целом их можно разбить на 6 основных этапов [31]:

- приготовление субстрата (измельчение, увлажнение, термообработка);
- инокуляция (внесение мицелия в субстрат);
- инкубация (заращение субстрата мицелием);
- инициация плодообразования;
- плодообразование;
- плодоношение.

Различные варианты технологий получения плодовых тел грибов различаются качественным составом субстрата и способом его приготовления.

В субстрате должны содержаться все доступные питательные вещества для роста грибов: крахмал, целлюлоза, сахара в качестве источников углерода; мочевины, белки как источник азота, а также минеральные вещества. По своим физическим свойствам субстрат может быть практически нерастворимым в воде, набухать в ней, принимать гелеобразное состояние или даже частично растворяться [31, 186].

На сегодняшний день существует два основных способа приготовления

субстрата: аэробная ферментация и стерилизация субстрата. Другие известные технологии производства грибов занимают промежуточное положение между вышеперечисленными способами [119].

Способность культивируемых грибов подавлять рост конкурирующих микроорганизмов является основой успешного применения нестерильной технологии. Как правило, это требует высоких доз внесения посевного мицелия (выше 5,0 % от массы готового субстрата), но при культивировании *Lentinula edodes* и других экзотических видов грибов это ненадежно и экономически невыгодно [8].

Впервые стерилизация субстрата была использована при интенсивном культивировании *Pleurotus ostreatus*. В 1960–1970 годах на стерильных субстратах начали выращивать многие другие виды грибов ксилотрофов. Культивирование грибов по стерильной технологии приводит к значительному увеличению урожайности за счет повышения доступности субстрата из-за частичного гидролиза его составляющих компонентов при термообработке. При этом доза расхода посевного мицелия уменьшается в 3–5 раз [8, 31].

Твердофазное культивирование имеет свои преимущества по сравнению с глубинным, которые связаны с малым потреблением энергии (из-за отсутствия механического перемешивания и аэрации) и материалов (для получения грибов используются отходы сельскохозяйственного производства и деревоперерабатывающей промышленности). Кроме того, полученные плодовые тела по сравнению с мицелием имеют лучший товарный вид и органолептические свойства [186].

В то же время твердофазное культивирование имеет свои недостатки – длительное время культивирования, затрудненный контроль параметров ферментации (температура, pH, аэрация), отсутствие аэрации из-за высокой концентрации твердых частиц. Помимо этого, повышение температуры в результате выделения мицелием метаболического тепла может приводить к комкованию субстрата в нижних слоях и снижению влажности в верхних слоях, что замедляет рост грибов [107, 186].

Изучение вопросов твердофазной ферментации и устранение ее недостатков позволит повысить качественные и количественные характеристики грибов, а также значительно снизит себестоимость готовой продукции.

В настоящее время для получения лекарственных препаратов из биомассы базидиомицетов все большее развитие получают методы глубинного культивирования грибов [124].

Перспектива получения лечебно-профилактических препаратов с применением глубинного мицелия основывается на научных исследованиях, которые показали, что в глубинном мицелии, как и в плодовых телах, имеются важные биологически активные вещества (БАВ).

При глубинном культивировании мицелий растет в толще аэрируемой питательной среды и имеет одинаковые условия. Непрерывная аэрация и механическое перемешивание среды способствуют накоплению продуктов обмена и быстрому росту мицелия. В динамических условиях культивирования скорость диффузии и распространение кислорода выше, чем в стационарных. Поэтому увеличивается количество получаемого продукта и сокращается время ферментации [98].

На синтез БАВ у грибов в глубинной культуре могут влиять разные факторы. Опыты с некоторыми штаммами *Lentinula edodes* показали, что грибы образуют в мицелии не только гликополимеры, но и меланины, которые синтезируются на свету. Установлена закономерность – с увеличением в мицелии пигментов растет и количество эндогликопротеинов [177].

Глубинное культивирование, в отличие от твердофазного, требует больших энергетических затрат на перемешивание питательной среды и ее аэрацию. Однако процессом глубинного культивирования можно легко управлять с помощью on-line датчиков, в связи с функционированием его как однородной системы.

Получение биомассы мицелия методом глубинного культивирования обладает рядом преимуществ перед твердофазной ферментацией: позволяет регулировать состав комплекса биологически активных веществ, сократить

длительность процесса в 8–10 раз, осуществлять направленный синтез целевых метаболитов, легче контролировать параметры культивирования (температура, pH среды, перемешивание, растворенный кислород) [7, 191]. При этом пищевая ценность мицелия базидиомицетов, выращенных в глубинных условиях, по содержанию в нем белка, незаменимых аминокислот и витаминов сопоставима с плодовыми телами [117].

Глубинное культивирование ксилотрофных грибов привлекает внимание, как перспективный метод производства белка. Успех этого метода в коммерческих масштабах основывается на развитии новых производственных систем и увеличении выхода биомассы, которые решают проблемы, связанные с технологией выращивания грибов.

Таким образом, несмотря на усилия многочисленных исследователей, инженерные и физиологические аспекты твердофазного и глубинного культивирования направленные на производство пищевых продуктов, лекарственных препаратов и биологически активных добавок требуют дальнейшего изучения.

1.4 Таксонометрия, морфология и биологически активные соединения грибов *Armillaria mellea*, *Lentinula edodes* и *Grifola frondosa*

Современное представление по систематическому положению грибов и принципам таксономии.

Систематика грибов является морфологической и построена на основании цитологических и фенотипических признаков. Основные из них: консистенция и тип плодового тела, тип гименофора, строение и способ образования базидий, наличие или отсутствие пряжки на дикариотическом мицелии, строение гимения, орнаментация оболочки споры и ее химический состав, наличие перфораций в парентосоме [33, 93]. В таблице 1.3 представлено систематическое положение грибов *Armillaria mellea*, *Lentinula edodes* и *Grifola frondosa*.

Таблица 1.3 – Систематическое положение грибов *A. mellea*, *L. edodes* и *G. frondosa* [124, 28]

Научная классификация	Культура гриба		
Надцарство	<i>Eukaryota</i>	<i>Eukaryota</i>	<i>Eukaryota</i>
Царство	<i>Mycota</i>	<i>Mycota</i>	<i>Mycota</i>
Отдел	<i>Basidiomycota</i>	<i>Basidiomycota</i>	<i>Basidiomycota</i>
Класс	<i>Basidiomycetes</i>	<i>Agaricomycetes</i>	<i>Agaricomycetes</i>
Порядок	<i>Agaricales</i>	<i>Agaricales</i>	<i>Polyporales</i>
Семейство	<i>Physalacriaceae</i>	<i>Omphalotaceae</i>	<i>Meripilaceae</i>
Род	<i>Armillaria</i>	<i>Lentinula</i>	<i>Grifola</i>
Вид	<i>Armillaria mellea</i>	<i>Lentinula edodes</i>	<i>Grifola frondosa</i>

По структуре и составу клеточной стенкой грибы отличаются от животных и растений. Клеточная стенка грибов в основном образована полисахаридом – хитином, который также входит в состав наружного скелета членистоногих, т.е. ракообразных, паукообразных и насекомых [33, 90, 91]. Это вещество более устойчиво к микробному разложению, в отличие от целлюлозы. В таблице 1.4 представлены характеристики грибов *A. mellea*, *L. edodes* и *G. frondosa*, а также происхождение штаммов – продуцентов, используемых нами в настоящей работе.

Таблица 1.4 – Морфологические признаки грибов

<i>A. mellea</i>	<i>L. edodes</i>	<i>G. frondosa</i>
1	2	3
 Плодовое тело состоит из шляпки и ножки. Шляпка диаметром 3–15 см, выпуклая с загнутым краем [89, 91]. Окраска от оливково-коричневой [89, 195] до желтой, бледно-светло-	 Плодовое тело <i>Lentinula edodes</i> имеет ступенчатую пигментацию [98]. Шляпка 5–12 см в диаметре, полушаровидная, с возрастом становится	 Гриб представляет собой массу разветвленных шляпок, выходящих из общего клубня [124]. Вес отдельных экземпляров грибов может достигать 10 кг

Окончание таблицы 1.4

<i>A. mellea</i>	<i>L. edodes</i>	<i>G. frondosa</i>
1	2	3
коричневой, с оливковым оттенком волокнисто-шерстистых чешуек [54, 74]. Чешуйки мелкие, с возрастом становятся коричневыми [161]. Ножка 6–15 см, тонкая, цилиндрическая, несколько утолщающаяся к основанию [84, 89]. Почти одноцветная со шляпкой. Кольцо толстое, войлочное, прочное, шерстистое желтовато-соломенного цвета [89]. Пластинки белые, с возрастом становящиеся пятнисто-коричневыми. Мякоть белая, плотная, с ярко выраженным приятным грибным запахом. Споры эллипсоидальные 7,0–9,5×5,0–6,0 мкм. Базидии без пряжек [74, 89]. Штамм <i>A. mellea</i> D-13 получен путем выделения из плодовых тел, собранных с пней березы повислой (<i>Betula pendula</i>) в естественных местообитаниях Алтайского края.	распростертой. Поверхность шляпки гладкая, светло-коричневая, густо покрыта беловатыми волокнистыми чешуйками (остатками покрывала) [27, 72]. Мякоть толстая, белая, плотная, с выраженным приятным грибным запахом. Ножка 3–10 см, центральная, плотная, белая, нередко изогнутая, часто покрыта небольшими волокнистыми чешуйками ниже кольца [181]. Кольцо узкое, быстро исчезающее [124]. Гименофор пластинчатый. Пластинки белого цвета. Размер спор 4,5–6,5×3,0–3,5 мкм, прозрачные, гладкие, яйцевидно-эллипсоидные [124, 197]. Штамм <i>L. edodes</i> F-1000 получен путем выделения из коммерческого мицелия	[72]. Плодовое тело диаметром 10–30 см, кустисто-листовидное, шаровидное или овальное по форме [55, 187]. Шляпка различных оттенков серого цвета, тонкая, волнистая или скрученная по краям, в виде полуокруглых лопастей, клинообразно суживающихся к основанию и переходящих в плотную белую ножку [187]. Пластинки белые, сероватые или кремовые, далеко нисходящие на ножку. Мякоть белая, плотная, упругая, с сильным и очень острым грибным запахом [124]. Штамм <i>G. frondosa</i> 2639 получен путем выделения из коммерческого мицелия.

Основные экологические группы грибов.

По образу жизни различают две группы грибов: сапробионты и биотрофы. Сапробионты (сапротрофы) – получают необходимые для них соединения углерода из органических остатков, в то время как биотрофы (паразиты и симбионты) – используют в качестве хозяев или партнеров животных, растения, водоросли, бактерии, простейших или другие грибы [131]. Шиитаке и мейтаке относятся к первой группе – сапротрофы, тогда как опенок осенний можно отнести к переходному типу – сапротроф и паразит [124].

Осимбиотический тип питания грибов, который не встречается в других группах организмов, обусловлен быстрым ростом и нитчатым строением грибов. Такой тесный контакт связан с метаболической активностью грибов за счет отсутствия слоев отмерших клеток как у растений. Выделяемые грибами ферменты и другие вещества мгновенно воздействуют на их окружение, что является благоприятным для их жизни [173].

Биологически активные соединения грибов A. mellea, L. edodes и G. frondosa.

В традиционной китайской медицине экстракты из плодовых тел *A. mellea* используются для лечения неврологических заболеваний организма, включая синдром Меньера, эпилепсию, невралгию, судороги и гипертонию [176]. Грибы вида *A. mellea* содержат высокий уровень полисахаридов, обладающих иммуномодулирующей активностью [177].

Исследования показали присутствие в плодовых телах *A. mellea* протокатехина, п-гидроксибензойной, п-кумариновой, феруловой, синапсовой, ванильной и коричной кислот. Эти кислоты обладают противовоспалительными, антиоксидантными, антиканцерогенными свойствами [143].

Несколько антибиотиков были выделены из *A. mellea*. Наиболее ценный из них Armillaridin, проявляющий сильное действие против грамположительных бактерий, таких как *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, а также грибов рода *Candida* [176].

Грибы вида *L. edodes* содержат различные биоактивные компоненты (полисахариды, терпеноиды, фенолы, стероиды, гликопротеиды), витамины

(витамин С, рибофлавин, тиамин и др.) [146]. По данным Александровой Е.А. при экстрагировании белков водой выявлено 27 белковых компонентов, тогда как буфером Трис-НСl – 34 белковых единицы [98].

Согласно авторам Ветчинкина Е.П. и Никитина В.Е. [27], компонентный состав белков штамма *Lentinula edodes* F-249, полученных при экстракции в каждой стадии развития гриба, значительно различается. Наибольшее количество белков легкорастворимой фракции характерно для примордиев и плодовых тел, тогда как наименьшее их количество обнаружено в стадии непигментированного мицелия.

Грибы *L. edodes* являются перспективными продуцентами липидов. В настоящее время разработаны способы глубинного культивирования, позволяющие получать биомассу грибов, содержащую до 42 % липидов. Водные экстракты такого мицелия показали на модели *in vitro* с подкожно привитым Т-лимфолейкозом Р388 торможение роста опухоли на 60–80 % [73]. Помимо этого, α -глюканы выделенные из некоторых штаммов *L. edodes*, повышают сопротивляемость организма к бактериальным инфекциям [162], а также к вирусам гриппа. Исследования ряда авторов также показали, что полисахариды *L. edodes* стимулируют иммунную систему человека [106, 185], снижают способность тромбоцитов в крови к агрегации, обладают антибактериальными, антивирусными и противовоспалительными свойствами [175]. Показано, что экстракты из мицелия шиитакэ способны ингибировать вирус иммунодефицита человека [199].

Грибы вида *G. frondosa* содержат полисахариды, обладающие сильным противоопухолевым действием, которые в основном представлены разветвленными β -(1 $\rightarrow$ 3)-D-глюканами [139]. Из мицелиального экстракта глубинной культуры *G. frondosa* были идентифицированы β -1,3- и β -1,6-глюканы различающиеся биологической активностью в концентрации 0,01–0,2 % и молекулярной массой (470–1650 kDa) [170]. Позднее из *G. frondosa* был выделен полисахарид грифолан, который является разветвленным (1,3)- β -глюканом [172].

С поверхности дикариотического мицелия грифолы курчавой выделен лектин с молекулярной массой 68 ± 1 kDa, представляющий собой гидрофильный гликопротеин с соотношением частей протеин: гликан как 1:3 [120].

В грифоле курчавой обнаружены вещества, обладающие противовирусным действием в отношении хронического гепатита В и вируса иммунодефицита человека (ВИЧ) [198]. Исследования показали, что *G. frondosa* повышает общий иммунитет и уменьшает уровень глюкозы в крови 25 % больных сахарным диабетом 2 типа, устойчивых к инсулину. Кроме того, этот гриб эффективен при заболеваниях рака печени, простаты, прямой кишки, груди и легких [157].

Выделение эффективных штаммов и сохранение генофонда полезных для человека базидиальных грибов имеет большое значение для их успешного применения при производстве лекарственных препаратов. Выделение в чистую культуру и депонирование штаммов грибов – продуцентов биологически активных соединений в коллекциях дает возможности их сохранения в стабильно активном состоянии за счет создания оптимальных условий поддержания культур грибов в коллекциях. В монографии Бухало А.С. (1988) обобщены данные с 1877 года о биологии и морфологии высших базидиомицетов в чистой культуре, представлены методы выделения, критерии идентификации, закономерности роста. Важным условием для получения эффективных продуктов биотехнологии является поиск активных штаммов базидиальных грибов в природных местообитаниях.

Лесные экосистемы Алтайского края богаты лекарственными видами грибов [29, 124]. Однако выделение базидиальных грибов в культуру научными учреждениями, расположенными в данном регионе, не проводилось. Алтайский край представляет собой регион, входящий в биосферно-значимую экосистему России, здесь произрастают уникальные виды грибов. Это позволяет проводить поиск и выделение штаммов базидиомицетов перспективных для применения в медицинских целях.

1.5 Влияние абиотических факторов на рост и развитие высших базидиомицетов

1.5.1 Температура

На рост мицелия и плодовых тел базидиальных грибов существенное влияние оказывают абиотические факторы такие как: температура, влажность, кислотность среды, освещенность, газовый состав среды.

В настоящее время недостаточно изучен вопрос зависимости морфогенеза и роста культур высших базидиальных грибов от температурного фактора. Для большинства видов съедобных базидиомицетов такие данные вообще отсутствуют. Также остается нерешенным вопрос о возможности использования температурного критерия в качестве таксономического признака [155].

Требования базидиомицетов к температуре на разных этапах развития определяются биологическими особенностями вида и штамма. Оптимальная температура для роста мицелия, как правило, не совпадает с температурой, необходимой для плодоношения [163]. При высоких температурах грибы погибают, тогда как холод менее опасен. Большинство грибов прекращают свою жизнедеятельность при 0°C, но их можно еще долго сохранять живыми [150]. Температурный оптимум для опенка осеннего (*A. mellea*), шиитаке (*L. edodes*) и мейтаке (*G. frondosa*) чаще всего находится в пределах 23–30°C. При этом, образование примордиев происходит при температуре 16–21 °C, тогда как формирование плодовых тел – 15–18 °C [47, 108, 193]. Отсутствие роста грибов при определенной температуре объясняется неспособностью организмов синтезировать необходимые витамины или аминокислоты. Выше 35 °C и ниже 5 °C, рост базидиальных грибов останавливается. При более высоких температурах, около 45 °C, культуры грибов погибают через 40 минут [154, 159].

На сегодняшний день нет единого мнения по поводу разделения грибов на группы в зависимости от их отношения к температуре. Пока неясны различия между психро- и термотолерантными, термотолерантными и термофильными,

мезофильными, психрофильными и психротолерантными видами, так как температурные границы роста у них точно не установлены [159].

В отдельных случаях при выделении таксона температурный критерий может быть решающим. Так, основываясь на существенном отличии *Pleurotus florida* и *P. osteratus* по верхней температурной границе роста, *P. florida* считается самостоятельным видом, хотя данные о половой совместимости этих видов позволяют рассматривать *P. florida* как форму *P. osteratus*. При этом исследователи ссылаются на теорию микроэволюции, согласно которой возникновение новых видов может происходить путем появления в популяции изолированных форм, отличающихся от исходных физиологическими свойствами. В то же время они сохраняют половую совместимость и близки по морфологическим признакам [145, 177].

Таким образом, можно сделать заключение, что температурный фактор может учитываться как дополнительный таксономический признак при идентификации культур высших базидиальных грибов на видовом уровне. При этом наиболее значимы отличия в росте, наблюдающиеся при минимальных и максимальных температурах.

1.5.2 Влажность

Большинство грибов требует для своего развития достаточно высокой влажности воздуха и субстрата. Многие высшие съедобные базидиомицеты хорошо развиваются и плодоносят при влажности выше 60% и особенно при 80–85 % [159].

Степень влажности, необходимая для роста базидиомицетов, сильно колеблется в зависимости от вида. Грибы *Armillaria mellea*, *Lentinula edodes* и *Grifola frondosa* чаще всего развиваются на древесине, имеющей относительную влажность не более 60 % [124]. При более высоком содержании влаги грибы страдают от недостатка кислорода. При недостаточной влажности они не могут нормально развиваться, теряется упругость клеток, пропорции между ножкой и шляпкой нарушаются. Известно, что при интенсивном культивировании

оптимальное содержание влажности компонентов субстратов находится в пределах 55–70 % [180]. Уровень влажности субстратов обусловлен их размером частиц и количеством воды, которое будет потеряно в период инкубации. Рост мицелия приостанавливается, если уровень влажности становится ниже 40 %. Если содержание влажности 50 % – рост возобновляется, мицелий становится ярко белого цвета и нормальной плотности. Относительная влажность воздуха во время формирования примордиев базидиальных грибов должна быть 95–100 %, а во время формирования плодовых тел – 60–75 % [88, 180].

1.5.3 Кислотность среды

Одним из важнейших факторов, регулирующих метаболизм и рост высших базидиальных грибов в культуре, является рН питательной среды. Для большинства грибов оптимальные значения рН находятся в пределах 5–6, хотя многие из них способны расти при значительных изменениях показателей кислотности [153]. Существует мнение, что у микоризообразователей благоприятными для роста являются кислые значения рН среды, в то время как при нейтральных и щелочных значениях наблюдается слабое развитие. Грибы, принадлежащие к одной и той же систематической или экологической категории, могут существенно отличаться по отношению к исходному рН среды, изменяя его в благоприятную или неблагоприятную для роста сторону. Это зависит как от физиологических особенностей гриба, так и от состава питательной среды [159].

Существуют виды, обладающие способностью разрушать целлюлозу и регулировать кислотность среды до более низких значений рН по сравнению с лигниноразрушающими грибами. При этом штаммы одного и того же вида, выделенные из разных местообитаний, различаются по отношению к рН среды [6].

Концентрация водородных ионов в среде оказывает существенное влияние на характер метаболических процессов. В связи с этим представляется необходимым предварительно установить те пределы рН, в которых происходит активный рост испытуемых штаммов. Учитывая при этом, что оптимальный рН

среды будет различным на разных средах, зависеть от других условий культивирования и может быть точно определен лишь для конкретных условий проведения ферментационного процесса [196].

По данным Беккер З.Э. [6] pH субстрата может изменяться во время роста грибов, потому что грибы выделяют органические кислоты, такие как янтарная, уксусная, щавелевая. Также известно, что pH клеточного сока плодовых тел шляпочных грибов колеблется в пределах 5,9–6,2 [153, 196]. Поэтому, для приготовления субстратов существует необходимость учета буферных возможностей места обитания грибов [196].

Среди представителей отдела *Basidiomycota* в диапазоне pH от 2 до 10 растет 32 % исследованных в мире штаммов. Это преимущественно лигнотрофные виды *Lentinus lepideus*, *Pleurotus ostreatus*, *Pholiota aurivella*, *Panus conchatus*, *P. tigrinus*, а также некоторые виды микоризообразователей и сапротрофов: *Coprinus comatus*, *Agaricus arvensis*, *Lepis tanuda*, *Clitocy beebularis*. В узких границах кислотности среды растут *Armillaria mellea*, *Coprinus ephemerus*, *Marasmius oreades*. У грибов *Armillaria mellea*, *Agaricus bisporus*, *Marasmius corodonius* и *Coprinus ephemerus* максимальное количество мицелия образуется при кислых исходных значениях pH среды. В процессе роста эти грибы подкисляют среду [8, 159].

Некоторые штаммы таких видов, как *Flammulina velutipes*, *Oudemansiella radicata*, *Suillus variegatus*, *Lepis tanuda* образуют наибольшее количество мицелия при щелочных и нейтральных начальных значениях pH. Грибы видов *Pholiota adiposa*, *Marasmius oreades*, *Panus tigrinus*, *P. conchatus* в процессе роста изменяют pH среды до оптимальных для их роста значений. У некоторых видов максимальное образование мицелия отмечено при двух значениях pH среды: у *Pholiota adiposa* и *Pleurotus ostreatus* – 6 и 9, у *Agaricus arvensis* – 5 и 9 [8].

Таким образом, на основании полученных данных можно сделать заключение, что значения pH среды, благоприятные для роста, специфичны и определяются физиологическими особенностями штамма. Многие лигнотрофные виды растут в широких границах кислотности среды. Тот факт, что большинство

испытываемых штаммов активно растут при pH 5–6, дает основание к рекомендациям проводить первичный отбор штаммов высших базидиальных грибов при данном значении pH. Оптимальный pH для роста каждого отобранного штамма на более поздних этапах отбора устанавливался непосредственно на той питательной среде, которая была подобрана для его культивирования.

1.5.4 Освещенность

Свет является важным абиотическим фактором, влияющим на рост и развитие грибов, регулируя последовательность биохимических и биофизических процессов, приводящих к фототропным реакциям [96].

В литературе отсутствуют данные, свидетельствующие о необходимости света для развития мицелия до начала процесса плодообразования. Однако отмечено, что световое воздействие оказывает влияние на морфологию культур грибов. Наличие или отсутствие светового фактора в период роста мицелия отражается на характере дальнейшего плодоношения [94].

Проводились исследования по изучению возможности передачи светового воздействия по мицелию [156]. Разные авторы, исследуя разные грибы, получили противоречивые результаты. Одни исследователи утверждали, что действие света проявляется только на освещенных участках и никакой передачи по мицелию не происходит. Другие показали, что передача светового воздействия по мицелию может иметь место [94].

Относительно времени проявления фоточувствительности были подтверждены три гипотезы: 1) фотоиндукция начинается, когда ресурсы питания и пространства исчерпаны; 2) фотоиндукция проявляется, когда мицелий становится физиологически зрелым; 3) при исчерпании ресурсов пространства и питания рост мицелия замедляется и происходит вынужденная перестройка метаболизма. В результате в клетках мицелия образуется гипотетический фоторецепторный предшественник, способный поглощать световую энергию. При

поглощении световой энергии образуются специфические вещества, стимулирующие образование плодовых тел [95, 96, 97].

У многих видов при недостаточном освещении или в темноте образуются лишь примордии без образования плодовых тел. Продолжительность и интенсивность освещения влияют на сроки появления плодовых тел, форму, окраску, величину и степень развития [95]. Эгер Г. предложена классификация высших базидиальных грибов по потребности в освещении для образования плодовых тел [156]. Она выделяет четыре группы. У первой группы образование примордиев и плодовых тел происходит одинаково в темноте и на свету (*Agaricus bisporus*). Во вторую группу входят виды грибов, у которых примордии образуются как на свету, так и в темноте, а плодовые тела формируются только на свету (*Lentinula edodes*). Согласно исследователям Поединок Н.Л. и Бисько Н.А. [97] образование плодовых тел у *Lentinula edodes* происходит при экспозиции света в 100–300 люкс. Ниже 100 и выше 300 люкс формирование плодовых тел угнеталось.

По данным Вассера С.П. [23] формирование примордиев и плодовых тел *Lentinula edodes* и *Pleurotus osteratus* должно происходить при высокой освещенности, составляющей 500–2000 люкс. При этом формирование примордиев у *Lentinula edodes* стимулируется относительно низким уровнем освещенности (500 люкс). Если в этом периоде не увеличить освещенность (до 1000 люкс), то развитие плодовых тел будет замедляться.

Грибам третьей группы для начала и завершения плодоношения необходим свет, а на промежуточных стадиях они требуют темнового периода. У представителей четвертой группы (*Favolus arcularius*) образование примордиев и формирование плодовых тел осуществляются только на свету. Однако, по мнению самой Эгер Г. [156] такая классификация носит условный характер. В литературе существуют данные о том, что для получения плодовых тел высших базидиомицетов используют искусственный дневной, рассеянный солнечный и УФ свет. Так, образование плодовых тел у опенка зимнего (*Flammulina velutipes*) и навозника волосистоногого (*Coprinus lagopus*) стимулируется синей частью

видимого спектра (520 нм). Волны красной и зеленой частей спектра оказывают слабое влияние на формирование плодовых тел грибов. Для плодоношения *Pleurotus ostreatus* и *Lentinula edodes* необходимо освещение свыше 150 люкс [95, 96].

1.5.5 Состав газовой среды

Базидиальные грибы являются аэробными гетеротрофными организмами, которые получают необходимую энергию только в процессе дыхания. Продукты дыхания – вода и углекислый газ. Известно, что на рост и развитие грибов оказывает влияние состав атмосферного воздуха (концентрация CO_2 и других летучих газов). Потребность грибов в кислороде не определяется общим правилом. Существуют грибы, которые не реагируют на недостаток кислорода, в то время как другие замедляют рост, в случае его недостатка [151].

Изучение физиологических процессов сапротрофных грибов при их культивировании в искусственных условиях показало, что газообмен играет большое значение между растущими на субстрате грибами и окружающей средой. Многим строго аэробным грибам требуется низкое количество кислорода – 2–5 % от атмосферного содержания. Помимо этого было установлено, что высокая концентрация CO_2 влияет на процессы плодобразования при культивировании *Pleurotus ostreatus*. В работах других авторов по исследованию процессов плодоношения некоторых сапротрофных грибов также указывается на то, что внешний вид плодовых тел реагирует на изменение уровня CO_2 в окружающем воздухе [151].

По данным Беккер З.Э. [6] увеличение содержания CO_2 до 0,6 % (6000 ppm) стимулирует рост мицелия высших съедобных базидиомицетов. Однако при уровне от 0,4 % до 0,6 % формирование примордиев ингибируется. Также этим автором показано, что при концентрации CO_2 – 0,2 % и 0,4 % примордии появляются деформированными и плодовые тела имеют маленькие шляпки и длинные ножки. Уровень CO_2 ниже 0,2 % является оптимумом для плодоношения.

Следует отметить, что в литературе имеются данные о том, что содержание CO₂ в субстрате служит защитным барьером для мицелия базидиальных съедобных грибов от влияния посторонней микрофлоры, который при высокой концентрации CO₂ может погибнуть либо очень слабо расти [6, 178].

Таким образом, сделав обзор литературы по влиянию абиотических факторов на рост и развитие базидиомицетов и, в частности, культур *A. mellea*, *L. edodes* и *G. frondosa*, было показано, что их физиологические процессы зависят от температуры, влажности, реакции среды, освещенности и аэрации.

1.6 Влияние регуляторов роста на интенсификацию процессов развития грибов

Особое место среди эндогенных регуляторов роста занимают витамины. Они удовлетворяют почти всем требованиям фитогормонов: синтезируются в грибах, действуют на ростовые процессы в ничтожно малых количествах. Однако витамины не способны вызывать формообразовательный эффект, хотя, подобно фитогормонам, они в высоких и низких, а некоторых случаях и в оптимальных концентрациях могут приводить к появлению у обработанных грибов разнообразных формативных изменений. В отличие от животных и человека на грибах недостаточно изучена регуляторная способность витаминов. Тем не менее, отдельные опыты в этом плане показывают, что витамины группы В принципиально могут регулировать ростовые процессы в широком диапазоне концентраций, проявляя и ингибирующее действие [6].

По структуре витамины представляют собой чрезвычайно разнообразный комплекс соединений, но по свойствам разделяются на две группы: воднорастворимые и жирорастворимые [164]. Ниже речь пойдет в основном о воднорастворимых витаминах, как наиболее важной группе эндогенных регуляторов роста грибов.

В естественном состоянии витамины обнаружены в свободной, конъюгированной и связанной формах. Наиболее широко распространены в грибах связанные с белками витамины, освобождаемые с помощью ферментного

и щелочного гидролиза. Среди воднорастворимых витаминов грибов в свободной форме встречается преимущественно биотин. Конъюгаты витаминов имеют ограниченное распространение. Тем не менее, для некоторых витаминов (никотиновая, фолиевая и аскорбиновая кислоты и др.) показано образование конъюгатов с аминокислотами, индолами и другими низкомолекулярными соединениями [167].

Основная роль витаминов в грибах сводится к участию в обмене веществ. Являясь составной частью многих ферментов, витамины принимают участие в регуляции азотистого, углеводного и жирового обмена. Биосинтез белков и аминокислот не происходит в отсутствие ряда витаминов [6, 141].

Многие из авторов отмечают, что наилучшими из испытываемых витаминов для базидиальных грибов являются тиамин, токоферол и биотин [141]. Тиамин и никотиновая кислота в значительной степени стимулировали рост шиитакэ (*L. edodes*) и пилолистника обильношероховатого (*Lentinus squarrosulus*) [140, 167]. Пиридоксин и рибофлавин способствовали благоприятному росту щелелистника обыкновенного (*Schizophyllum commune*) [6]. Добавление в питательные среды пиридоксина увеличивало накопление биомассы мицелия клубневидного гриба (*Pleurotus tuberregium*) на 51,3 % [141].

Грибы больше всего нуждаются в воднорастворимых витаминах группы В (таблица 1.5).

Таблица 1.5 – Функции водорастворимых витаминов [6]

Витамины	Функции
Биотин (В ₇)	Участвует в превращении орнитина в цитруллин; играет важную роль в усвоении аммиака. Производит ряд реакций карбоксилирования; участвует в дезаминировании некоторых аминокислот и в синтезе некоторых жирных кислот
Рибофлавин (В ₂)	Принимает участие в первом этапе пути метаболизма гексоз через гексозомонофосфат, окисляя глюконовую кислоту и глюкозу.

Окончание таблицы 1.5

Витамины	Функции
Тиамин (В ₁)	Является активным компонентом многих ферментных систем. В соединении с фосфорной кислотой образует кофермент карбоксилазу, участвует в превращении углеводов. При его недостатке или отсутствии наблюдается замедление углеводного обмена.
Мезоинозит (В ₈)	Играет большую роль в окислительных процессах, локализованных в митохондриях.
Пантотеновая кислота (В ₅)	Участвует в биосинтезе коэнзима А, функции которого состоят в переносе двууглеродных фрагментов. В результате этого процесса образуются новые алифатические соединения с увеличенной на два углеродных фрагмента цепью. Играет решающую роль в биосинтезе кислот цикла Кребса.
Никотиновая кислота (В ₃)	Участвует практически во всех реакциях дегидрогенизации и гидрогенизации. Принимает участие в системе ферментов, восстанавливающих нитраты при образовании макроэргических фосфатов в процессе окислительного фосфорилирования.
Витамин С	Способность легко окисляться в дегидроаскорбиновую кислоту.

Так же, как и бактерии, грибы по отношению к витаминам разделяются на две группы. Витаминотребующие – не обладают способностью синтезировать необходимые для них витамины (для роста этих грибов необходимо внесение в питательную среду витаминов). Витаминотребующие – обладающие способностью при росте в минеральноуглеводной среде синтезировать важные для роста витамины. Большая часть базидиальных видов грибов принадлежит к витаминотребующей группе. Множество видов облигатных паразитных грибов являются представителями витаминотребующей группы. Тем не менее, это разделение на группы относительно, так как при добавлении витаминов в питательную среду ускоряется рост мицелия и витаминотребующих грибов [6].

Действие витаминов на рост грибов, по-видимому, связано с тем, что они являются компонентами ряда ферментных систем. Кроме того, можно

предполагать, что такие процессы как деление и растяжение клеток с участием витаминов, могут быть связаны с белково-нуклеиновым обменом и обменом фитогормонов [141].

Таким образом, применение витаминов в разрабатываемых методах культивирования съедобных и лекарственных грибов, может стать одним из перспективных направлений решения проблемы скорости роста и выхода биомассы грибов.

На сегодняшний день в Российской Федерации оптимальные методы культивирования грибов являются малоизученными. Основная причина заключается в том, что грибоводство в России длительное время не развивалось, было сведено к положению побочного (второстепенного) и не рассматривалось как самостоятельная отрасль сельского хозяйства. В связи с этим, в области промышленного производства грибов и его материально-технического обеспечения в России имеются значительные отставания. Поэтому разработка методов интенсивного культивирования ксилотрофных видов грибов с применением различных активно воздействующих абиотических и биотических факторов роста (максимально приближенных к природным), приведет к интенсификации процессов развития мицелия и плодовых тел, что, в свою очередь, позволит получать дополнительные продукты для пищевых, фармацевтических и сельскохозяйственных целей.

ГЛАВА 2 ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

В своей работе мы руководствовались схемой исследований, которая соответствовала поставленным задачам (рисунок 2.1).

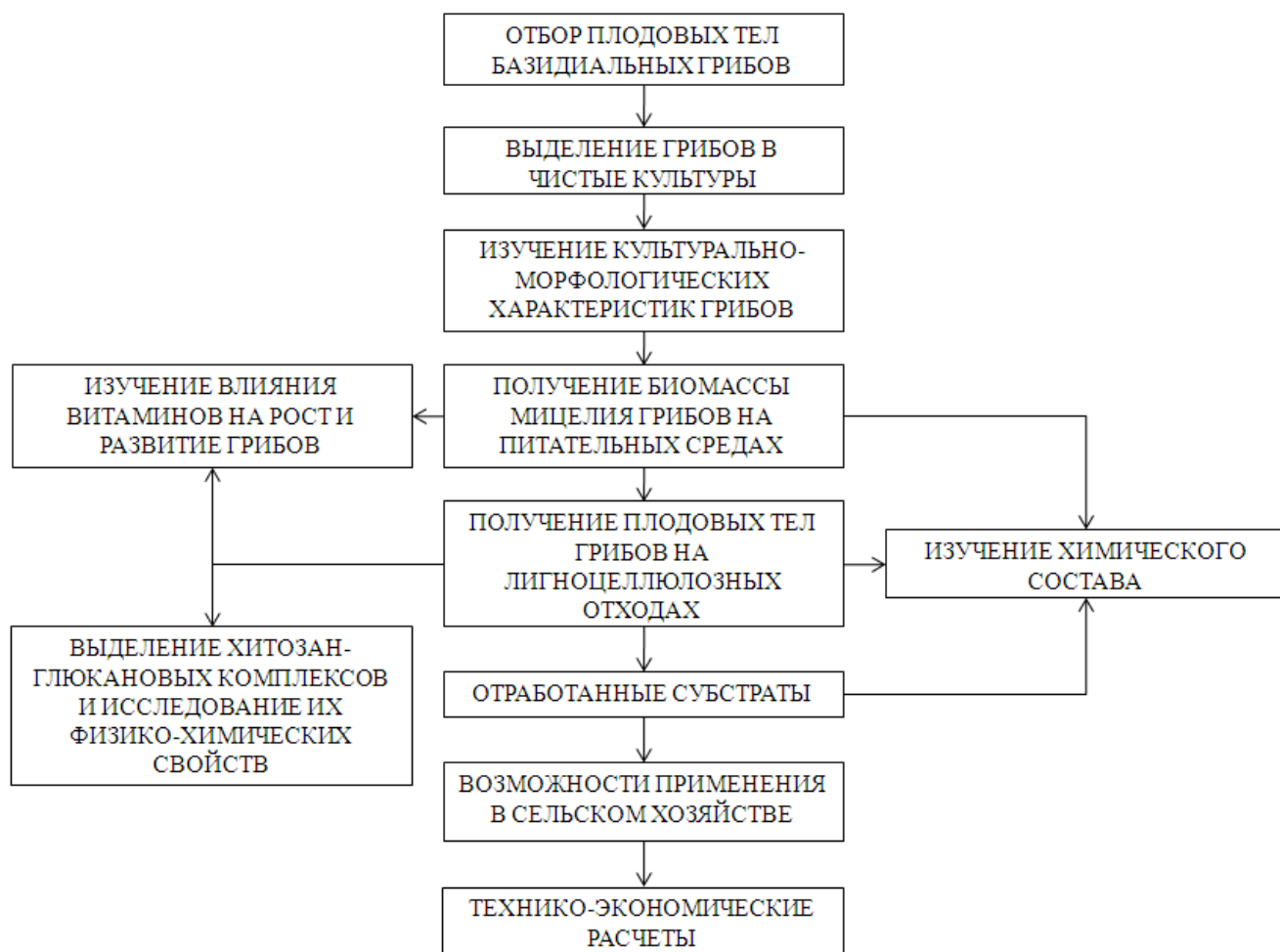


Рисунок 2.1 – Схема исследований

2.1 Объекты исследований

В качестве объектов исследования использованы: штаммы грибов *L. edodes* F-1000 и *G. frondosa* 2639 выделенные из коммерческого мицелия и штамм *A. mellea* D-13 выделенный из плодовых тел, собранных с пней березы повислой (*Betula pendula*) в естественных местообитаниях Алтайского края.

2.2. Методы исследований

Идентификация вида *A. mellea* осуществлялась по определителю грибов [91]. Выделение *A. mellea* в чистую культуру проводилось из тканей свежесобранных грибов по методике, описанной А.С. Бухало [21].

Выращивание культур грибов осуществляли в чашках Петри методом поверхностного культивирования на сусло-агаре при температуре 26 ± 1 °С до полного зарастания мицелием питательной среды. Хранили культуры на скошенной сусло-агаровой среде в пробирках при температуре 4 ± 1 °С.

Изучение влияния температуры на рост мицелия на различных агаризованных средах проводили с учетом среднесуточной скорости роста и ростового коэффициента [21].

Вычисление скорости линейного роста колонии проводили по формуле:

$$V = (D-d)/t, \quad (2.1)$$

где D – диаметр колонии, мм;

d – диаметр инокуляционного блока, мм;

t – продолжительность культивирования, сутки.

По скорости роста колонии условно делили на три группы: быстрорастущие (5,1 мм/сут. и более), растущие со средней скоростью (2,6–5,0 мм/сут.) и медленно растущие (до 2,5 мм/сут.) [86].

Поскольку изученные нами виды образовывали колонии разных типов и имели разную высоту и плотность, нами проводился расчет ростового коэффициента (РК) по формуле:

$$PK = (D-d) \times h \times g/t, \quad (2.2)$$

где D – диаметр колонии, мм;

d – диаметр инокуляционного блока, мм;

h – высота колонии, мм;

g – плотность колонии, баллы;

t – возраст колонии, сут.

Плотность колонии отмечалась по трехбальной системе (1 – редкая, 2 – средняя, 3 – плотная).

Культуры, у которых $PK > 100$, относили к высокопродуктивным, у культур, растущих со средней продуктивностью $PK = 50-100$, у низкопродуктивных культур $PK < 50$ [127]. В настоящей работе PK определяли по мере освоения мицелием всей поверхности питательной среды.

Кислотность среды определяли потенциометрическим методом [39]. Влажность субстрата – весовым методом [36]; влажность воздуха в камере роста контролировали при помощи датчика «ДВТ-02».

Морфология и микроморфология мицелия изучались по общепринятым методам микологических исследований на агаризованных средах [20].

Для получения инокулята, выращенного в чашках Петри на сусло-агаре (СА), мицелий вносили в колбы со стерильной жидкой средой и культивировали в стационарных условиях. Выращенный мицелий стерильно гомогенизировали и вносили в экспериментальные колбы объемной долей 10 %.

Посевной мицелий получали методом глубинного культивирования с использованием термостатируемого шейкера (BioSanES-20) при скорости вращения 150 об/мин и температуре $26 \pm 1^\circ\text{C}$ на различных по составу средах, г/л:

1. Глюкоза – 10,0; пептон – 5,0; KH_2PO_4 – 3,0; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 1,0.
2. Молочная сыворотка, разведенная дистиллированной водой в 2 раза, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 0,6; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,5; NaNO_3 – 3,0.
3. Свекловичная меласса – 40,0; NH_4NO_3 – 3,0; KH_2PO_4 – 1,2.

Для получения мицелия в статических условиях, использовали термостат (ТС-80М-20). Процесс роста мицелия контролировали по интенсивности потребления сахаров в среде. Накопление биомассы прекращали при снижении концентрации редуцирующих веществ менее 0,4 %.

Стерилизацию свекловичной мелассы, молочной сыворотки, растворов пептона и солей в питательных средах осуществляли автоклавированием при избыточном давлении 0,12 МПа, раствор глюкозы при 0,05 МПа, в течение 30 мин.

Посевной мицелий инокулировали в количестве 6 % от массы субстрата.

Схема интенсивного культивирования включала следующие этапы: выбор растительного сырья, увлажнение, термообработка, инокуляция, инкубация, плодоношение, сбор плодовых тел грибов.

С целью подбора оптимального субстрата для культивирования грибов были испытаны такие компоненты субстратов как: березовые опилки (степень измельчения 5,0–10,0 мм), дробленые ветки облепихи (степень измельчения 5,0–10,0 мм), пшеничные отруби, пивная дробина, шелуха овса, пшеничная солома и лузга подсолнечника.

Образец №1 – Березовые опилки (контроль);

Образец №2 – Березовые опилки / пшеничные отруби (3:1);

Образец №3 – Березовые опилки / пивная дробина (3:1);

Образец №4 – Березовые опилки / шелуха овса (3:1);

Образец №5 – Дробленые ветки облепихи;

Образец №6 – Дробленые ветки облепихи / пшеничные отруби (3:1);

Образец №7 – Шелуха овса;

Образец №8 – Пшеничная солома;

Образец №9 – Лузга подсолнечника.

Увлажненный до 65 % субстрат помещали в стеклянные банки (ГОСТ 5717.2-2003) объемом 1 л и проводили термическую обработку в автоклаве (ВК-70). Субстрат охлаждали до комнатной температуры и производили его инокуляцию глубинным мицелием грибов. Для вентиляции и предотвращения высыхания мицелия на поверхности субстрата образцы накрывали крышками из полиэтилена с фильтром (Агроспан 42). Подготовленные образцы помещали в термостат при температуре 26 ± 1 °С до полного зарастания субстрата мицелием.

После полной колонизации субстрата во всех образцах, крышки с фильтром удаляли, затем помещали в камеру роста, оборудованную нагревательным и охлаждающим элементами (Microlife FH-80 и Бирюса-310Е), ультразвуковым увлажнителем (AIR-O-SWISS), датчиком влажности и температуры (ДБТ-02), вентилятором (DeerCool), светодиодной лампой (LED-A60).

Выход грибов рассчитывали по формуле:

$$\text{Масса свежих плодовых тел (кг)} / \text{масса субстрата (кг)} \times 100 \% \quad (2.3)$$

Для изучения влияния витаминов на рост мицелия и выход плодовых тел грибов использовали: рибофлавин (ЛСР-002944/07), тиамин (ЛСР-002679/07), никотиновую кислоту (ЛСР-015076/01), витамин С (ЛСР-000781/08), п-аминобензойную кислоту (ТУ6-14-655-80), мезо-инозит (ТУ 6-09-3250-75), витамин А (ЛСР-004225/09), биотин (ЛСР-003496/09) и их смесь с концентрациями в среде 0,15; 0,20; 0,40; 0,60 и 0,80 мг/мл.

2.3 Методы анализа

Перед проведением анализов, биомассу мицелия и плодовых тел грибов высушивали в сушильном шкафу (СНОЛ – 3,5) при температуре 55 °С до постоянной массы и измельчали.

Для определения основных показателей химического состава объектов применялись стандартные физико-химические методы анализа, а также методы, описанные в отраслевой и научно-технической литературе.

Содержание белка определяли по методу Кьельдаля (N×6,25; N×4,38) [41]; качественный и количественный составы аминокислот – методом ионообменной хроматографии на аминокислотном анализаторе Aracus (производство РМАGmbH, Германия) [38]; количество легко- и трудногидролизуемых полисахаридов – по методу Кизеля и Семигановского [52]; редуцирующие вещества по ГОСТ 13192-73 [40]; определение липидов – по методу Блайя и Дайера [62]; определение массовой доли жирных кислот и витаминов – методом ВЭЖХ (ShimadzuLC-20 Prominence) [78, 133]; определение количества экстрактивных веществ – методом исчерпывающей экстракции [42]; влажность по ГОСТ 13586.5-93 [36]; зольность по ГОСТ 27494-87 [37]; минеральный состав золы изучали методом рентгено-флуоресцентной спектроскопии на приборе «Спектроскан» [65]; содержание лигнина – по методу Комарова [87]; целлюлозы – по методу М. Кюршнера и Н. Ганека [87].

Выделение хитозан-глюкановых комплексов (ХтГК) из плодовых тел грибов проводили по United States Patent 4282351 [148]. Среднюю молекулярную массу и характеристическую вязкость ХтГК определяли методом вискозиметрии [122]; степень деацетилирования и сорбцию тяжелых металлов (Co^{2+} , Fe^{3+}) – потенциометрическим титрованием [76]. Идентификацию ХтГК – ИК-спектроскопией (Shimadzu FTER 8300) [174].

Индекс микогенного ксилолиза вычисляли по В.А. Соловьеву (1980) [114].

$$I_k = C / (C + L), \quad (2.4)$$

где C – потери целлюлозы, %;

L – потери лигнина, %.

Биологическую ценность белков рассчитывали методом химического сора [107], в качестве шкалы использовали ориентировочный образец соотношения незаменимых аминокислот, предложенный Объединенным экспертным комитетом эталонный белок ФАО/ВОЗ [136].

Биологическую ценность по серосодержащим аминокислотам S/T определяли по формуле:

$$S/T = \sum \text{серосодержащих} / \text{общий азот} \quad (2.5)$$

Индекс питательности белка рассчитывали по формуле:

$$NI = \text{ЕАА индекс} \times \text{содержание белка, \%} / 100, \quad (2.6)$$

где ЕАА индекс – отношение суммы незаменимых аминокислот в исследуемом продукте к их содержанию в условно-идеальном для человека белке ФАО/ВОЗ [20].

Исследования проводились в четырехкратной повторности. Статистическую обработку экспериментальных данных осуществляли с использованием компьютерных программ Excel Microsoft Office, Statistica 8.0.

ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Разработка методов интенсивного культивирования грибов

В промышленной микологии используются два метода культивирования плодовых тел грибов-ксилотрофов: интенсивный и экстенсивный. Наибольший практический интерес вызывает интенсивный метод выращивания. Он обладает рядом преимуществ перед экстенсивным методом – более высокий и стабильный выход плодовых тел, применяется широкий спектр растительных отходов лесного и сельского хозяйств, более короткий производственный цикл, возможность использования автоматизации технологических процессов [19, 20, 46, 117].

Промышленное производство плодовых тел высших съедобных грибов по экономической эффективности способно успешно конкурировать с традиционными методами получения пищевых продуктов.

Схема интенсивного культивирования грибов *A. mellea* D-13, *L. edodes* F-1000 и *G. frondosa* 2639 представлена на рисунке 3.1.

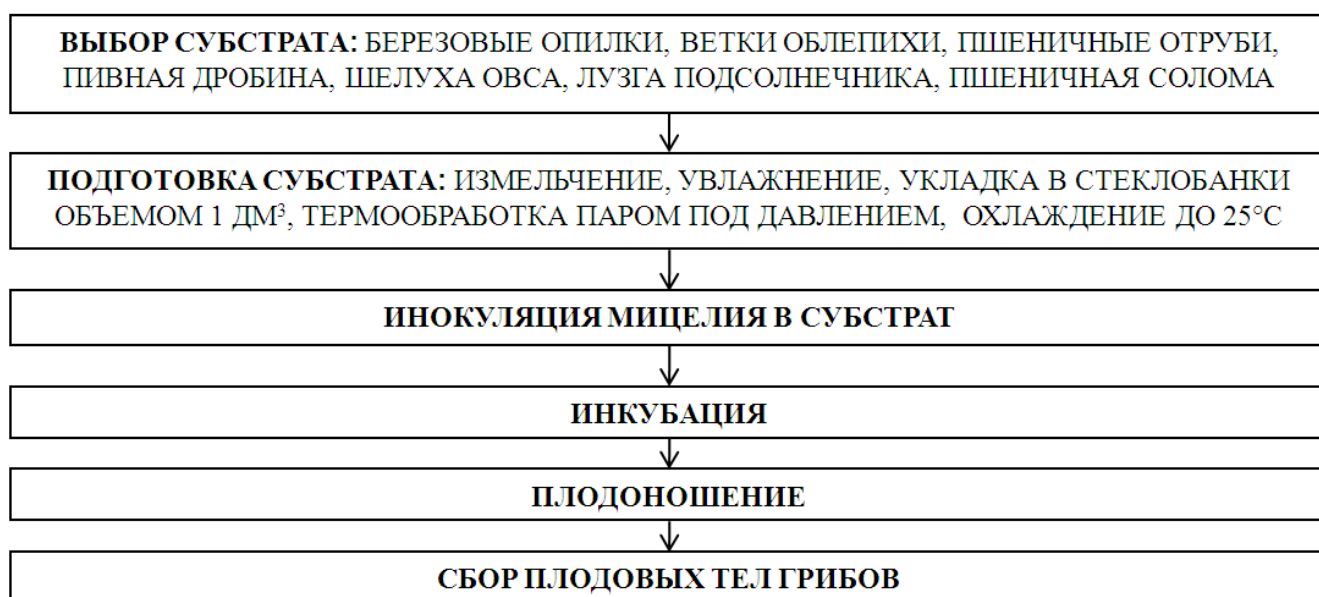


Рисунок 3.1 – Схема интенсивного культивирования грибов *A. mellea* D-13, *L. edodes* F-1000 и *G. frondosa* 2639

3.2 Влияние абиотических факторов на морфогенез культур грибов

Морфогенез культур грибов *A. mellea* D-13, *L. edodes* F-1000 и *G. frondosa* 2639 определяет ряд взаимосвязанных факторов, таких как температура, влажность, кислотность среды, освещенность, состав газовой среды [23].

В связи с тем, что некоторые данные о влиянии абиотических факторов на рост и развитие *L. edodes* и *G. frondosa* известны, а *A. mellea* является малоизученным видом, следовало провести межвидовую сравнительную характеристику этих грибов.

Влияние температуры. Известно, что предел температуры для ксилотрофов находится в широком диапазоне от 4 °C до 38 °C [23, 25]. Для роста и развития большинства грибов оптимальной температурой является диапазон от 20 °C до 30 °C (*Armillaria mellea*, *Lentinula edodes*, *Luophyllum ulmarium*, *Kuehneromyces mutabilis*, *Grifola frondosa*, *Piptoporus betulinus*) [6]. Известно также, что оптимальной температурой для роста штаммов *Lentinula edodes* 361, 365, 371 является 26 °C, тогда как для некоторых штаммов *Grifola frondosa* 24–28 °C [190].

Проведенные наблюдения за ростом и развитием мицелия *A. mellea* D-13, *L. edodes* F-1000 и *G. frondosa* 2639 в диапазоне температуры от 4 °C до 38 °C показали, что при температуре 4 °C рост мицелия испытываемых грибов тормозился, но после восстановления температуры до 20 °C рост возобновлялся. Отмечено, что при температуре 38 °C мицелий всех исследуемых грибов погибал.

Далее были определены среднесуточные скорости роста колоний при различной температуре (рисунок 3.2).

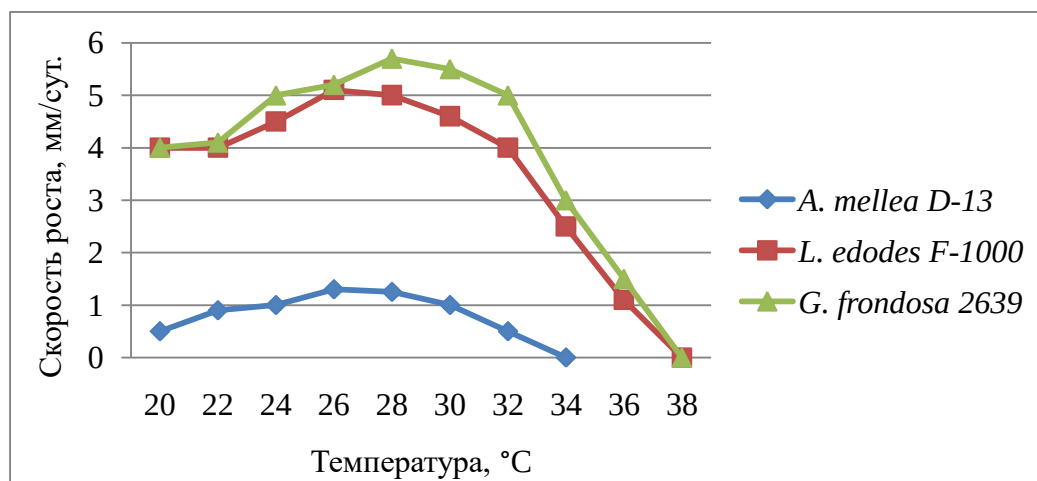


Рисунок 3.2 – Среднесуточные скорости роста мицелия грибов в зависимости от температуры

Из рисунка 3.2 видно, что наиболее благоприятным для роста грибов *A. mellea* D-13 и *L. edodes* F-1000 является температурный интервал от 26 °C до 30 °C, в то время как для штамма *G. frondosa* 2639 – 24–32 °C. Оптимальной для *A. mellea* D-13 и *L. edodes* F-1000 является температура 26 °C, для *G. frondosa* 2639 – 28 °C. При температуре выше 32 °C скорость роста испытуемых грибов резко снижалась.

В результате изучения среднесуточной скорости роста мицелия на СА среде при оптимальной температуре, наиболее высокая скорость роста отмечена у штамма *G. frondosa* 2639 ($5,7 \pm 0,2$ мм/сут.). Несколько медленнее рос штамм *L. edodes* F-1000 ($5,1 \pm 0,2$ мм/сут.). Относительно низкой скоростью роста характеризовался штамм *A. mellea* D-13 ($1,3 \pm 0,2$ мм/сут.) (таблица 3.1).

Таблица 3.1 – Среднесуточная скорость роста и ростовой коэффициент мицелия грибов при оптимальной температуре культивирования

Культура гриба	Температура, °C	Ростовой коэффициент, баллы	Среднесуточная скорость роста, мм/сут.
<i>A. mellea</i> D-13	$27,0 \pm 1,0$	$11,8 \pm 0,2$	$1,3 \pm 0,2$
<i>L. edodes</i> F-1000	$26,0 \pm 1,0$	$45,0 \pm 0,2$	$5,1 \pm 0,2$
<i>G. frondosa</i> 2639	$28,0 \pm 1,0$	$51,4 \pm 0,2$	$5,7 \pm 0,2$

На основании показателей скорости роста на СА среде к быстрорастущим были отнесены штаммы *G. frondosa* 2639 и *L. edodes* F-1000, тогда как штамм *A. mellea* D-13 – к медленнорастущим.

Также были рассчитаны ростовые коэффициенты грибов, учитывающие, кроме диаметра колонии, ее высоту и плотность (рисунок 3.3).

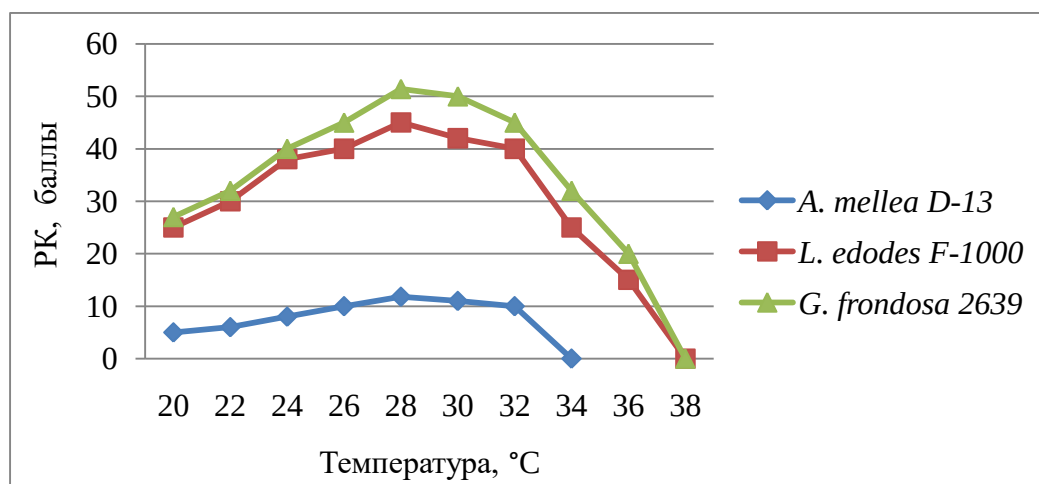


Рисунок 3.3 – Ростовые коэффициенты грибов в зависимости от температуры

Как видно из представленных данных на рисунках 3.2 и 3.3 оптимальная температура для роста и развития испытуемых грибов, при определении ее по среднесуточной скорости роста и ростовым коэффициентам близка. При этом, у грибов *A. mellea* D-13 и *L. edodes* F-1000 оптимальная температура оказалась 28 °C, а не 26 °C, в то время как у штамма *G. frondosa* 2639 она совпала.

Наибольшим показателем ростового коэффициента отличался штамм *G. frondosa* 2639 (РК=51,4), несколько меньшим – *L. edodes* F-1000 (РК=45,0), наименьшим – *A. mellea* D-13 (РК=11,8). По значениям ростового коэффициента штамм *G. frondosa* 2639 можно отнести к среднепродуктивным на плотных средах, а *L. edodes* F-1000 и *A. mellea* D-13 – низкопродуктивным.

В результате было показано, что оптимальная температура, определенная путем расчетов ростовых коэффициентов, оказываются в большинстве случаев выше, чем рассчитанная путем вычисления среднесуточной скорости роста колоний.

По данным Вассера С.П. [23], при культивировании ксилотрофных грибов с оптимальной температурой возможны отклонения на 1 °C в сторону увеличения или уменьшения оптимума в зависимости от первоначального местообитания конкретного штамма.

Основываясь на литературных данных, получение плодовых тел в камере роста осуществляли при температуре 15±1 °C для *A. mellea* D-13, 18±1 °C – для *G. frondosa* 2639 и 20±1 °C – для *L. edodes* F-1000 [27, 190, 195].

Таким образом, при изучении влияния температуры на рост мицелия испытываемых культур грибов с учетом среднесуточной скорости роста и ростового коэффициента установлена оптимальная температура которая для *A. mellea* D-13 и *L. edodes* F-1000 составила 26±1 °C, для *G. frondosa* 2639 – 28±1 °C, а для получения плодовых тел 15±1 °C, 20±1 °C и 18±1 °C, соответственно.

Влияние влажности. Достоверно установлено, что образование и формирование примордиев у всех испытываемых грибов происходит при влажности воздуха не менее 65–75 %. Однако, при такой влажности примордии всех испытываемых грибов достигали небольших размеров, а штамм *A. mellea* D-13 прекращал дальнейший рост с последующим подсыханием. При влажности 85–90 % у всех исследуемых грибов наблюдалось интенсивное развитие примордиев и плодовых тел.

Таким образом, влажность субстрата и относительная влажность воздуха оказывают влияние на формирование примордиев и развитие плодовых тел *A. mellea* D-13, *L. edodes* F-1000 и *G. frondosa* 2639. Оптимальная влажность субстрата для зарастания его мицелием составляет 65 %, относительная влажность воздуха для формирования примордиев и развития плодовых тел – 85-90 %. При несоблюдении оптимальных условий влажности, шляпка грибов уменьшается в размере, ножка удлиняется, происходит усыхание плодовых тел.

Влияние кислотности. Одной из наиболее важных физиологических характеристик при культивировании грибов-ксилотрофов является их отношение к кислотности среды. По данным Шивриной А.Н. и Бухало А.С. [21, 134] концентрация ионов водорода в среде оказывает существенное влияние на

характер метаболических процессов. Изучение влияния pH на рост грибов проводилось на СА среде при оптимальной температуре для каждого штамма – 26 ± 1 °C и 28 ± 1 °C (рисунок 3.4).

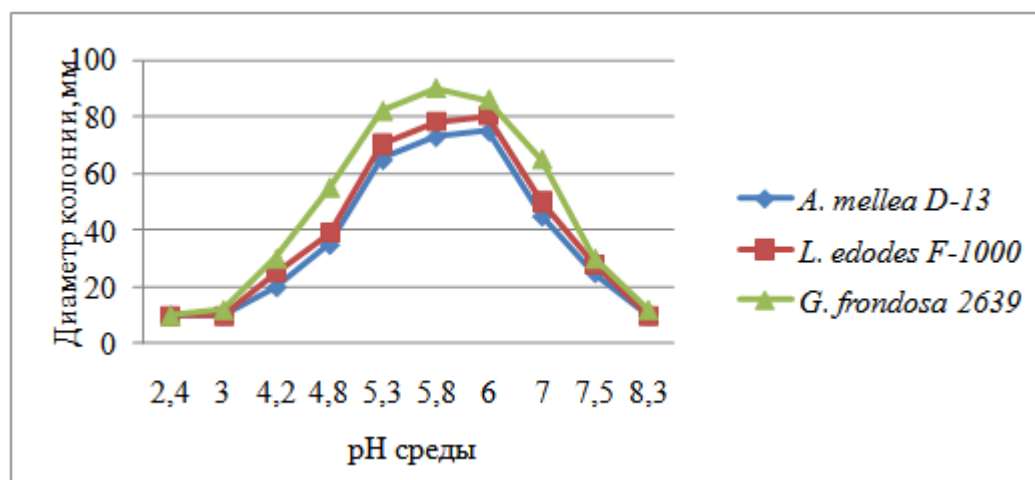


Рисунок 3.4 – Зависимость диаметра колоний мицелия грибов от pH среды

Из рисунка 3.4 видно, что у исследуемых грибов существуют некоторые различия по отношению к кислотности. На такие различия у ксилотрофных грибов указывают и другие авторы, которые связывают внутривидовую вариабельность в отношении к кислотности среды с различными экологическими происхождениями видов [8, 15].

Все испытываемые грибы на СА среде практически не растут при pH 2,4–3,0. При pH 4,2–4,8 рост очень слабый. При pH 5,3 активность роста мицелия грибов резко возрастает и остается высокой до pH 6,0. Максимальный диаметр колоний *A. mellea* D-13 и *L. edodes* F-1000 наблюдался при pH среды 6,0, в то время как у *G. frondosa* 2639 – 5,8. При дальнейшем подщелачивании среды наблюдалось уменьшение диаметра колоний.

Таким образом, были выявлены оптимальные диапазоны pH для роста мицелия грибов на СА среде. Показано, что штамм *G. frondosa* 2639 способен к активному росту в широком диапазоне pH (от 4,8 до 7,0), что является положительным качеством с точки зрения технологии. Наиболее благоприятным для роста грибов следует считать pH 5,8–6,0.

Влияние освещенности и состава газовой среды. Опираясь на литературные данные, представленные в первой главе, исследований по влиянию освещенности и состава газовой среды на морфогенез грибов в данной работе не проводилось. Однако была замечена закономерность увеличения скорости роста плодовых тел испытуемых грибов, при экспозиции света 200–250 люкс в течение 12 часов в сутки.

Было отмечено, что газообмен между растущими на субстрате грибами и окружающей средой играет большое значение. Видимо, в процессе формирования примордиев между субстратом и окружающей средой создается стационарная специфическая атмосфера с определенной концентрацией CO₂ и других летучих газов. При этом для создания такого микроклимата требуется специальный воздушный слой, создаваемый материалом, в котором проводят выращивание грибов (банки, пакеты, мешки для культивирования и т.д.). Расстояние между субстратом и окружающей средой должно составлять не менее 2 см. Продувание слабым потоком воздуха приводило к резкому замедлению роста примордиев либо полному его прекращению.

Таким образом, при изучении влияния абиотических факторов на рост и развитие мицелия грибов установлена оптимальная температура для *A. mellea* D-13, *L. edodes* F-1000 – 26±1 °C и для *G. frondosa* 2639 – 28±1 °C. Наиболее благоприятным для роста мицелия следует считать pH 5,8–6,0. Оптимальная влажность субстрата для роста мицелия – 65±5 %, относительная влажность воздуха для формирования примордиев и образования плодовых тел – 85–90 %. Установлено, что штамм *G. frondosa* 2639 в период плодообразования менее требователен к свету, чем *A. mellea* D-13 и *L. edodes* F-1000. Для формирования примордиев и образования шляпок плодовых тел этих видов грибов необходима освещенность в пределах 200–250 люкс и стационарная специфическая атмосфера с определенной концентрацией CO₂ и других летучих газов.

3.3 Выбор лигноцеллюлозных компонентов субстрата для культивирования грибов

Основные требования, предъявляемые к субстратам, при культивировании съедобных грибов включают: высокую скорость роста мицелия по всему объему субстрата, высокий выход и качество плодовых тел. Помимо этого, компоненты субстратов должны быть ежегодновозобновляемыми, легкодоступными и дешевыми [23, 68].

Рост мицелия *A. mellea* D-13 наблюдался только на субстратах, в качестве основного компонента которых использовалась древесина березы (образцы №1–4) (таблица 3.2).

Таблица 3.2 – Среднесуточная скорость роста мицелия *A. mellea* D-13 на растительных субстратах

Образец субстрата	Скорость роста, мм/сут.	Продолжительность культивирования, сутки	Характер формирования воздушного мицелия
1	2	3	4
№1	3,60±0,18	22	Плотный, клочкообразный, не равномерный; высота 1,2–1,4 мм
№2	5,00±0,20	16	Обильный, плотный, равномерный; высота 1,4–1,6 мм
№3	4,40±0,19	18	Обильный, плотный, равномерный; высота 1,4–1,6 мм
№4	4,00±0,17	20	Обильный, плотный, равномерный; высота 1,4–1,6 мм

Развитие мицелия *A. mellea* D-13 началось на 2 сутки с момента инокуляции субстратов. Наилучшим субстратом по показателю среднесуточной скорости роста являлись березовые опилки с добавлением пшеничных отрубей (образец №2). Достижение максимального диаметра колонии 90 см в чашках Петри на этом субстрате происходило на 16 сутки культивирования, что быстрее контроля на 6 суток (рисунок 3.5). Следует отметить, что рост мицелия *A. mellea* D-13 в образцах №3 и №4 также отличался от контроля. На обоих субстратах среднесуточная скорость роста мицелия *A. mellea* D-13 превышала контроль в 1,22–1,11 раза, соответственно.

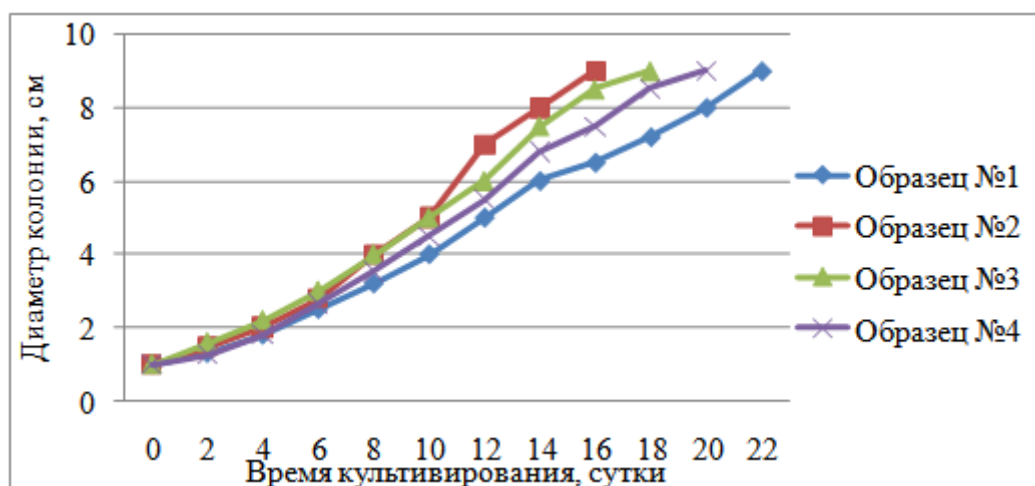


Рисунок 3.5 – Динамика роста мицелия *A. mellea* D-13 на растительных субстратах

Характер формирования воздушного мицелия также различался. Разница проявлялась в том, что в случае использования в качестве основного компонента субстрата березовых опилок (образец №1) он формировался неравномерно, клочкообразно, высота мицелия составляла 1,2–1,4 мм, а при использовании березовых опилок обогащенных питательными добавками (образцы №2–4) – равномерный, по всей поверхности субстрата и высота 1,4–1,6 мм (рисунок 3.6).



а



б

Рисунок 3.6 – Характер формирования воздушного мицелия *A. mellea* D-13 на субстратах: а – обильный, плотный, равномерный; б – плотный, клочкообразный, неравномерный

Установлено, что по мере старения мицелия на изучаемых субстратах, также как при росте на агаризованной среде происходило образование коричневой, плотной пленки, при этом образование примордиев не наблюдалось.

При культивировании штамма *L. edodes* F-1000 на растительных субстратах было отмечено, что штамм колонизировал субстраты, в качестве основы которых использовались древесина березы и облепихи, как без обогащения, так и при обогащении субстратов питательными добавками. Также был отмечен рост мицелия шиитаке на отходах сельскохозяйственного производства – шелухе овса и пшеничной соломе. Рост мицелия на лузге подсолнечника отсутствовал.

Следует отметить, что мицелий *L. edodes* F-1000 лучше колонизировал субстраты с древесиной березы обогащенной питательными добавками. Так в образцах №2 и №3 диаметр колонии мицелия 90 мм обнаружен на 14 и 16 сутки культивирования, соответственно, в то время как в контрольном образце на 18 сутки. Подобная закономерность прослеживается и при росте на древесине облепихи. В образце №6 диаметр колонии на 22 сутки культивирования составил 90 мм, тогда как в образце №5 – 80 мм на 24 сутки культивирования. В образцах №7 и №8 рост мицелия шиитаке был слабым (рисунок 3.7).

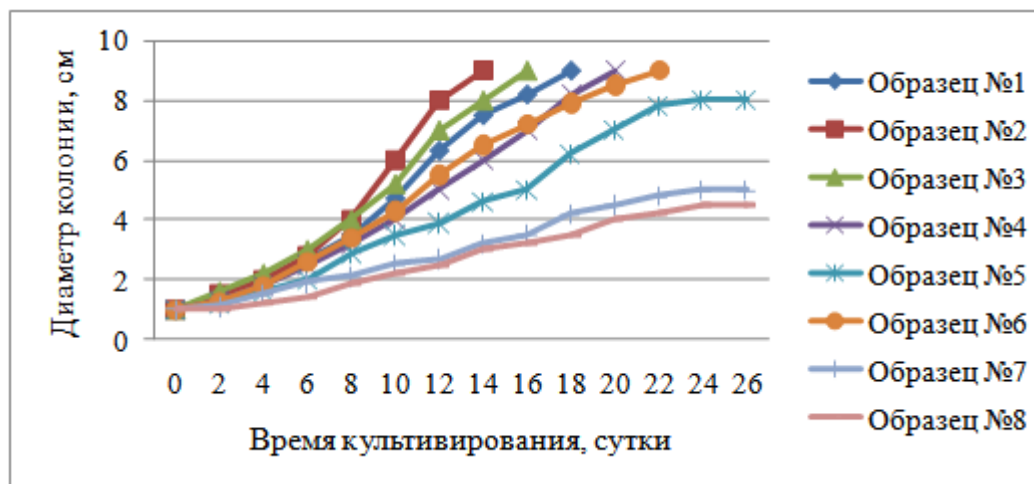


Рисунок 3.7 – Динамика роста мицелия *L. edodes* F-1000 на растительных субстратах

Характер формирования воздушного мицелия *L. edodes* F-1000 также различался в зависимости от используемого субстрата (рисунок 3.8).



а



б

Рисунок 3.8 – Характер формирования воздушного мицелия *L. edodes* F-1000 на субстратах: а – обильный, плотный, равномерный; б – паутинистый, рыхлый, равномерный

Так на субстратах с березовыми опилками мицелий формировался плотно, обильно. Отличие заключалось лишь в высоте воздушного мицелия. А именно, при росте в образцах №2 и №3 высота воздушного мицелия составила 0,8–1,2 мм, соответственно, тогда как при росте в образцах №1 и №4 0,6–0,8 мм, соответственно (таблица 3.3).

Таблица 3.3 – Среднесуточная скорость роста мицелия *L. edodes* F-1000 на растительных субстратах

Образец субстрата	Скорость роста, мм/сут.	Время культивирования, сутки	Характер формирования воздушного мицелия
1	2	3	4
№1	4,44±0,21	18	Обильный, плотный, равномерный; высота 0,6–0,8 мм
№2	5,71±0,20	14	Обильный, плотный, равномерный; высота 0,8–1,2 мм
№3	5,00±0,18	16	Обильный, плотный, равномерный; высота 0,8–1,2 мм
№4	4,00±0,19	20	Обильный, плотный, равномерный; высота 0,6–0,8 мм
№5	2,69±0,22	26	Паутинистый, рыхлый, равномерный; высота 0,5–0,8 мм
№6	3,63±0,21	22	Паутинистый, рыхлый, равномерный; высота 0,8–1,0 мм
№7	1,50±0,20	26	Паутинистый, рыхлый, равномерный; высота 0,5–0,6 мм
№8	1,45±0,19	26	Паутинистый, рыхлый, равномерный; высота 0,5–0,6 мм

Воздушный мицелий на субстратах с дроблеными ветками облепихи формировался рыхлым и паутинистым, в чашках Петри распределялся равномерно, высота 0,8–1,0 мм.

Среднесуточная скорость роста *L. edodes* F-1000 на изучаемых субстратах различалась значительно и составляла от 1,45 до 5,71 мм/сут. (таблица 4.2).

При культивировании *G. frondosa* 2639 на растительных субстратах было показано, что данный штамм обладает высокой скоростью роста почти на всех испытываемых субстратах, за исключением пшеничной соломы и лузги подсолнечника (образец №8, №9), где рост мицелия был слабым. Общей закономерностью явилось то, что колонизация с момента инокуляции субстратов началась со 2 суток культивирования (рисунок 3.9).

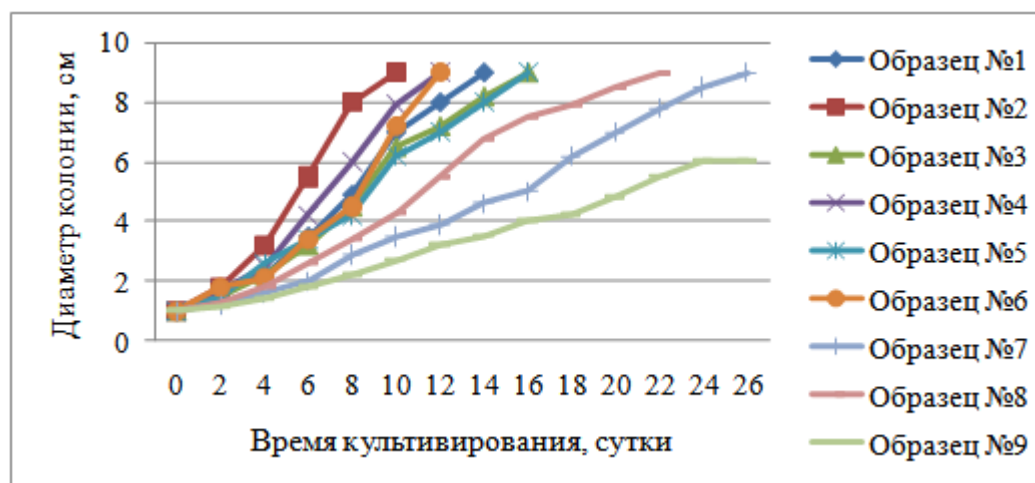


Рисунок 3.9 – Динамика роста штамма *G. frondosa* 2639 на растительных субстратах

Из данных рисунка 3.9 видно, что наилучшим субстратом по показателю скорости роста являются березовые опилки с добавлением пшеничных отрубей. Следует отметить, что среднесуточная скорость роста мицелия *G. frondosa* 2639 на этом субстрате была в 1,40 раза выше, чем при росте на березовых опилках (образец №1) (таблица 3.4).

Таблица 3.4 – Среднесуточная скорость роста мицелия *G. frondosa* 2639 на растительных субстратах

Образец субстрата	Скорость роста, мм/сут.	Время культивирования, сутки	Характер формирования воздушного мицелия
1	2	3	4
№1	5,71±0,21	14	Обильный, плотный, равномерный; высота 1,4–1,8 мм
№2	8,00±0,20	10	Обильный, плотный, равномерный; высота 2,2–2,5 мм
№3	5,00±0,22	16	Обильный, плотный, равномерный; высота 1,6–1,8 мм
№4	6,66±0,17	12	Обильный, плотный, равномерный; высота 1,6–1,8 мм
№5	5,00±0,18	16	Обильный, плотный, равномерный; высота 1,2–1,6 мм
№6	6,66±0,19	12	Обильный, плотный, равномерный; высота 1,4–1,8 мм
№7	3,63±0,23	22	Стелющийся, паутинистый, неравномерный; высота 0,6–1,0 мм
№8	3,07±0,22	26	Стелющийся, паутинистый, неравномерный; высота 0,6–1,0 мм
№9	1,80±0,20	26	Стелющийся, паутинистый, неравномерный; высота 0,6–1,0 мм

Характер формирования воздушного мицелия на растительных субстратах также различался (рисунок 3.10).



а



б

Рисунок 3.10 – Характер формирования воздушного мицелия *G. frondosa* 2639 на субстратах: а – обильный, плотный, равномерный; б – стелющийся, паутинистый, неравномерный

Воздушный мицелий на субстратах с древесиной березы и облепихи во всех вариантах эксперимента был обильным, плотным и отличался лишь по высоте – в образце №2 воздушный мицелий поднимался до крышки чашки Петри. При росте гриба на субстратах с шелухой овса, пшеничной соломы и лузги подсолнечника – стелющийся, паутинистый, клочкообразный, высотой 0,6–1,0 мм.

В результате, было показано, что на субстратах с дроблеными ветками облепихи рост мицелия *L. edodes* F-1000 и *G. frondosa* 2639 был благоприятным. Однако, использование дробленых веток облепихи в качестве компонента субстратов для культивирования *L. edodes* F-1000 и *G. frondosa* 2639 актуально в весенний и осенний периоды, т. е. в периоды очистки кустов облепихи садоводческих комплексов – выкорчевывание старых кустов, удаление сухих, загущающих крону и трущихся веток. Помимо этого, ее измельчение и высушивание для хранения ведет к большим энергозатратам.

Изучая возможность интенсивного культивирования грибов *A. mellea* D-13, *L. edodes* F-1000 и *G. frondosa* 2639 на растительных субстратах, было установлено, что скорость роста мицелия определяется двумя факторами: биологическими особенностями вида и качественным составом субстрата.

Таким образом, в результате проведенных исследований были отобраны три варианта субстратов из разряда отходов для дальнейшего изучения вопросов интенсивного культивирования грибов *A. mellea* D-13, *L. edodes* F-1000 и *G. frondosa* 2639. К ним относятся: березовые опилки (контроль), березовые опилки/пшеничные отруби (3:1), березовые опилки/пивная дробина (3:1).

Березовые леса создают обширную сырьевую базу лесной индустрии Алтайского края (береза является преобладающей породой дерева в Алтайском крае – 34,4 %) [137]. Заготовка и обработка дерева сопровождается большим количеством отходов, которые частично используются для получения композиционных материалов (фанера, древесно-стружечная плита и др.). Древесное сырье, полученное при переработке березы, не успевает полностью использоваться в связи с малым количеством предприятий по переработке отходов. Данное сырье в основном гниет в отвалах, что приводит к загрязнению

окружающей среды. Поэтому утилизация отходов деревоперерабатывающих предприятий ксилотрофными грибами, сопровождающаяся получением ценных пищевых продуктов, является перспективным направлением Алтайского края.

3.4 Получение посевного мицелия грибов на питательных средах различного состава

3.4.1 Динамика роста и накопления биомассы в поверхностной культуре

Качество посевного мицелия в значительной степени определяет успех интенсивного культивирования грибов-ксилотрофов [11].

По данным Дудки И.А., Вассера С.П. и др. (1982) посевной мицелий грибов должен отвечать следующим требованиям: 1) иметь высокую жизнеспособность, обеспечивающую быстрое разрастание мицелия в субстрате; 2) принадлежать к отселекционированному штамму, обладающему устойчивостью к заболеваниям, значительной урожайностью, хорошим товарным видом и высокой конкурентноспособностью [8].

При интенсивном культивировании высших съедобных и лекарственных базидиомицетов определяющую роль в получении высокого выхода плодовых тел, наряду с подбором субстрата и строгим соблюдением технологического режима, играет качество посевного мицелия [3]. Одним из основных способов получения посевного мицелия ксилотрофных грибов является глубинное культивирование. Оно направлено на получение большого количества посевного мицелия при переходе к промышленному производству плодовых тел грибов, на производство грибной биомассы для пищевых целей, лекарственных препаратов и ценных биологически активных веществ [63].

В качестве исследуемых жидких питательных сред для получения посевного мицелия были предложены следующие образцы: глюкозо-пептонная среда (контроль); среда с молочной сывороткой; среда со свекловичной мелассой.

Процесс роста мицелия контролировали по интенсивности потребления сахаров в среде. Накопление биомассы прекращали при снижении концентрации

редуцирующих веществ менее 0,4 %. Критерием оценки качества среды служило количество биомассы, полученное к концу выращивания.

В большинстве работ отмечается увеличение скорости роста мицелия в глубинной культуре по сравнению с поверхностным ростом [63]. Известно также, что высокопродуктивные штаммы в поверхностной культуре не всегда оказываются лучшими в глубинных условиях [27].

Известно, что состав питательной среды является одним из факторов, в наибольшей степени влияющим на рост грибов. При этом значительные различия в отношении к питательной среде наблюдаются не только между видами, но и между штаммами [111, 118].

В связи с этим сравнение роста испытуемых грибов было проведено на трех различных питательных средах.

Глюкозо-пептонная (ГП) среда. ГП среда является классической средой для выращивания высших базидиомицетов и используется в большинстве опытов по физиологии грибов. Эта среда является вполне благоприятной для роста сапротрофных грибов [5].

На ГП среде в поверхностных условиях штаммы *L. edodes* F-1000 и *G. frondosa* 2639 образовывали плотные войлочные пленки белого цвета различной толщины, тогда как *A. mellea* D-13 образовывал разветвленные нитеобразные гифы белого цвета, пронизывающие всю питательную среду (рисунок 3.11).

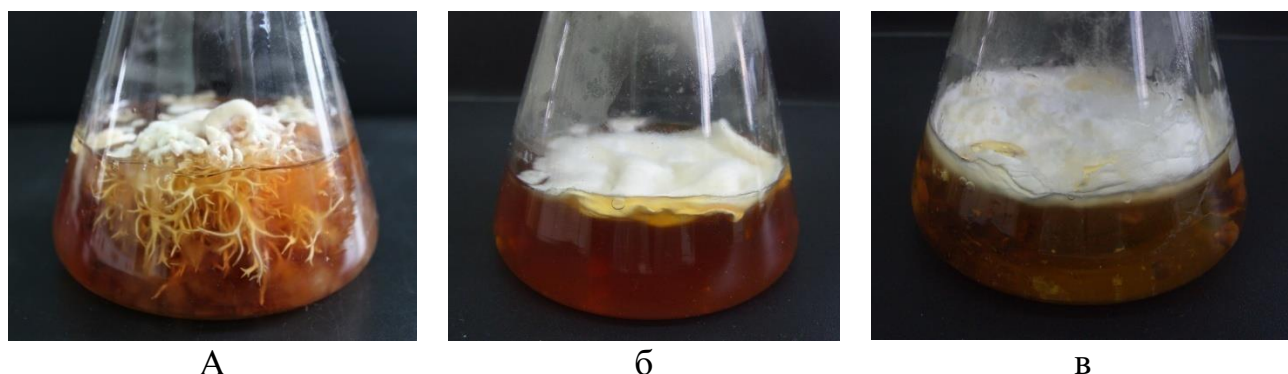


Рисунок 3.11 – Поверхностная культура мицелия испытуемых грибов на ГП среде: а – *A. mellea* D-13, б – *L. edodes* F-1000, в – *G. frondosa* 2639

Сравнение данных по биомассе мицелия показало, что штамм *A. mellea* D-13 по выходу биомассы превосходит штаммы *L. edodes* F-1000 и *G. frondosa* 2639, хотя при этом следует учесть длительный период культивирования. Интересно отметить, что величины масс поверхностных мицелиальных пленок *L. edodes* F-1000 и *G. frondosa* 2639 различаются несущественно (таблица 3.5).

Таблица 3.5 – Биомасса мицелия грибов в зависимости от условий жидкофазного культивирования

Культура гриба	Условия культивирования	Время культивирования, сутки	РВ, %	Выход сухой биомассы, г/л
1	2	3	4	5
<i>A. mellea</i> D-13	I	14	0,00	5,10±0,18
	II	28	0,00	16,48±0,19
<i>L. edodes</i> F-1000	I	12	0,00	8,00±0,16
	II	10	0,00	6,50±0,19
<i>G. frondosa</i> 2639	I	10	0,00	14,80±0,18
	II	10	0,00	7,28±0,17

Примечание: Условия культивирования I –глубинные, II – поверхностные

На рисунке 3.12 показана динамика накопления биомассы мицелия грибов на ГП среде.

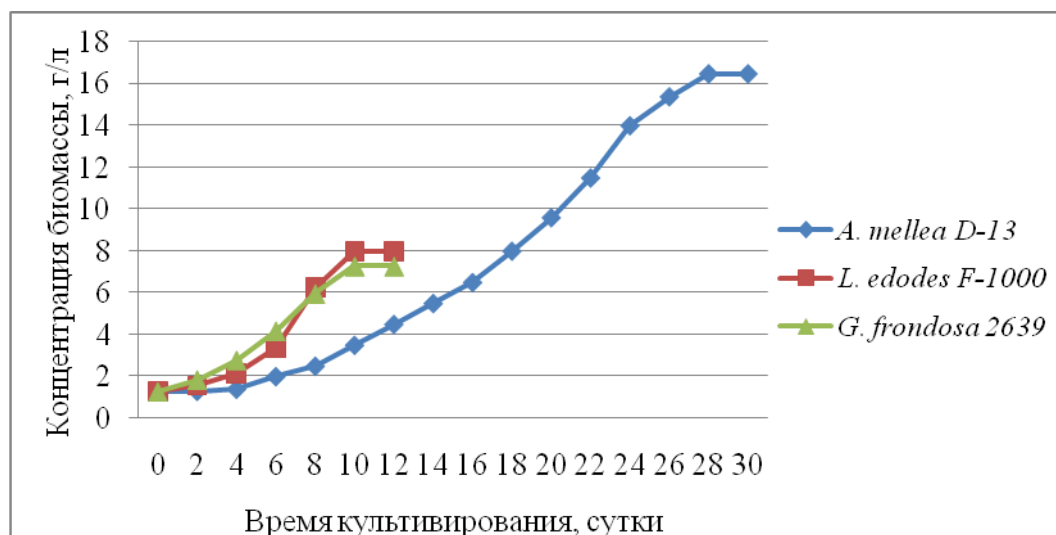


Рисунок 3.12 – Динамика накопления биомассы мицелия грибов в стационарных условиях на ГП среде

Разница в накоплении биомассы мицелия *A. mellea* D-13 в сравнении с *L. edodes* F-1000 и *G. frondosa* 2639 в наибольшей степени выражена после 14 суток культивирования. При этом практически не различаются по накоплению биомассы в изучаемых условиях штаммы *L. edodes* F-1000 и *G. frondosa* 2639 на протяжении всего периода культивирования.

Таким образом, существенные различия в количественных показателях роста *A. mellea* D-13 на ГП среде, в сравнении с *L. edodes* F-1000 и *G. frondosa* 2639, наблюдаются только при относительно продолжительном культивировании.

Максимальный выход мицелия у *A. mellea* D-13 был получен на 28-е сутки и составлял 16,48 г/л, у *G. frondosa* 2639 на 10-е сутки – 7,28 г/л, *L. edodes* F-1000 накапливал 8,00 г/л мицелия также на 10-е сутки культивирования (таблица 4.5).

3.4.2 Динамика роста и накопления биомассы мицелия в глубинной культуре

При выращивании в глубинных условиях на качалке культуры грибов *A. mellea* D-13 и *L. edodes* F-1000 образовывали пеллеты диаметром 0,2–1,0 мм. Мицелий *G. frondosa* 2639 образовывал крупные шарообразные скопления биомассы диаметром 1,5–5,0 мм (рисунок 3.13).

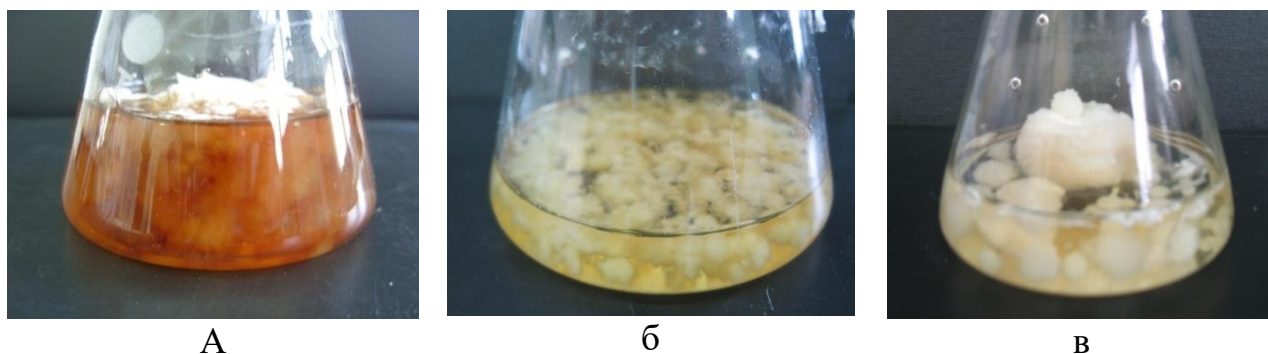


Рисунок 3.13 – Глубинная культура мицелия грибов на ГП среде:

а – *A. mellea* D-13, б – *L. edodes* F-1000, в – *G. frondosa* 2639

На рисунке 3.14 показана динамика накопления биомассы мицелия грибов на ГП среде.

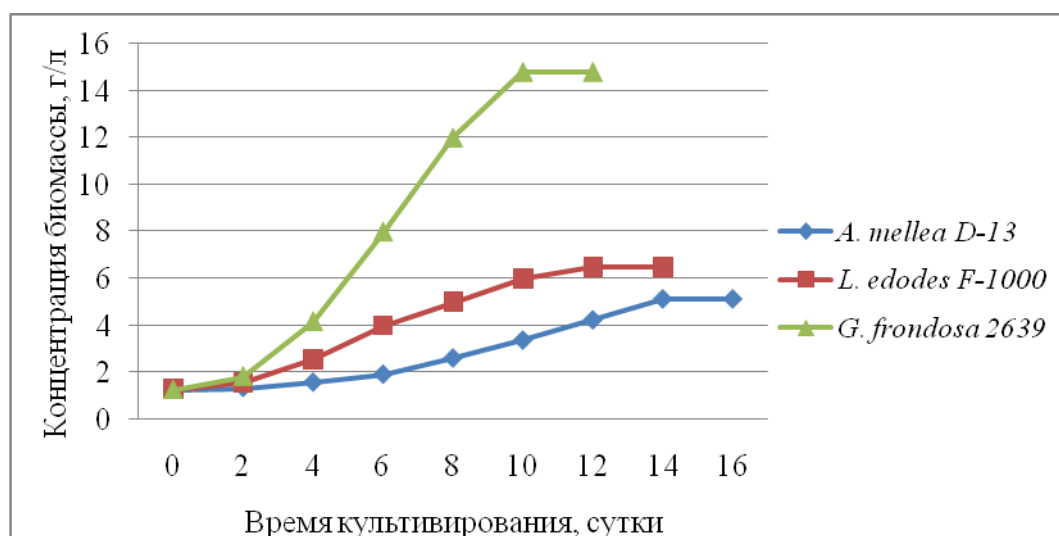


Рисунок 3.14 – Динамика накопления биомассы мицелия грибов в динамических глубинных условиях на ГП среде

Как видно из рисунка, ярко выражена разница в накоплении биомассы штаммом *G. frondosa* 2639, в сравнении с *A. mellea* D-13 и *L. edodes* F-1000. При культивировании в динамических глубинных условиях максимальный выход мицелия был получен у *G. frondosa* 2639 – 14,80 г/л на 10-е сутки, у *L. edodes* F-1000 – 6,50 г/л на 12-е сутки и у *A. mellea* D-13 – 5,10 г/л на 14-е сутки культивирования (таблица 4.5).

Таким образом, было отмечено, что при жидкофазном культивировании на ГП среде выход биомассы мицелия у *A. mellea* D-13 в поверхностных условиях был в 3,2 раза выше, чем в глубинных. Хотя при этом следует учесть длительный период культивирования. Противоположный эффект оказали глубинные условия на штаммы *L. edodes* F-1000 и *G. frondosa* 2639, биомасса мицелия которых, была в 1,2 и 2,0 раза выше, соответственно, чем в поверхностных условиях. В связи с тем, что процесс накопления биомассы мицелия *A. mellea* D-13 в поверхностных условиях культивирования занимает много времени (28 суток), дальнейшее его исследование было проведено в глубинных условиях. Далее исследован рост мицелия на экономически целесообразных средах, в том числе свекловичной мелассе и молочной сыворотке.

Среда с молочной сывороткой. Молочная сыворотка содержит от 5,0 до 6,5 % сухих веществ. Наряду с основным компонентом – лактозой (4,0 %), в ней содержатся комплекс витаминов, легкоусвояемые белки, макро- и микроэлементы [35].

Ксилотрофные грибы способны синтезировать β -галактозидазу и, следовательно, обладают способностью усваивать лактозу без предварительного гидролиза [22].

В опыте использовали творожную молочную сыворотку. Содержание сухих веществ в ней составляло (6,15 %). Культуры грибов выращивали на молочной сыворотке с разведением водой 1:1.

Культуральная жидкость вышеперечисленных грибов на молочной сыворотке имеет бледно-песочный цвет (по Бондарцеву) и специфический запах с примесью цветочных компонентов. При выращивании в глубинных условиях на качалке штаммы *A. mellea* D-13 и *L. edodes* F-1000 образовывали пеллеты преимущественно круглые и продолговатые с закруглыми концами диаметром 0,2–1,0 мм. В то время как мицелий *G. frondosa* 2639 – крупные шарообразные скопления биомассы (рисунок 3.15).

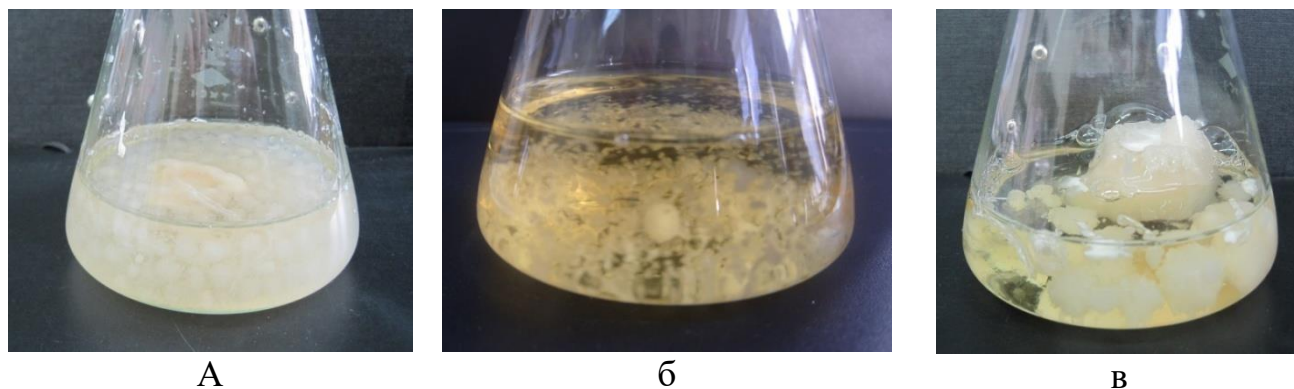


Рисунок 3.15 – Глубинные культуры мицелия на среде с молочной сывороткой:

а – *A. mellea* D-13, б – *L. edodes* F-1000, в – *G. frondosa* 2639

Сравнительные характеристики накопления биомассы *A. mellea* D-13, *L. edodes* F-1000 и *G. frondosa* 2639 показаны на рисунке 3.16.

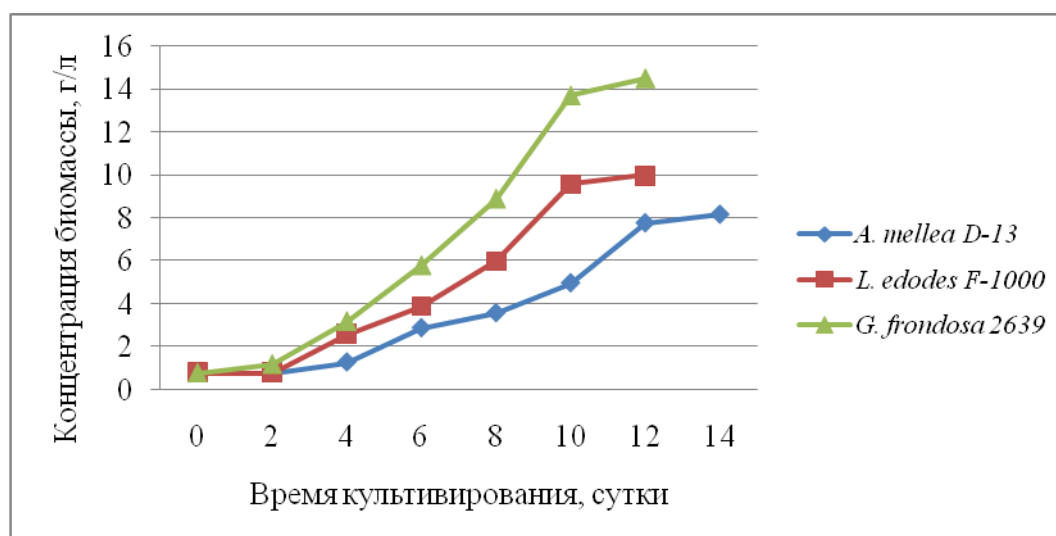


Рисунок 3.16 – Динамика накопления биомассы мицелия грибов на среде с молочной сывороткой

Из рисунка 3.16 видно, что наибольшее накопление биомассы дает штамм *G. frondosa* 2639. Следует отметить, что рост мицелия *A. mellea* D-13, *L. edodes* F-1000 и *G. frondosa* 2639 на этой питательной среде не отстает от роста на ГП среде.

Выход сухой биомассы мицелия вышеперечисленных грибов на среде с молочной сывороткой представлен в таблице 3.6.

Таблица 3.6 – Выход сухой биомассы мицелия грибов на среде с молочной сывороткой

Культура гриба	Время культивирования, сутки	РВ, %	Выход сухой биомассы, г/л
<i>A.mellea</i> D-13	14	0,00	8,20±0,20
<i>L. edodes</i> F-1000	12	0,00	10,00±0,21
<i>G. frondosa</i> 2639	12	0,00	14,50±0,23

Таким образом, показано, что грибы *A. mellea* D-13, *L. edodes* F-1000 и *G. frondosa* 2639 обладают хорошим ростом на среде с молочной сывороткой. При этом наибольшим накоплением биомассы обладает штамм *G. frondosa* 2639.

Среда со свекловичной мелассой. Меласса представляет собой отход свеклосахарного производства и является часто используемым и доступным сырьем для микробиологического производства. На 50 % меласса состоит из

сахарозы. В большинстве питательных сред мелассу разводят водой, подкисляют и добавляют к ней микроэлементы [101]. Однако не все грибы способны расти на среде с мелассой. По данным Бисько Н.А. и др. из 32 изученных видов на среде с мелассой росли только 15 [10].

Характер роста мицелия *A. mellea* D-13, *L. edodes* F-1000 и *G. frondosa* 2639 мало отличался от роста на ГП среде.

На рисунке 3.17 показана динамика накопления биомассы мицелия грибов на среде с мелассой.

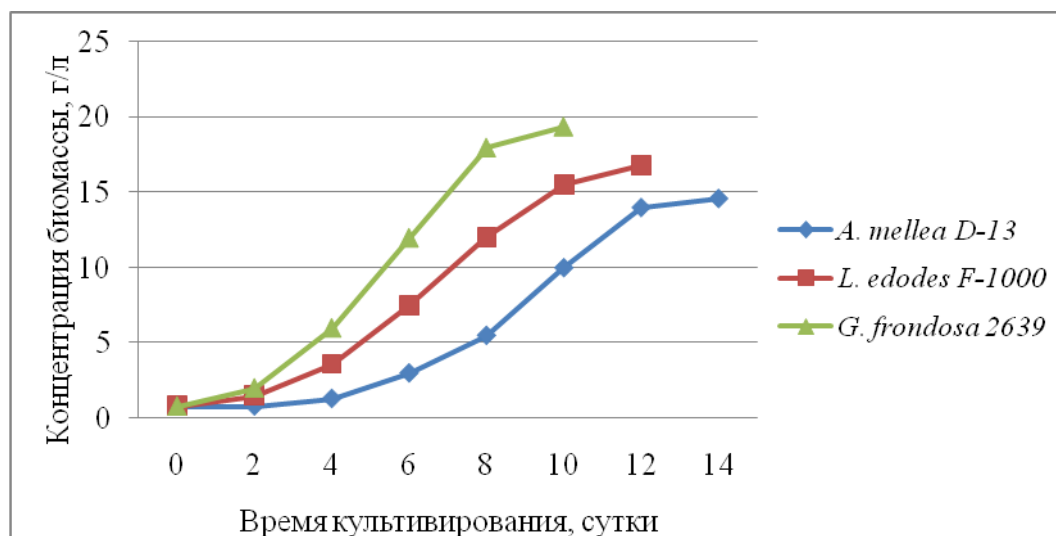


Рисунок 3.17 – Динамика накопления биомассы грибов на среде с мелассой

Наибольшее накопление мицелия отмечено у штамма *G. frondosa* 2639 (таблица 3.7).

Таблица 3.7 – Выход сухой биомассы мицелия на среде с мелассой

Культура гриба	Время культивирования, сутки	РВ, %	Выход сухой биомассы, г/л
<i>A.mellea</i> D-13	14	0,00	14,60±0,16
<i>L.edodes</i> F-1000	12	0,00	16,80±0,19
<i>G.frondosa</i> 2639	10	0,00	19,40±0,18

Установлено, что свекловичная меласса является пригодной средой для глубинного культивирования грибов *A. mellea* D-13, *L. edodes* F-1000 и *G. frondosa* 2639, дающая выход 14,60 г/л, 16,80 г/л и 19,40 г/л, соответственно. При этом наиболее перспективным штаммом следует считать *G. frondosa* 2639. С точки

зрения технологии положительным качеством следует считать то, что культуральная жидкость на этой среде не обладает повышенной вязкостью, что значительно облегчает процесс фильтрации.

Таким образом, анализ полученных данных показал, что наиболее благоприятной средой для роста мицелия *A. mellea* D-13, *L. edodes* F-1000 и *G. frondosa* 2639 в глубинных условиях является среда со свекловичной мелассой, дающая выход, превышающий контроль в 2,86; 2,10 и 1,31 раза, соответственно. На среде с молочной сывороткой наблюдалось увеличение биомассы мицелия *A. mellea* D-13 и *L. edodes* F-1000 относительно контроля в 1,60 и 1,25 раза, соответственно. В то время как биомасса мицелия *G. frondosa* 2639 на ГП среде и среде с молочной сывороткой мало отличалась.

3.5 Изучение влияния витаминов на рост и развитие мицелия грибов в условиях глубинного культивирования

Одной из основных проблем при производстве мицелия съедобных и лекарственных грибов является создание оптимальных физиологических условий культивирования для достижения высокого и стабильного выхода биомассы [127, 49, 80]. Прежде всего, это касается решения проблемы увеличения скорости роста мицелия и его продуктивности. Одним из способов увеличения выхода высококачественного мицелия может быть введение витаминов на разных этапах онтогенеза грибов [6].

Многие авторы в своих работах показали стимулирующую роль витаминов [6, 7, 22, 51]. По их мнению, они эффективны в очень малых дозах и имеют специфическое действие на определенные этапы обмена веществ [7, 55, 97].

В настоящее время биологическая роль витаминов еще мало изучена применительно к базидиомицетам, но судя по имеющимся литературным данным, она весьма значительна [44, 48]. В связи с этим целесообразно было исследовать влияние витаминов на процесс получения мицелия изучаемых съедобных и лекарственных грибов.

Одним из основных показателей, определяющих экономическую эффективность той или иной биотехнологии, является продолжительность процесса получения целевого продукта [80, 135]. Поэтому при изучении влияния витаминов на рост мицелия, важным этапом является изучение динамики его накопления при культивировании на жидкой среде.

На среде с мелассой увеличение биомассы мицелия грибов в зависимости от времени культивирования отображается S-образными кривыми, что характерно для роста базидиомицетов [140, 141]. Анализ полученных зависимостей позволяет выделить у исследуемых грибов пять фаз роста. I – фаза (лаг-фаза) характеризуется самым низким приростом биомассы. Известно, что в этот период развития происходит настройка ферментной системы организма на компоненты питательной среды [164]. Длительность лаг-фазы у *A. mellea* D-13 составляет 4 суток, тогда как у *L. edodes* F-1000 и *G. frondosa* 2639 2 суток. Скорость роста мицелия возрастает и наступает II – фаза роста (фаза ускорения), период которой, у штаммов *A. mellea* D-13, *L. edodes* F-1000 и *G. frondosa* 2639 на среде с мелассой длится 2 суток. Затем рост мицелия переходит в III – фазу экспоненциального роста, в которой жизненная активность мицелия грибов становится заметно выше при сравнении с другими фазами роста. Продолжительность III фазы у *A. mellea* D-13 и *L. edodes* F-1000 составляет 6 суток, в то время как у *G. frondosa* 2639 – 4 суток. Считается, что в этой фазе наблюдается максимальная скорость деления клеток [164, 167]. После экспоненциальной фазы рост мицелия переходит в IV – фазу замедления. Известно, что уменьшение скорости роста мицелия связано с действием лимитирующих факторов среды – истощение питательных веществ и накопление метаболитов в замкнутой системе [171, 188]. При наступлении V – фазы стационарного роста нарастание биомассы практически прекращается. Максимальный выход мицелия у *A. mellea* D-13 был получен на 14-е сутки и составлял 14,6 г/л, у *L. edodes* F-1000 на 12-е сутки – 16,8 г/л, *G. frondosa* 2639 накапливал 19,4 г/л мицелия на 10-е сутки культивирования.

Наблюдения за ростом грибов в присутствии витаминов позволили получить следующие результаты, представленные в таблице 3.8.

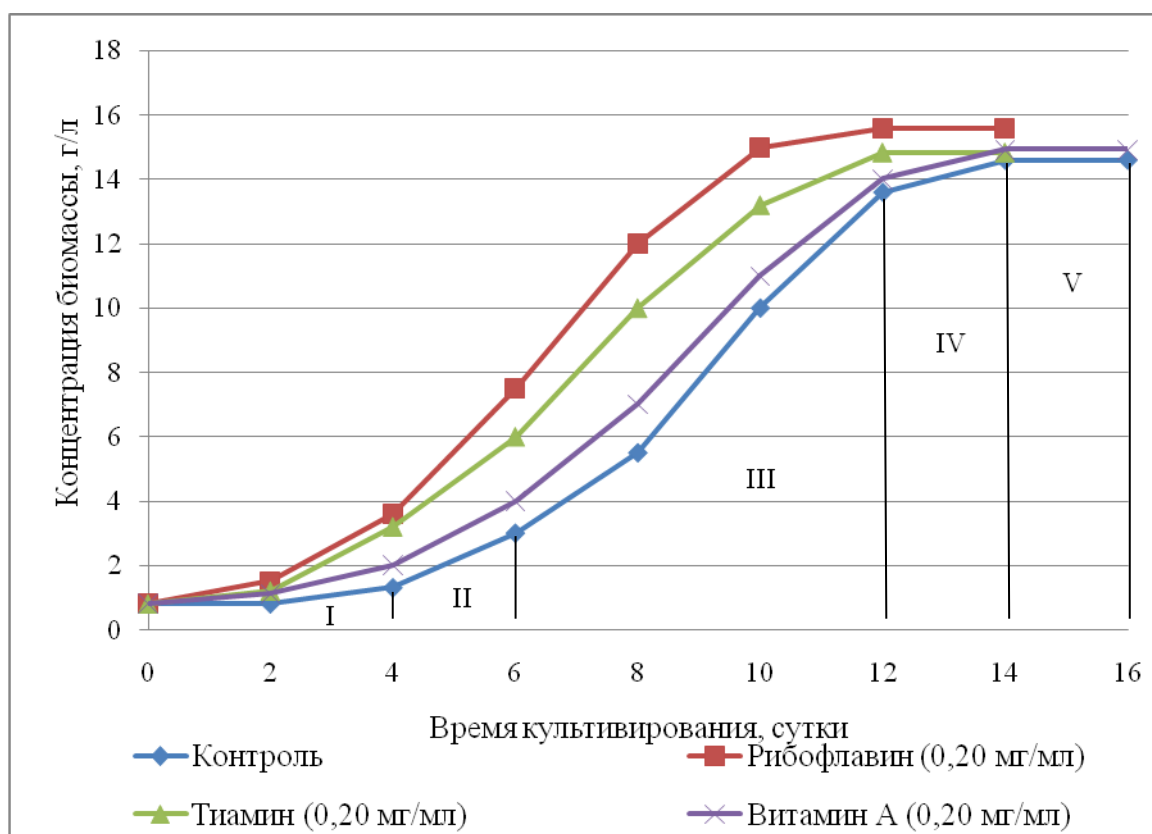
Таблица 3.8 – Выход биомассы мицелия грибов при внесении в среду с мелассой
витаминов

№	Концентрации, мг/мл	Выход сухой биомассы, г/л			% к контролю по биомассе мицелия		
		<i>A. mellea</i> D-13	<i>L. edodes</i> F-1000	<i>G. frondosa</i> 2639			
	Рибофлавин						
1	0,15	14,64	20,05	21,23	100,3	119,4	109,4
2	0,20	15,60	21,21	21,36	106,9	126,3	110,1
3	0,40	14,90	19,95	21,29	102,3	118,8	109,7
4	0,60	13,23	17,22	20,89	90,6	102,5	107,6
5	0,80	12,36	16,49	20,34	84,7	98,2	104,8
6	Контроль	14,60	16,80	19,40	100	100	100
	Тиамин						
1	0,15	14,55	18,76	22,58	99,7	111,7	116,4
2	0,20	14,84	22,26	23,03	101,7	132,5	118,7
3	0,40	14,73	22,68	22,44	100,9	135,0	115,4
4	0,60	11,62	18,90	21,23	79,6	112,5	109,7
5	0,80	11,57	17,22	20,25	79,3	102,5	104,3
6	Контроль	14,60	16,80	19,40	100	100	100
	никотиновая кислота						
1	0,15	12,33	12,80	18,64	84,5	76,2	96,1
2	0,20	13,82	13,02	18,85	94,7	77,5	97,1
3	0,40	13,66	12,96	18,96	93,6	77,2	97,7
4	0,60	10,46	12,46	18,18	71,7	74,2	93,7
5	0,80	10,24	12,38	18,12	70,2	73,7	93,4
6	Контроль	14,60	16,80	19,40	100	100	100
	витамин С						
1	0,15	11,85	14,48	22,38	81,2	86,2	115,3
2	0,20	12,45	14,46	22,88	85,3	86,7	117,9
3	0,40	12,78	14,28	22,48	87,6	85,0	115,8
4	0,60	11,82	14,14	20,81	81,0	84,2	107,2
5	0,80	10,14	13,96	19,90	69,5	83,1	102,5
6	Контроль	14,60	16,80	19,40	100	100	100
	п- аминобензойная кислота						
1	0,15	12,56	13,60	18,84	86,0	80,9	97,1
2	0,20	12,83	13,72	19,18	87,8	81,6	98,8
3	0,40	12,64	13,44	18,94	86,5	80,0	97,6
4	0,60	10,42	13,33	18,69	71,3	79,3	96,3
5	0,80	10,27	13,02	18,07	70,3	77,5	93,1
6	Контроль	14,60	16,80	19,40	100	100	100
	Биотин						
1	0,15	14,33	17,12	18,70	98,1	101,9	96,3
2	0,20	14,52	17,56	19,35	99,4	104,5	99,7
3	0,40	14,12	16,96	19,30	97,2	100,9	99,4
4	0,60	12,49	16,27	18,75	85,5	96,8	96,6
5	0,80	10,22	16,50	18,62	69,8	98,2	95,9

Окончание таблицы 3.8

№	Концентрации, мг/мл	Выход сухой биомассы, г/л			% к контролю по биомассе мицелия		
		<i>A. mellea</i> D-13	<i>L. edodes</i> F-1000	<i>G. frondosa</i> 2639			
6	Контроль	14,60	16,80	19,40	100	100	100
	мезо-инозит						
1	0,15	11,12	14,50	18,60	76,1	86,3	95,8
2	0,20	12,62	14,62	18,70	86,4	87,0	96,3
3	0,40	11,76	14,22	19,24	80,5	84,6	99,1
4	0,60	10,89	14,16	18,42	74,5	84,2	94,9
5	0,80	9,14	13,92	18,12	62,6	82,8	93,4
6	Контроль	14,60	16,80	19,40	100	100	100
	витамин А						
1	0,15	14,38	14,60	19,00	98,4	86,9	97,9
2	0,20	14,93	14,78	19,20	102,2	87,9	98,9
3	0,40	14,43	14,35	19,15	98,8	85,4	98,7
4	0,60	12,67	13,92	18,96	86,7	82,8	97,7
5	0,80	12,62	13,90	18,56	86,4	82,7	95,6
6	Контроль	14,60	16,80	19,40	100	100	100
	смесь витаминов						
1	0,15	12,38	12,62	18,14	84,7	75,1	93,5
2	0,20	13,93	12,76	18,58	95,4	75,9	95,7
3	0,40	13,53	12,45	17,96	92,6	74,1	92,5
4	0,60	12,57	12,34	17,75	86,0	73,4	91,4
5	0,80	12,52	12,02	17,12	85,7	71,5	88,2
6	Контроль	14,60	16,80	19,40	100	100	100
Примечание: относительная погрешность для биомассы мицелия $\pm 0,20-0,50$ %							

Из таблицы 3.8 видно, что наибольший выход мицелия *A. mellea* D-13 на среде с мелассой достигался с рибофлавином в концентрации 0,20 мг/мл и составлял 15,60 г/л, уже через 12 суток культивирования, по биомассе мало отличаясь от контроля. Стимулирующий эффект в той же концентрации наблюдался с добавлением в среду с мелассой тиамин и витамина А, биомасса мицелия *A. mellea* D-13 при сравнении с контролем также различалась незначительно и составила 14,84 и 14,93 г/л, через 12 и 14 суток, соответственно (рисунок 3.18).

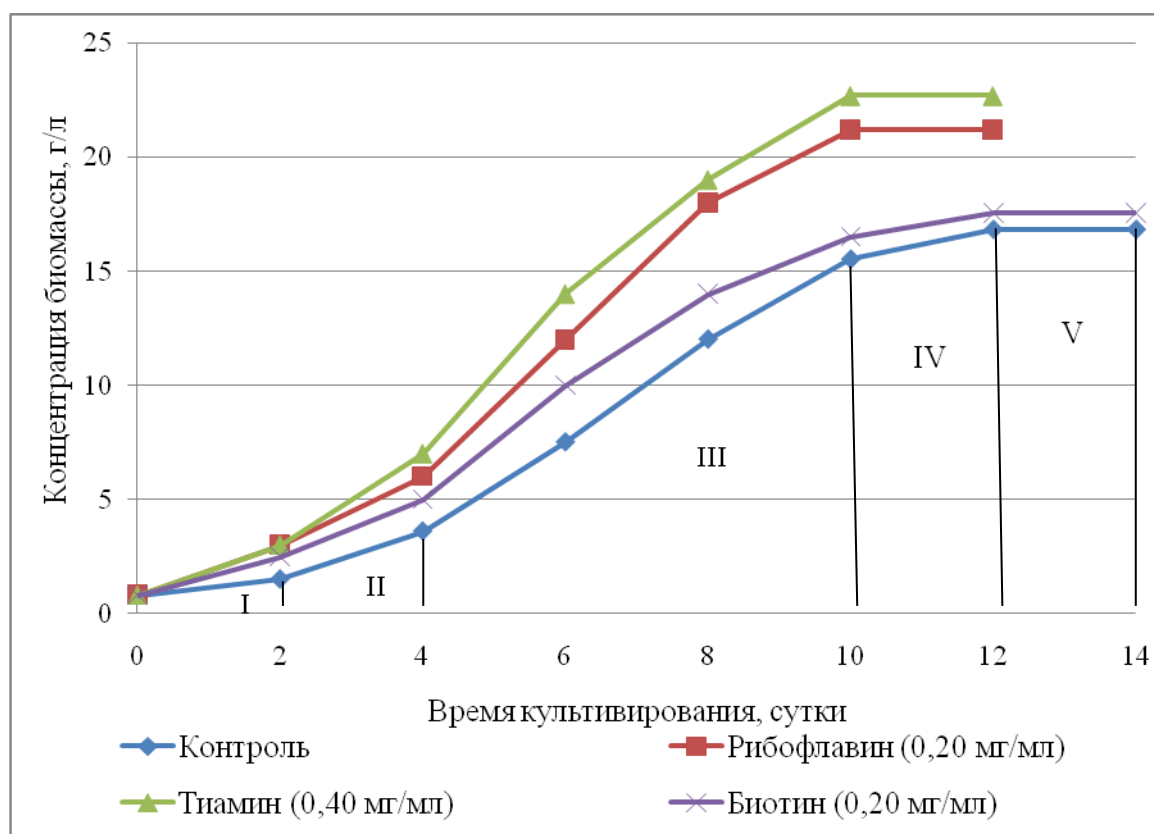


I – лаг-фаза; II – фаза ускорения; III – экспоненциальная фаза; IV – фаза замедления; V – стационарная фаза

Рисунок 3.18 – Динамика накопления биомассы мицелия *A. mellea* D-13 на среде с мелассой с добавлением витаминов

Характер роста мицелия *A. mellea* D-13 с добавлением этих витаминов отличается от контроля сокращением экспоненциальной фазы роста. Добавление в среду с мелассой никотиновой, п-аминобензойной кислот, витамина С, биотина, мезо-инозита и смеси витаминов с концентрациями 0,15; 0,20; 0,40; 0,60 и 0,80 мг/мл, а также рибофлавина и тиамин с концентрациями свыше 0,60 мг/мл вызывало ингибирование роста мицелиальных клеток по отношению к контролю.

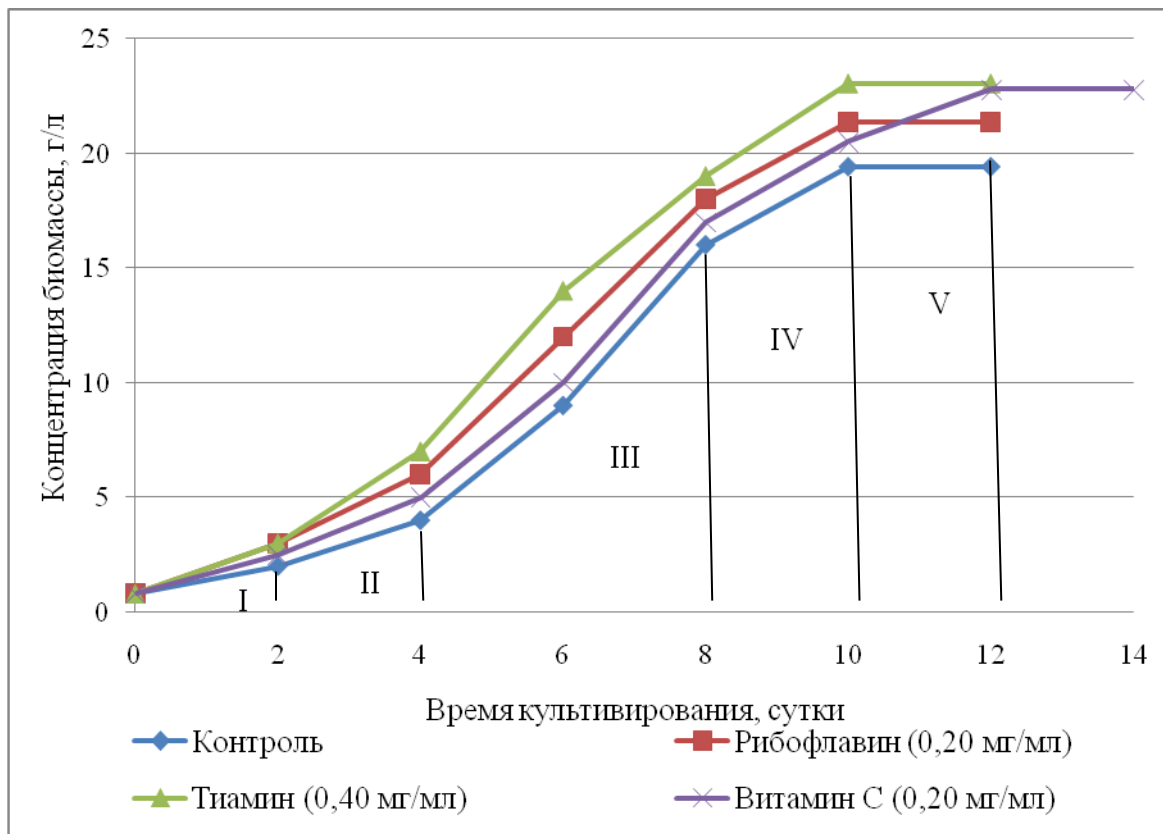
При выборе витаминов для культивирования *L. edodes* F-1000 также следует отдавать предпочтение рибофлаvinу (0,20 мг/мл) и тиамину (0,40 мг/мл) (рисунок 3.19), увеличение биомассы мицелия в сравнении с контролем в 1,26–1,35 раза, соответственно (таблица 3.8).



I – лаг-фаза; II – фаза ускорения; III – экспоненциальная фаза; IV – фаза замедления; V – стационарная фаза

Рисунок 3.19 – Динамика накопления биомассы мицелия *L. edodes* F-1000 на среде с мелассой с добавлением витаминов

При росте *G. frondosa* 2639 на среде с мелассой максимальное накопление биомассы достигалось с тиамином в концентрации 0,40 мг/мл и составляло 23,03 г/л, что превышает контроль в 1,19 раза. На среде с мелассой, содержащей рибофлавин (0,20 мг/мл) и витамин С (0,20 мг/мл), весовые характеристики мицелия *G. frondosa* 2639 превышали контроль в 1,10–1,17 раза, соответственно (рисунок 3.20).



I – лаг-фаза; II – фаза ускорения; III – экспоненциальная фаза; IV – фаза замедления; V – стационарная фаза

Рисунок 3.20 – Динамика накопления биомассы мицелия *G. frondosa* 2639 на среде с мелассой с добавлением витаминов

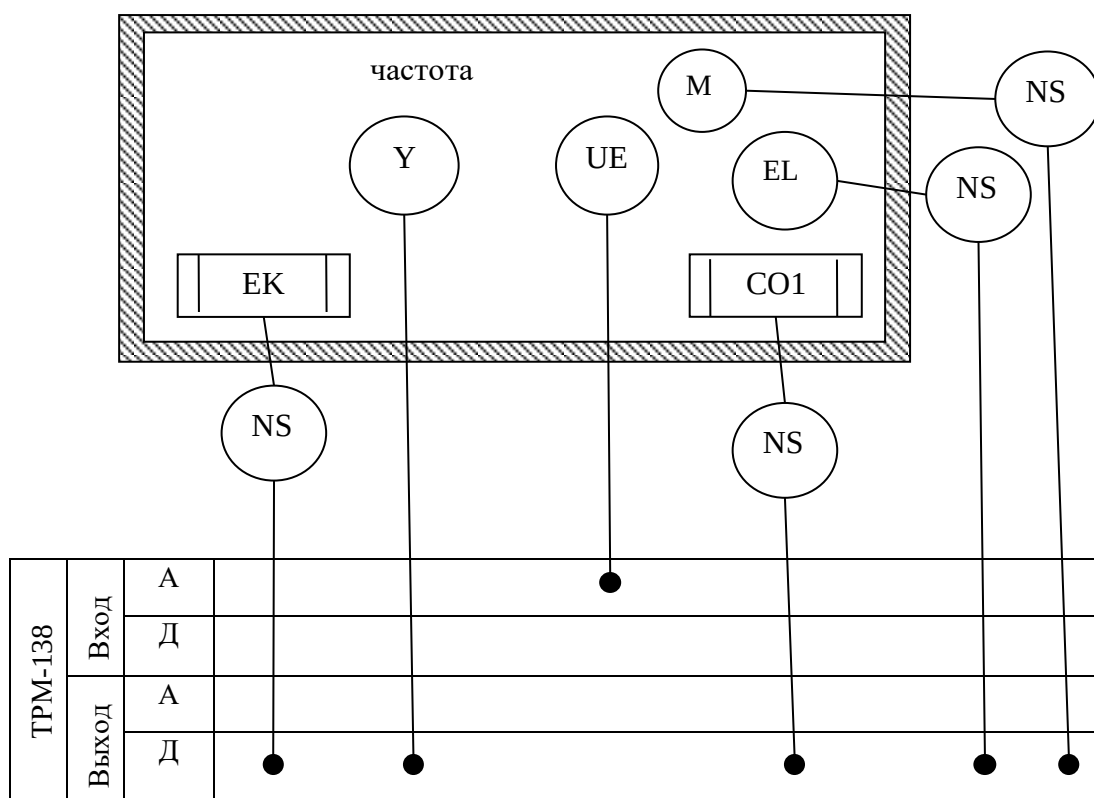
Таким образом, сравнивая данные, полученные на контрольной и витаминизированных средах, было установлено как положительное, так и отрицательное влияние добавления витаминов в концентрациях 0,15; 0,20; 0,40; 0,60 и 0,80 мг/мл в среду с мелассой на рост и развитие мицелия *A. mellea* D-13, *L. edodes* F-1000 и *G. frondosa* 2639. Установлено, что рибофлавин и тиамин оказывают стимулирующее действие на интенсификацию ростовых процессов у мицелия испытываемых грибов. При использовании оптимальной концентрации этих витаминов (0,20 мг/мл) достигалось увеличение биомассы мицелия *L. edodes* F-1000 в 1,26–1,35 раза, соответственно. Показано, что добавление в среду с мелассой смеси витаминов, стимулирующий эффект рибофлавина и тиамина по накоплению биомассы мицелия *L. edodes* F-1000 и *G. frondosa* 2639 был ниже в 1,66–1,74 и 1,14–1,24 раза, соответственно, чем с каждым отдельным витамином.

Мезо-инозит, никотиновая и п-аминобензойная кислоты, проявили себя не столь эффективными для стимуляции ростовых процессов у *A. mellea* D-13, *L. edodes* F-1000 и *G. frondosa* 2639.

3.6 Изучение влияния состава субстратов на время культивирования и выход плодовых тел грибов

Посевной мицелий, выращенный на среде с мелассой инокулировали в количестве 15 % от массы сухого субстрата. После инокуляции субстраты выдерживали в термостате при температуре 26 ± 1 °C для *A. mellea* D-13 и *L. edodes* F-1000, 28 ± 1 °C для *G. frondosa* 2639 до полного зарастания мицелием.

После полной колонизации субстрата во всех образцах крышки с фильтром удаляли, поверхность субстрата срезали (слой 10 мм), затем помещали в камеру роста оборудованной нагревательным и охлаждающим элементами (Microlife FH-80 и Бирюса-310Е), ультразвуковым увлажнителем (AIR-O-SWISS), датчиком влажности и температуры (ДВТ-02), вентилятором (DeerCool), светодиодной лампой (LED-A60) (рисунок 3.21).



ТРМ-138 – блок регулирования; А – аналоговый сигнал; Д – дискретный сигнал; NS – контактор; ЕК – нагревательный элемент; CO1 – охлаждающий элемент; М – вентилятор; Y– ультразвуковой увлажнитель; UE – датчик влажности и температуры; EL – светодиодная лампа

Рисунок 3.21 – Схема камеры роста

В результате ферментативной деятельности грибов происходит разложение субстратов, которое сопровождается изменением массы, степенью их зарастания мицелием, а также изменением их механических свойств.

С целью установления характера изменений, происходящих в субстратах в процессе зарастания их мицелием грибов, была изучена динамика их активности (рисунки 3.22, 3.23, 3.24).

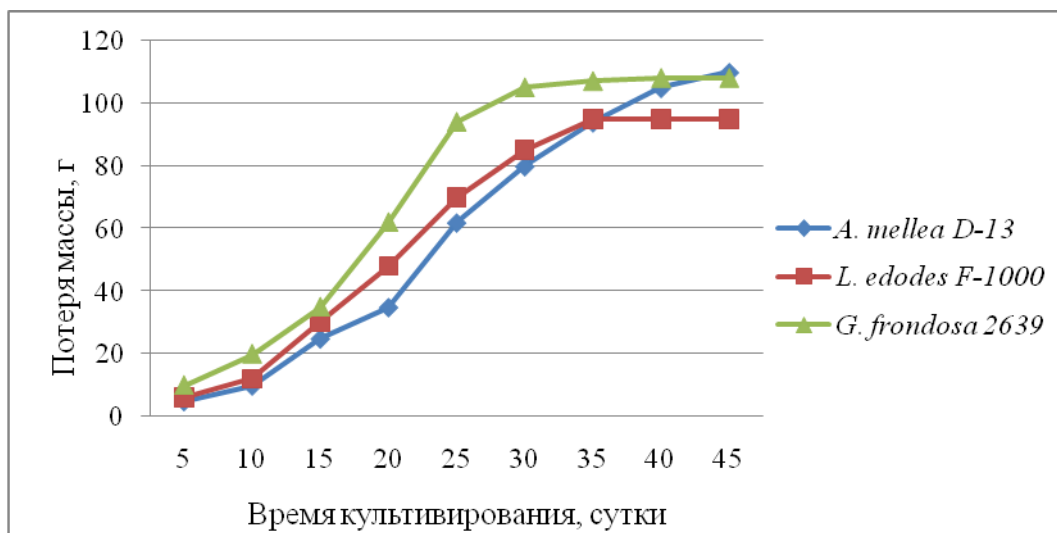


Рисунок 3.22 – Динамика зарастания субстрата (образец №1) грибами

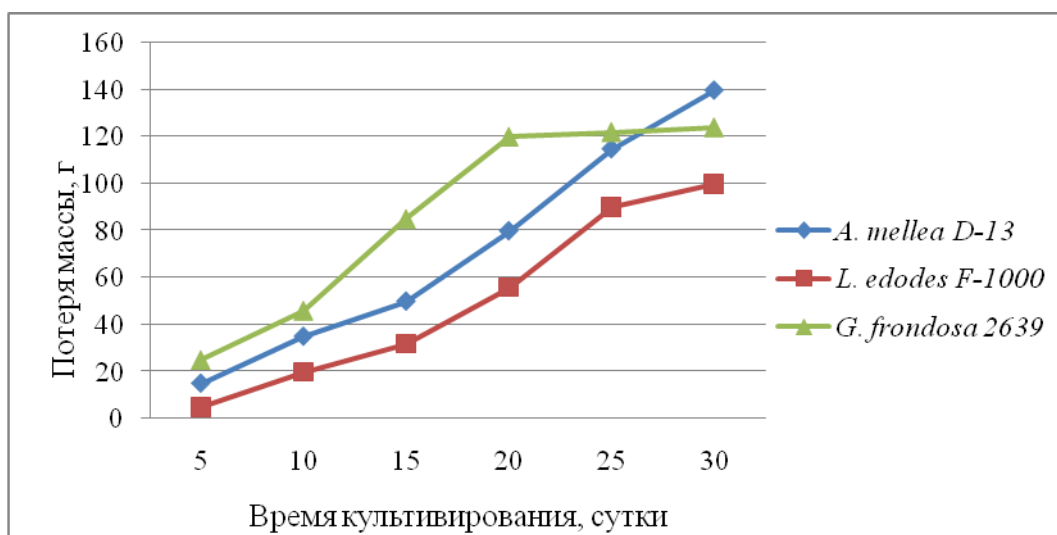


Рисунок 3.23 – Динамика зарастания субстрата (образец №2) грибами

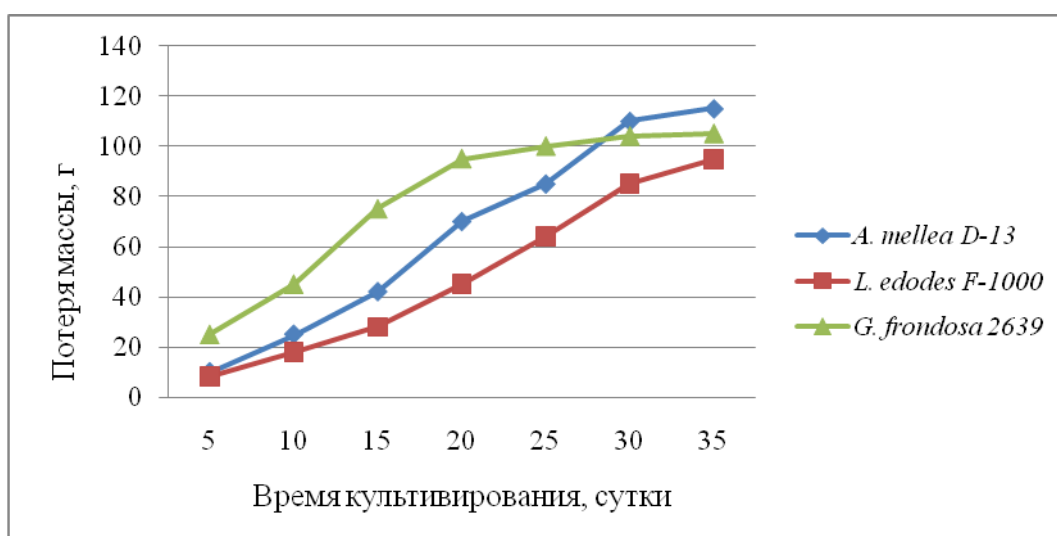


Рисунок 3.24 – Динамика зарастания субстрата (образец №3) грибами

В процессе разложения субстратов были выделены три фазы, отличающиеся как по длительности, так и интенсивности разложения. Первая фаза зарастания субстратов характеризуется низким порогом активности и продолжается у грибов *A. mellea* D-13, *L. edodes* F-1000 и *G. frondosa* 2639 от 5 до 10 суток (образец №1). Этот период обусловлен существованием лаг-фазы роста грибов, в которой происходит адаптация мицелия к субстратам. В первой фазе разрастания мицелия наибольшая скорость роста была обнаружена у штамма *G. frondosa* 2639. Наиболее высокая степень зарастания субстратов у всех испытуемых грибов наблюдалась в образце №2. Вторая фаза зарастания характеризуется максимальной активизацией процесса, у *A. mellea* D-13 происходит в период с 10 по 40 сутки, *L. edodes* F-1000 – 10–30 сутки и у *G. frondosa* 2639 – 10–25 сутки культивирования на березовых опилках (образец №1). Во второй фазе скорость зарастания мицелия была более высокой на субстрате с березовыми опилками, обогащенными пшеничными отрубями (3:1). Среди испытуемых грибов наиболее активным был также штамм *G. frondosa* 2639.

При наступлении 3 фазы происходит снижение активности роста мицелия, что объясняется истощением источников питания и накоплением в среде продуктов метаболизма. К этому времени степень зарастания субстратов визуально отличается в зависимости от их состава. Снижение интенсивности разложения субстратов у *A. mellea* D-13 наблюдается в период с 40 по 45 сутки роста у *L. edodes* F-1000 30–35 и у *G. frondosa* 2639 25–30 сутки культивирования на березовых опилках (образец №1). Полностью заросшие субстраты переходят в стадию формирования плодовых тел.

На субстратах с березовыми опилками плодовые тела *A. mellea* D-13 появлялись редко. В одних случаях их образование происходило при подсыхании субстрата, в других – увлажнении. Однако закономерности в появлении плодовых тел на субстратах с древесиной березы не наблюдалось.

Наибольшее количество примордиев появлялось в стеклобанках с березовыми опилками, обогащенными пшеничными отрубями – около 30 штук. На остальных субстратах примордиев было в 2–2,5 раза меньше. Спустя 3 суток

после их появления часть примордиев деформировались и уменьшались в размерах. В дальнейшем в каждой стеклoбанке развивались и росли по 8–12 плодовых тел. Их размеры колебались в следующих пределах: диаметр шляпки от 10 до 15 мм, высота ножки – 35–40 мм, диаметр ножки – 10–15 мм. Через 4 суток после появления примордиев в каждой стеклoбанке продолжали развиваться по 5–8 плодовых тел. Формирование их происходило в течение 2 суток. На 9 сутки плодовые тела достигали максимальных размеров: диаметр шляпки от 30 до 35 мм, высота ножки – 85–100 мм, диаметр ножки – 20–25 мм. Средняя масса плодовых тел составляла 14 г (рисунок 3.25).

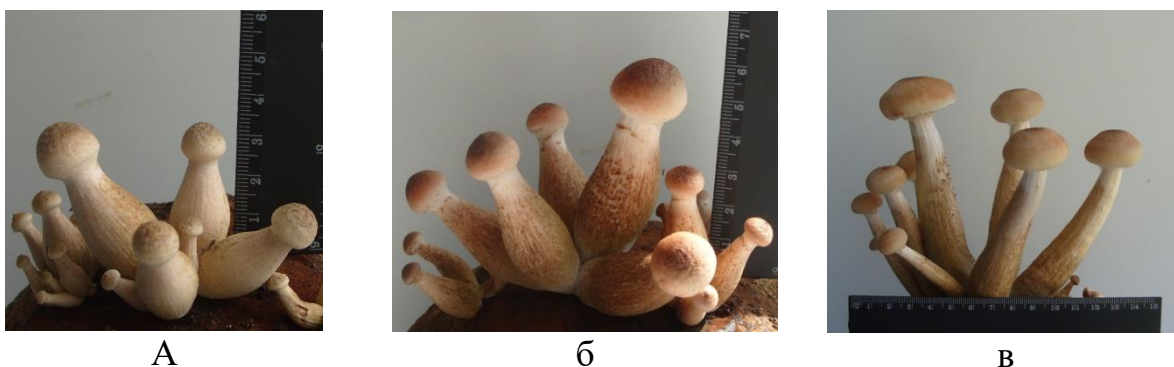


Рисунок 3.25 – Поэтапное формирование плодовых тел *A. mellea* D-13 на субстрате с березовыми опилками, обогащенными пшеничными отрубями (образец №2): а) сформировавшиеся примордии после 23 суток инкубации в камере роста; б) формирование плодовых тел после 27 суток инкубации в камере роста; в) формирование плодовых тел после 29 суток инкубации в камере роста.

Формирование шляпки в первые четверо суток происходило медленно, в следующие 5 суток наблюдался наибольший прирост шляпки по диаметру. На 12-тые сутки плодовые тела начали подсыхать, размеры их уменьшались. Шляпка плодовых тел приобретала желтовато-бурый цвет с более темными чешуйками. Пластинки буроватые, мякоть белая с приятным, ярко выраженным, грибным запахом. На ножке образовывалось кольцо. Следует отметить, что плодовые тела, выросшие на березовых опилках (образец №1), не уступают по размерам и скорости формирования плодовым телам, выросшим на березовых опилках с добавлением пшеничных отрубей (образец №2) и пивной дробины (образец №3).

В итоге, период культивирования *A. mellea* D-13 с первой волной плодоношения на всех исследуемых субстратах значительно отличался и составлял 51–72 суток в образце №2, 55–75 суток в образце №3 и 65–85 суток в образце №1 (таблица 3.9). Это, прежде всего, объясняется составом субстратов, что значительно влияет на деструктивную активность мицелия *A. mellea* D-13.

Таблица 3.9 – Скорость формирования плодовых тел *A. mellea* D-13 с первой волной плодоношения

Образец субстрата	Начало плодоношения, сутки	Формирование примордиев, сутки	Образование плодовых тел, сутки
1. Березовые опилки (контроль)	56–76	59–79	65–85
2. Березовые опилки/пшеничные отруби (3:1)	42–63	45–66	51–72
3. Березовые опилки/пивная дробина (3:1)	46–66	49–69	55–75

Одним из основных факторов, определяющих пригодность используемого растительного материала в качестве субстрата, является высокий выход плодовых тел [123]. В среднем за три года наибольший выход плодовых тел *A. mellea* D-13 (10,62 %) была получена на березовых опилках с добавлением пшеничных отрубей. Это в 1,83 раза больше, чем у контроля. Менее высокие урожаи были получены и на субстрате с пивной дробинкой (таблица 3.10).

Таблица 3.10 –Выход *A. mellea* D-13 в зависимости от состава субстрата

Образцы субстрата	Номер сбора грибов	Период от инокуляции до первого сбора и между сборами, сутки	Выход плодовых тел, г/ед. субстрата	Выход, %
1. Березовые опилки (контроль)	1	65–85	33,60±0,25	4,20±0,25
	2	16–20	12,88±0,25	1,61±0,25
	Σ		46,48±0,25	5,81±0,25
2. Березовые опилки + пшеничные отруби	1	51–72	58,48±0,23	7,31±0,23
	2	15–17	26,48±0,23	3,31±0,23
	Σ		84,96±0,23	10,62±0,23
3. Березовые опилки + пивная дробина	1	55–75	52,24±0,21	6,53±0,21
	2	16–20	20,32±0,21	2,54±0,21
	Σ		72,56±0,21	9,07±0,21

Несмотря на более высокий выход плодовых тел *A. mellea* D-13 в образцах №2 и №3 по сравнению с контролем, их продуктивность в процентном выражении относительно низкая.

Таким образом, исследования показали, что для образования плодовых тел *A. mellea* D-13 в культуре необходимо строгое соблюдение условий культивирования. На субстратах с березовыми опилками без добавления питательных веществ (образец №1) плодовые тела опенка осеннего появлялись редко, и закономерности в их появлении не было. Наибольший выход плодовых тел была обнаружен на субстрате с березовыми опилками, обогащенными пшеничными отрубями (образец №2). Формирование плодовых тел *A. mellea* D-13 на субстратах, по времени совпадало с плодоношением опенка осеннего в естественных условиях.

При культивировании *L. edodes* F-1000 наиболее высокие ростовые показатели были характерны для смеси березовых опилок с пшеничными отрубями (образец №2) и пивной дробинкой (образец №3). Формирование примордиев у штамма *L. edodes* F-1000 на этих субстратах происходило на 14 сутки культивирования в камере роста. При этом их количество в образце №2 составляло около 3 штук, в то время как в образце №3 – около 2. Образование плодовых тел было отмечено на 21 сутки выращивания в камере роста (рисунок 3.26).



А

Б

В

Рисунок 3.26 – Поэтапное формирование плодовых тел *L. edodes* F-1000 на субстрате с березовыми опилками, обогащенными пшеничными отрубями (образец №2): а) сформировавшиеся примордии после 14 суток инкубации в камере роста; б) формирование плодовых тел после 17 суток инкубации в камере роста; в) формирование плодовых тел после 21 суток инкубации в камере роста.

Соответственно формирование примордиев и образование плодовых тел в контрольном образце (березовые опилки) происходило в более поздний период времени – на 24, 31 сутки (таблица 3.11). Число сформировавшихся примордиев в образце №1 составляло около 1–2 штук.

Таблица 3.11 – Скорость формирования плодовых тел штамма *L. edodes* F-1000 с первой волной плодоношения

Образец субстрата	Начало плодоношения, сутки	Формирование примордиев, сутки	Образование плодовых тел, сутки
1. Березовые опилки (контроль)	56	59	63
2. Березовые опилки + пшеничные отруби (3:1)	37	40	44
3. Березовые опилки + пивная дробина (3:1)	43	46	50

Штамм *L. edodes* F-1000 формировал плодовые тела с распростертыми шляпками, сухой поверхностью темно-бурой окраски и преимущественно с чешуйками. Для штамма была характерна светло-бурая сплюснутая центральная ножка. Их размеры колебались в следующих пределах: диаметр шляпки от 50 до 90 мм, высота ножки – 40–65 мм, диаметр ножки – 10–15 мм. Средняя масса плодовых тел составляла 35,4 г.

Изучая возможность интенсивного культивирования штамма *L. edodes* F-1000 на различных лигноцеллюлозных субстратах, было установлено, что скорость зарастания субстратов и плодоношения грибов определяется качественным составом субстратов. Это положение подтверждают данные по выходу *L. edodes* F-1000 на испытуемых образцах субстрата (таблица 3.12).

Таблица 3.12 – Выход *L. edodes* F-1000 в зависимости от состава субстрата

Образцы субстрата	Номер сбора грибов	Период от инокуляции до первого сбора и между сборами, сутки	Выход плодовых тел, г/ед. субстрата	Выход, %
1. Березовые опилки (контроль)	1	63	62,24±0,18	7,78±0,18
	2	14–18	30,32±0,18	3,79±0,18
	Σ		92,56±0,18	11,57±0,18
2. Березовые опилки + пшеничные	1	44	129,36±0,16	16,17±0,16
	2	14–16	33,44±0,16	4,18±0,16
	Σ		162,80±0,16	20,35±0,16

Окончание таблицы 3.12

Образцы субстрата	Номер сбора грибов	Период от инокуляции до первого сбора и между сборами, сутки	Выход плодовых тел, г/ед. субстрата	Выход, %
отруби				
3. Березовые опилки + пивная дробина	1	50	86,24±0,19	10,78±0,19
	2	14–16	54,24±0,19	6,78±0,19
	Σ		140,48±0,19	17,56±0,19

Из таблицы 3.12 видно, что выход плодовых тел в контрольном образце составил 11,57 %, тогда как в образцах №2 и №3 – 20,35 % и 17,56 %, соответственно.

Таким образом, было показано, что наибольший выход *L. edodes* F-1000 был обнаружен на субстрате с березовыми опилками, обогащенными пшеничными отрубями (образец №2). Применение технологии интенсивного выращивания *L. edodes* F-1000 на лигноцеллюлозных отходах позволило повысить выход при сравнении с контролем в 1,76 раза.

При культивировании *G. frondosa* 2639 появление первых примордиев в образцах №2 и №3 было отмечено на 5-е сутки культивирования в камере роста, а в образце №1 на 8 сутки. При этом их формирование происходило в течение 3 суток во всех образцах субстратов.

Число сформировавшихся примордиев в образце №2 составляло около 30 штук, в то время как в образцах №1 и №3 их количество было меньше, около 15 штук. Первая волна плодоношения была отмечена на 10 сутки выращивания в камере роста на субстратах с березовыми опилками, обогащенными питательными добавками (образцы №2 и №3), в то время как на субстрате без обогащения (образец №1) на 17 сутки культивирования (рисунок 3.27).



Рисунок 3.27 – Поэтапное формирование плодовых тел *G. frondosa* 2639 на субстрате с березовыми опилками, обогащенными пшеничными отрубями (образец №2): а) сформировавшиеся примордии после 5 суток инкубации в камере роста; б) формирование плодовых тел после 7 суток инкубации в камере роста; в) формирование плодовых тел после 10 суток инкубации в камере роста.

Вторая волна образования плодовых тел наблюдалась на 21 сутки инкубации в камере роста, после выгонки плодовых тел с первой волны. Третья волна плодоношения – на 31 сутки инкубации. 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.

Существенных различий между исследуемыми субстратами по времени появления примордиев и длительности созревания плодовых тел не обнаружено (таблица 3.13).

Таблица 3.13 – Скорость формирования плодовых тел штамма *G. frondosa* 2639 с первой волной плодоношения

Образец субстрата	Начало плодоношения, сутки	Формирование примордиев, сутки	Образование плодовых тел, сутки
1. Березовые опилки (контроль)	36	38	43
2. Березовые опилки + пшеничные отруби (3:1)	22	24	29
3. Березовые опилки + пивная дробина (3:1)	26	28	33

Первая волна плодоношения превышала выход второй волны почти в 2 раза. Наибольший выход плодовых тел *G. frondosa* 2639 получен в варианте с использованием березовых опилок обогащенных пшеничными отрубями (образец №2) и составлял 33,50 %, в то время как березовые опилки с добавлением пивной дробины (образец №3) – 31,31 %. На субстрате с березовыми опилками (образец №1) выход составлял 28,88 % (таблица 3.14).

Таблица 3.14 – Выход *G. frondosa* 2639 в зависимости от состава субстрата

Образцы субстрата	Номер сбора грибов	Период от инокуляции до первого сбора и между сборами, сутки	Выход плодовых тел, г/ед. субстрата	Выход, %
1. Березовые опилки (контроль)	1	43	113,12±0,26	14,14±0,26
	2	7–8	73,60±0,26	9,20±0,26
	3	7–8	44,32±0,26	5,54±0,26
	Σ		231,04±0,26	28,88±0,26
2. Березовые опилки + пшеничные отруби (3:1)	1	29	134,00±0,23	16,75±0,23
	2	7–8	82,96±0,23	10,37±0,23
	3	7–8	51,04±0,23	6,38±0,23
	Σ		268,00±0,23	33,50±0,23
3. Березовые опилки + пивная дробина (3:1)	1	33	125,20±0,17	15,65±0,17
	2	7–10	73,60±0,17	9,20±0,17
	3	7–8	51,68±0,17	6,46±0,17
	Σ		250,48±0,17	31,31±0,17

Таким образом, на основании полученных данных установлено, что лигноцеллюлозные отходы сельскохозяйственного производства, деревоперерабатывающей и пивоваренной промышленности являются пригодными для получения плодовых тел штамма *G. frondosa* 2639, а также то, что лучшим вариантом субстрата оказался образец №2 (березовые опилки/пшеничные отруби).

Использование березовых опилок и пшеничных отрубей при производстве плодовых тел грибов является актуальным в связи с тем, что ежегодно в Алтайском крае перерабатывается в среднем около 2,5 млн. м³ древесины березы и 3,9 млн. тонн зерна пшеницы. Известно, что при переработке 1 м³ древесины и 1 тонны зерна образуется 21 кг опилок и 200 кг отрубей, соответственно [116,

137]. Представленные данные исследований, характеризующие преимущество 2 образца субстрата обусловлены физико-химическими свойствами березовых опилок и пшеничных отрубей. Они являются азотсодержащими материалами, источниками углеводов для мицелия, а также обладают рыхлящими свойствами, способствующими воздухо- и газообмену в субстрате. Данные о биохимическом составе березовых опилок и пшеничных отрубей представлены в таблице 3.15.

Таблица 3.15 – Общий состав сухих березовых опилок и пшеничных отрубей [137, 141]

Компоненты	Химический состав, % а.с.в.	
	Березовые опилки	Пшеничные отруби
Зольные вещества	0,34	5,95
Легкогидролизуемые полисахариды	27,14	44,1
Трудногидролизуемые полисахариды	36,24	6,3
Целлюлоза	32,01	8,80
Лигнин	25,78	9,90
Общий азот	1,35	2,37

Из вышеизложенного следует, что при интенсивном культивировании *A. mellea* D-13, *L. edodes* F-1000 и *G. frondosa* 2639 березовые опилки и пшеничные отруби с успехом можно использовать как дешевый источник питания в субстрате, дающий высокий выход грибов опенка осеннего, шиитаке и мейтаке.

Таким образом, схема получения плодовых тел испытуемых грибов включает следующие этапы: выбор растительного сырья, увлажнение до 65 %, термообработка 0,15 МПа / 90 мин, получение посевного мицелия на среде с мелассой в условиях глубинного культивирования, инокуляция в количестве 15 % от массы сухого субстрата, инкубация при температуре 26 °С для *L. edodes* F-1000, 27 °С для *A. mellea* D-13 и 28 °С для *G. frondosa* 2639, плодоношение при относительной влажности воздуха 85–90 % и освещенности 200–250 люкс, уборка плодовых тел.

3.7 Изучение влияния витаминов на выход грибов

Наблюдения за ростом испытуемых грибов в условиях глубинного культивирования в присутствии витаминов позволили определить их

оптимальную концентрацию (0,20 мг/мл) в питательной среде. Введение витаминов в субстрат осуществлялось во время инокуляции его мицелием. В таблице 3.16 представлены экспериментальные данные по выходу плодовых тел грибов при внесении в субстрат с березовыми опилками, обогащенными пшеничными отрубями (3:1), витаминов в концентрации 0,20 мг/г.

Таблица 3.16 – Выход плодовых тел грибов при внесении в субстрат витаминов

№	Вариант субстрата	Выход, %			% от контроля		
		<i>A. mellea</i> D-13	<i>L. edodes</i> F-1000	<i>G. frondosa</i> 2639			
1	березовые опилки + пшеничные отруби (3:1) (контроль)	10,60	20,35	33,50	100	100	100
2	рибофлавин	11,20	27,56	32,60	105,6	135,4	97,3
3	тиамин	10,88	28,44	35,40	102,6	139,7	105,6
4	никотиновая кислота	9,85	17,50	31,50	92,9	85,9	94,0
5	витамин С	10,60	20,40	33,40	100,0	100,2	99,7
6	п-аминобензойная кислота	10,20	20,15	32,34	96,2	99,0	96,5
7	биотин	10,55	20,10	33,00	99,5	98,7	98,5
8	мезо-инозит	10,34	18,25	33,37	97,5	89,6	99,6
9	витамин А	10,62	20,00	32,56	100,1	98,2	97,1
10	смесь витаминов	9,45	18,60	31,48	89,1	91,4	93,9
Примечание: относительная погрешность для урожайности $\pm 0,30-0,50$ %							

Из данных таблицы 3.16 видно, что максимальный выход *A. mellea* D-13 на субстрате с березовыми опилками обогащенных пшеничными отрубями достигался с рибофлавином и составлял 11,20 %, через 65–86 суток выращивания, по выходу и срокам культивирования мало отличаясь от контроля. Стимулирующий эффект наблюдался с добавлением в субстрат тиамин, выход *A. mellea* D-13 при сравнении с контролем также различался незначительно и составил 10,88 %, через 68–89 суток культивирования.

Добавление в субстрат никотиновой, п-аминобензойной кислот, витамина С, биотина, витамина А, мезо-инозита и смеси витаминов с концентрацией 0,20 мг/мл, значительного как повышения, так и уменьшения выхода плодовых тел и сроков культивирования не вызывало.

При выборе витаминов для культивирования *L. edodes* F-1000 также следует отдавать предпочтение рибофлавину и тиамину, увеличение выхода в сравнении с контролем в 1,35–1,40 раза, соответственно (таблица 3.16). Следует отметить, что формирование примордиев и образование плодовых тел *L. edodes* F-1000 с этими витаминами происходило в более ранний период времени – на 35, 39 сутки, что быстрее контроля на 5 суток.

При росте *G. frondosa* 2639 на субстрате с березовыми опилками, обогащенными пшеничными отрубями, максимальный выход достигался с тиаминном и составлял 35,40 % на 43 сутки культивирования, мало отличаясь от контроля (таблица 3.16). На субстрате с остальными витаминами повышение выхода плодовых тел и сокращение сроков культивирования *G. frondosa* 2639 не обнаружено.

Таким образом, было показано, что рибофлавин и тиамин оказывают стимулирующее действие на интенсификацию ростовых процессов испытуемых грибов. При использовании оптимальной концентрации этих витаминов (0,20 мг/мл) достигалось увеличение выхода плодовых тел *L. edodes* F-1000 в 1,35–1,40 раза, соответственно. Показано, что добавление в субстрат смеси витаминов, стимулирующий эффект рибофлавина и тиамина по выходу *L. edodes* F-1000 был ниже в 1,48–1,53 раза, соответственно, чем с каждым отдельным витамином. Мезо-инозит, витамин С, биотин, никотиновая и п-аминобензойная кислоты выявились не столь эффективными для повышения выхода *A. mellea* D-13, *L. edodes* F-1000 и *G. frondosa* 2639.

Из вышеизложенного следует, что при интенсивном культивировании испытуемых грибов, только для *L. edodes* F-1000 можно с успехом использовать витамины, а именно тиамин, как дополнительный источник питания в субстрате, повышающий выход плодовых тел шиитаке в 1,40 раза.

Разработанные методы интенсивного культивирования грибов *A. mellea* D-13, *L. edodes* F-1000 и *G. frondosa* 2639 с использованием лигноцеллюлозных отходов производств Алтайского края позволит применять полученные плодовые тела в пищевой, комбикормовой и фармацевтической промышленности.

3.8 Выделение хитозан-глюкановых комплексов из биомассы плодовых тел грибов

Хитин является наиболее распространенным фибриллярным материалом клеточных стенок грибов. Как и у членистоногих, в грибах хитин находится в α -форме. В клеточных стенках грибов хитин, в отличие от хитина членистоногих, ассоциирован с другими полисахаридами, преимущественно с α - и β -глюканами, которые выполняют функцию матрикса. Глюканы в основном представлены 1,3- α - и 1,3- β -глюканами. У грибов отдела *Basidiomycota* содержание хитина варьирует от 26 до 65 %, содержание глюканов – от 22 до 67 % [122].

Хитозан – деацетилированное производное хитина, представляющее собой полимер, состоящий из β -D-глюкозаминовых звеньев. В основе получения хитозана лежит реакция гидролиза от структурной единицы хитина – ацетильной группировки.

В отличие от практически нерастворимого хитина, хитозан растворим в разбавленных неорганических и органических кислотах: муравьиной, уксусной, янтарной, молочной, яблочной, но нерастворим в лимонной и винной. За счет высокого положительного заряда хитозан обладает способностью к сорбции тяжелых ионов металлов (Co^{2+} , Fe^{3+} и др.) [76].

Результаты выделения и качественная характеристика полученных образцов ХтГК из плодовых тел *A. mellea* D-13, *L. edodes* F-1000 и *G. frondosa* 2639 представлены в таблице 3.17.

Таблица 3.17 – Качественные характеристики ХтГК и хитозана

№	Образец	М.д. влаги, %	М.д. золы, %	Выход, в % на сухое вещество
1	ХтГК <i>A. mellea</i> D-13	7,6 $\pm$ 1,0	0,3 $\pm$ 0,1	19,0 $\pm$ 1,2
2	ХтГК <i>L. edodes</i> F-1000	8,0 $\pm$ 0,6	0,4 $\pm$ 0,2	5,4 $\pm$ 0,5
3	ХтГК <i>G. frondosa</i> 2639	7,6 $\pm$ 1,2	0,4 $\pm$ 0,1	3,3 $\pm$ 0,6
4	ХтГК <i>Pleurotus osteratus</i> *	8,0 $\pm$ 1,0	0,4 $\pm$ 0,1	0,5 $\pm$ 0,1
5	ХтГК <i>Aspergillus niger</i> *	–	–	32,0–55,0
6	Хитозан <i>Paralithodes camtschaticus</i> *	7,5 $\pm$ 1,1	0,3 $\pm$ 0,1	16,6 $\pm$ 0,3

Окончание таблицы 3.17

№	Образец	М.д. влаги, %	М.д. золы, %	Выход, в % на сухое вещество
7	Допустимые значения для пищевого хитозана (ТУ 9289-067-00472124)	Не более 10	Не более 0,7	—
Примечание: * – литературные данные [59, 122, 148]				

Как видно из представленных в таблице 3.17 данных, выход выделенных образцов ХтГК изменяется диапазоне значений 3,3–19,0 %.

Наиболее предпочтительным сырьем для получения ХтГК можно считать плодовые тела *A. mellea* D-13, поскольку из них выделяется наибольшее количество ХтГК. По содержанию влаги и золы, полученные образцы ХтГК соответствуют требованиям пищевого хитозана (ТУ 9289-067-00472124) [122]. При сравнении с литературными данными было показано, что ХтГК выделенные из биомассы плодовых тел испытываемых грибов по выходу значительно превосходят ХтГК из вешенки (*Pleurotus osteratus*). При этом выход ХтГК из плодовых тел *A. mellea* D-13 и мицелия *Aspergillus niger* был в 1,14–1,9 раз выше, чем выход хитозана из камчатского краба (*Paralithodes camtschaticus*). Это объясняется тем, что полученные ХтГК из *A. mellea* D-13 и *Aspergillus niger* представляют собой комплексы, содержащие до 60 % глюкана, имеющие 1,3- α -связи (до 85–90 %) и 1,4- α -связи, и только 23–25 % хитозана.

ИК-спектры полученных образцов ХтГК сравнивали с ИК-спектром хитозана, выделенного из камчатского краба [122].

В области 3466–3417 см^{-1} наблюдается широкая полоса, отвечающая валентным колебаниям гидроксильных и аминных связей. Положение и ширина полосы свидетельствуют о существовании межмолекулярной водородной связи, образующейся с участием гидроксильной и аминной групп. В области 2960–2800 см^{-1} проявляются полосы поглощения валентных колебаний СН-связей метиновой метиленовой и метильной групп, на что также указывает наличие полос, соответствующих деформационным колебаниям этих групп при 1420 и 1320 см^{-1} . В области 1700–1500 см^{-1} проявляются полосы с максимумами 1670–1640 см^{-1}

(амид 1) и $1620\text{--}1550\text{ см}^{-1}$ (амид 2), относящиеся к ацетилированной аминогруппе и подтверждающие, что образцы хитозана деацетилированы не полностью. Пик с максимумом $1378\text{--}1375\text{ см}^{-1}$ соответствует деформационному колебанию ОН-связи. Пик при $1263\text{--}1260\text{ см}^{-1}$ соответствует первичной аминогруппе. Между 1079 и 1033 см^{-1} наблюдаются широкие полосы поглощения, соответствующие гликозидной связи С-О-С. В области 896 и 660 см^{-1} присутствуют слабые полосы поглощения, которые можно отнести к деформационным колебаниям группы $\text{C}_1\text{-H}$ и колебаниям пиранозного кольца в β -сахарах соответственно.

ИК-спектры образцов ХтГК, выделенных из плодовых тел испытуемых грибов идентичны ИК-спектру хитозана, полученного традиционным способом из камчатского краба [122]. Они имеют такой же идентичный набор характеристических полос поглощения, которые отличаются друг от друга интенсивностью пиков и небольшим сдвигом по волновым числам в пределах ошибки измерений (приложение Г). Таким образом, можно сделать заключение, что присутствие основных полос поглощения в исследуемых образцах ХтГК подтверждает структуру хитозана.

3.9 Физико-химические свойства образцов хитозан-глюкановых комплексов

Важным этапом в любом исследовании, в котором используется хитозан, вне зависимости от направления (иммунология, биоматериалы, очистка сточных вод и др.) является получение основных характеристик исходных биополимеров и дальнейший контроль изменений основных параметров в ходе экспериментов. На ранних стадиях исследования, например для выбора оптимальных условий получения гелей/пленок/частиц, важны следующие параметры: характеристическая вязкость, молекулярная масса, степень деацетилирования.

Основные исследуемые физико-химические свойства полученных образцов ХтГК представлены в таблице 3.18.

Таблица 3.18 – Сравнительная характеристика физико-химических свойств исследуемых образцов ХтГК

№	Образец	Характеристическая вязкость $[\eta]$, см ³ /г	Молекулярная масса, кДа	Степень деацетилирования, %
1	ХтГК <i>A. mellea</i> D-13	2,2	51,8	79,5±2,6
2	ХтГК <i>L. edodes</i> F-1000	1,8	42,2	75,6±1,5
3	ХтГК <i>G. frondosa</i> 2639	1,6	37,5	76,2±3,6
4	ХтГК <i>Pleurotus osteratus</i> *	1,5	35,1	75,0±1,4
5	ХтГК <i>Aspergillus niger</i> *	–	44,2	82,0-95,0
6	Хитозан <i>Paralithodes camtschaticus</i> *	4,2	72,4	87,8±5,1
7	Допустимые значения для пищевого хитозана (ТУ 9289-067-00472124)*	Не нормируется	Не нормируется	Не менее 75
Примечание: * – литературные данные [59, 76, 122, 148]				

Физико-химические характеристики образцов ХтГК, полученных из плодовых тел грибов, изменяются в широких пределах. С максимальной характеристической вязкостью (2,2 см³/г), молекулярной массой (51,8 кДа) и степенью деацетилирования (79,5 %) получен образец ХтГК из биомассы плодовых тел *A. mellea* D-13.

Близкие значения характеристической вязкости 1,6–1,8 см³/г и молекулярной массы 37,5–42,2 кДа имеют два образца ХтГК, выделенные из плодовых тел *L. edodes* F-1000 и *G. frondosa* 2639. Степень деацетилирования в этих образцах составила 75,6–76,2 %, соответственно.

По физико-химическим свойствам полученные ХтГК идентифицированы, как соответствующие требованиям к пищевому хитозану (ТУ 9289-067-00472124) [122]. Как следует из данных представленных в таблице 3.18, ХтГК из плодовых тел *A. mellea* D-13 обладает физико-химическими свойствами близкими со свойствами хитозана камчатского краба.

Таким образом, было установлено, что полученные образцы ХтГК из плодовых тел *A. mellea* D-13, *L. edodes* F-1000 и *G. frondosa* 2639 по показателям характеристической вязкости, молекулярной массы и степени деацетилирования значительно превосходят ХтГК, выделенный из плодовых тел вешенки (*Pleurotus*

osteratus) и сопоставимы с ХтГК из *Aspergillus niger*. При этом ХтГК из *A. mellea* D-13 по этим показателям является наиболее близким к хитозану, выделенному из камчатского краба (*Paralithodes camtschaticus*).

3.10 Исследование сорбционной способности хитозан-глюкановых комплексов по извлечению ионов тяжелых металлов из водных растворов

Огромные природные запасы, высокая хелатообразующая способность и радиационная устойчивость положили начало исследованию хитин и хитинсодержащих материалов. Хитозан является вторым по распространенности после целлюлозы природным полимером. Характерным свойством этого комплексообразующего полимера является высокая селективность к извлечению из водных растворов ионов тяжелых металлов (Co^{2+} , Fe^{3+} и др.) при сохранении индифферентности к щелочным и щелочноземельным металлам [76].

Изучив литературные данные, представляется перспективным использование хитозана в растворенном состоянии, основываясь на способности хитозана терять свою растворимость в водных растворах при $\text{pH} \geq 6,5$, для извлечения тяжелых металлов из водных растворов с последующим выделением-осаждением.

В работе изучалось влияние pH среды и природы кислоты на эффективность связывания ХтГК из плодовых тел *A. mellea* D-13, *L. edodes* F-1000 и *G. frondosa* 2639 ионов металлов. Из ряда органических кислот была выбрана уксусная, неорганических – соляная. Исследовали сорбцию ионов Co^{2+} и Fe^{3+} из водных растворов их солей (CoCl_2 , FeCl_3). ХтГК растворяли в 0,33 М водных растворах уксусной и соляной кислот, смешивали с определенной концентрацией с растворами солей CoCl_2 и FeCl_3 , имеющих значение кислотности 2 и 6,7. Сорбцию ионов Co^{2+} и Fe^{3+} проводили в течение 10 минут при температуре 60°C.

Полученные данные по влиянию pH среды на адсорбцию ионов металлов из водных растворов представлены на рисунках 3.28–3.30. Степень извлечения ионов металла характеризовали числом их мг-экв. на 1 г хитозана.

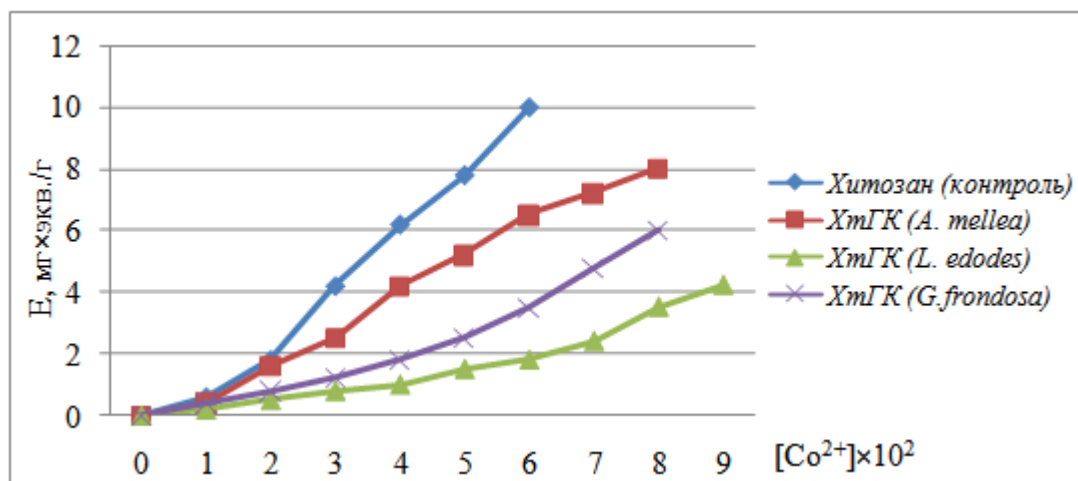


Рисунок 3.28 – Степень извлечения ионов кобальта растворами ХтГК при pH=6,7

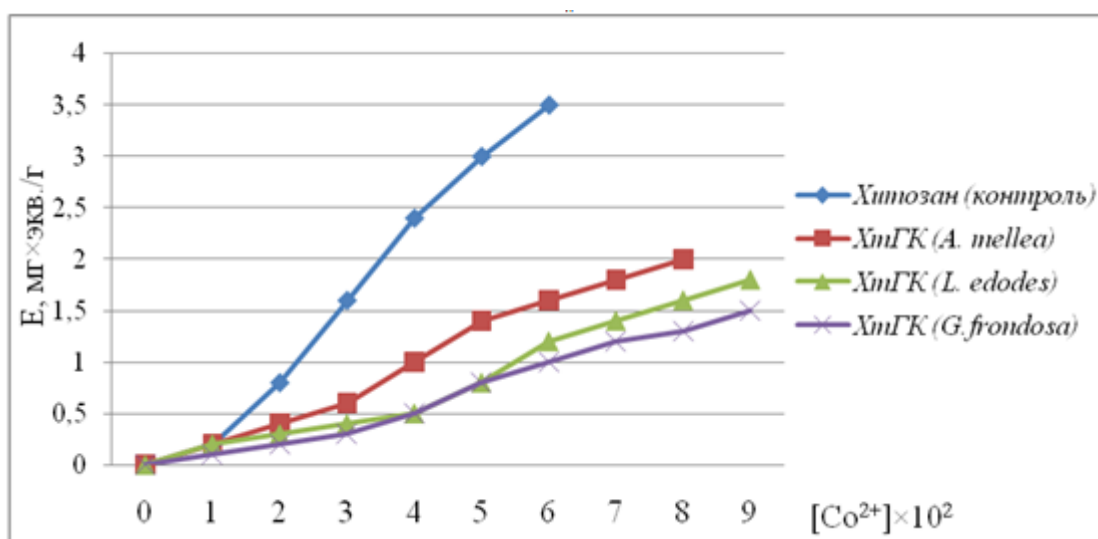


Рисунок 3.29 – Степень извлечения ионов кобальта растворами ХтГК при pH=2,0

Было установлено, что в нейтральных средах (pH=6,7) количество связанных ионов кобальта с использованием растворов ХтГК примерно в 4,0 раза больше, чем в кислой среде (pH=2,0). Следовательно, дальнейшее изучение сорбции ионов железа ХтГК было проведено при pH=6,7 (рисунок 3.30)

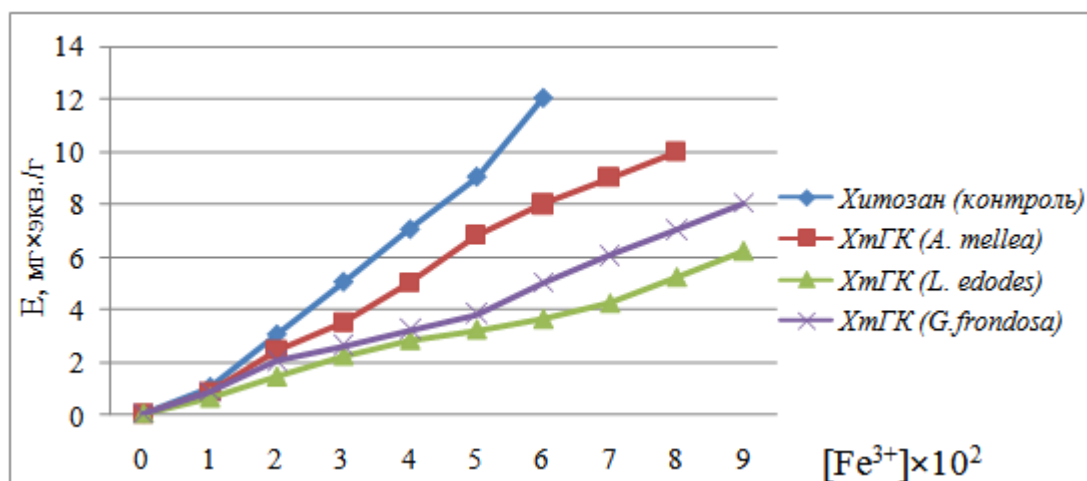


Рисунок 3.30 – Степень извлечения ионов железа растворами ХТГК при pH=6,7

На рисунках 3.28–3.30 показано, что количество связанных ионов металлов значительно зависит от pH среды. Наиболее близкой сорбционной способностью в сравнении с контрольным образцом обладал ХТГК, выделенный из плодовых тел *A. mellea* D-13. Степень извлечения ионов кобальта и железа ХТГК из *A. mellea* D-13 при pH=6,7 была в 1,3 и 2,0 раза выше, чем степень извлечения этих ионов ХТГК, полученными из *L. edodes* F-1000 и *G. frondosa* 2639.

Можно предполагать, что в нейтральных и близких к нейтральным средам (pH=6–7) происходит образование хелатных комплексов металла с хитозаном, происходит это с участием как аминогруппы, так и кислорода, а также других групп, влияние которых хорошо изучено.

Резкое снижение сорбционной способности хитозана по отношению к ионам кобальта в сильноокислых средах (pH=2) объясняется тем, что в этих условиях хитозан находится в протонированной форме.

В результате исключается участие в образовании хелатного комплекса аминогрупп, а также положительный заряд по цепи макромолекулы хитозана препятствует взаимодействию положительно заряженных ионов металла с атомами кислорода.

Установлена сильная зависимость сорбционной способности ХТГК от природы кислот, которые использовались для приготовления исходных растворов ХТГК (рисунки 3.31–3.34).

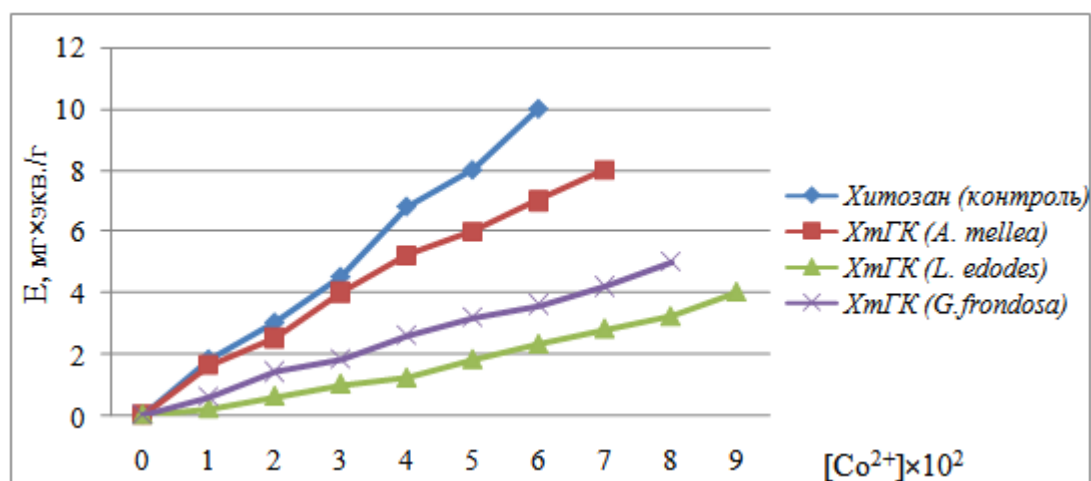


Рисунок 3.31 – Степень извлечения ионов кобальта 0,4 % растворами ХТГК в 0,33 М CH_3COOH

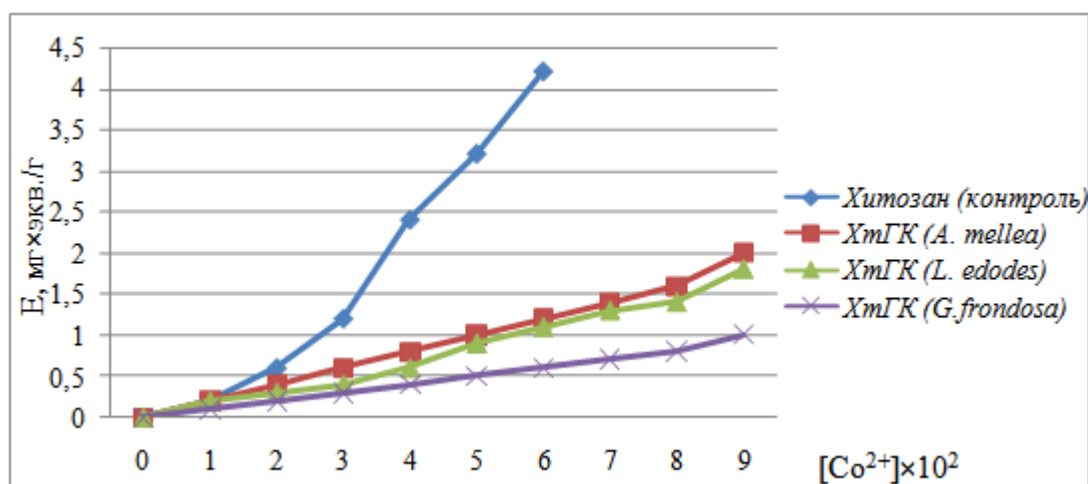


Рисунок 3.32 – Степень извлечения ионов кобальта 0,4 % растворами ХТГК в 0,33 М HCl

Предельная величина сорбции Co^{2+} (4,2–10,0 мг $\times$ экв./г) на хитозане, полученном из ракообразных, превышает сорбционную способность ХТГК из *L. edodes* F-1000 (1,8–4,0 мг $\times$ экв./г) и *G. frondosa* 2639 (1,0–5,0 мг $\times$ экв./г) и сопоставима с сорбционной емкостью ХТГК из *A. mellea* D-13 (2,0–8,0 мг $\times$ экв./г). Несмотря на значительное сходство химических свойств Co^{2+} и Fe^{3+} , эффективность их сорбции на ХТГК заметно отличается. Анализ изотерм адсорбции показывает, что сорбционная способность ХТГК из плодовых тел

испытуемых грибов по отношению к ионам Fe^{3+} значительно превосходит сорбцию ионов Co^{2+} (рисунки 3.33, 3.34)

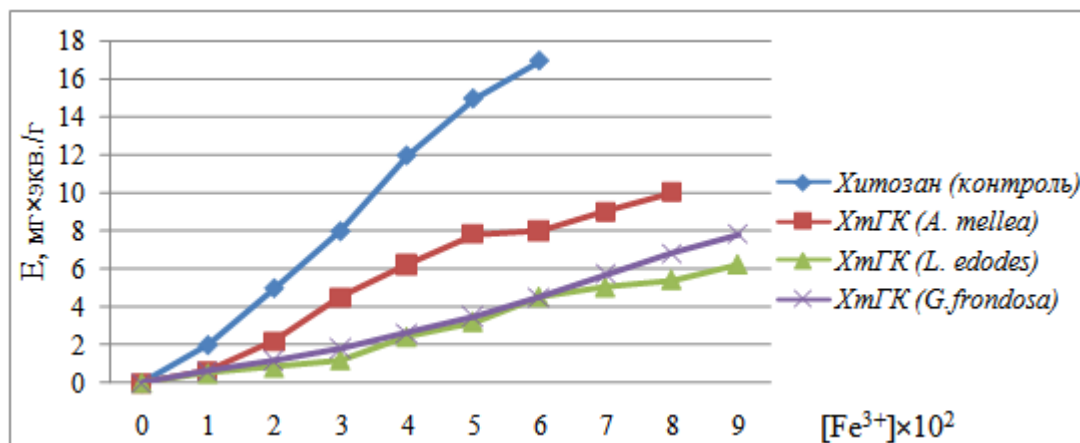


Рисунок 3.33 – Степень извлечения ионов железа 0,4 % растворами ХтГК в 0,33 М CH_3COOH

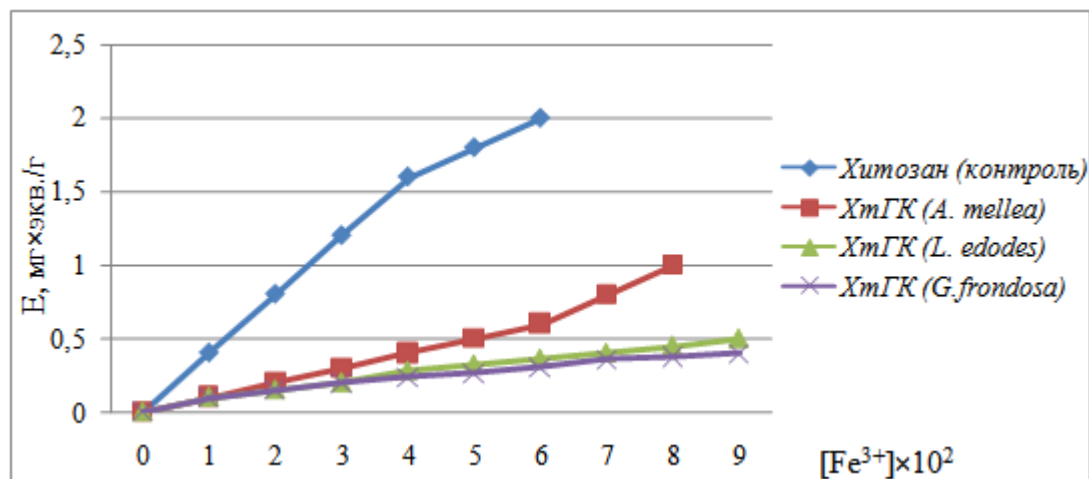


Рисунок 3.34 – Степень извлечения ионов железа 0,4 % растворами ХтГК в 0,33 М HCl

В результате проведенных исследований было установлено, что испытуемые ХтГК имеют достаточно высокие сорбционные характеристики по отношению к ионам Co^{2+} и Fe^{3+} . При этом наиболее эффективным испытуемым сорбентом является ХтГК, выделенный из плодовых тел *A. mellea* D-13, поэтому его можно рекомендовать в качестве энтеросорбента тяжелых металлов.

ХтГК, растворенные в уксусной кислоте, примерно в 2–4 раза эффективнее извлекают ионы металлов, чем ХтГК, растворенные в соляной кислоте. Это можно объяснить различием в конформационном состоянии макромолекул ХтГК в уксусной и соляной кислотах.

Таким образом, была показана высокая эффективность извлечения ионов тяжелых металлов из водных растворов в нейтральных средах с помощью растворенных ХтГК (до 10,0 мг×экв./г). Сорбционная способность сильно зависит от конформационного состояния макромолекулы, которое, в свою очередь, зависит от природы кислоты, необходимой для приготовления растворов ХтГК.

ГЛАВА 4 ХИМИЧЕСКИЙ СОСТАВ БИОМАССЫ МИЦЕЛИЯ, ПЛОДОВЫХ ТЕЛ И ОТРАБОТАННЫХ СУБСТРАТОВ ПОСЛЕ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ГРИБОВ

4.1 Химический состав биомассы мицелия и плодовых тел

Анализ литературных данных показал, что химический состав грибов зависит от условий культивирования, состава субстратов, сроков хранения и других факторов [26]. Качество биомассы мицелия и плодовых тел базидиальных грибов зависит от содержания в них белков, аминокислот, углеводов, липидов, жирных кислот, витаминов, минеральных и экстрактивных веществ [8]. Для определения этих показателей применялись стандартные химические и физико-химические методы анализа, описанные в отраслевой и научно-технической литературе.

Содержание белков. Обобщенные литературные данные содержания белков для штаммов *A. mellea* D-13, *L. edodes* F-1000 и *G. frondosa* 2639 представленные в таблице 4.1, позволяют судить о том, что содержание белка может варьировать у одних и тех же видов в значительных пределах. Анализируя данные представленные во многих публикациях, а также руководствуясь результатами собственных исследований, можно отметить общую закономерность. Так, в биомассе мицелия *A. mellea*, *L. edodes* и *G. frondosa* содержание белка всегда выше, чем в плодовых телах. При этом масса получаемого продукта при производстве мицелия по скорости процесса в несколько раз выше, чем традиционное получение плодовых тел. Однако плодовые тела имеют лучший товарный вид и органолептические свойства [20, 26]. Общим является то, что как мицелий, так и плодовые тела можно использовать в производстве продуктов питания [46].

Помимо этого, приведенные в литературе данные по содержанию общего белка в плодовых телах касаются в основном Европейских и Азиатских стран, в которых грибы видов *L. edodes* и *G. frondosa* выращивают в основном на древесине бука и дуба [173]. Наши исследования по выращиванию этих грибов

проводились с использованием древесины березы повислой (*Betula pendula*) произрастающей на всей территории РФ.

Промышленное производство плодовых тел *A. mellea* во всем мире до настоящего времени отсутствует, данные по содержанию общего белка касаются в основном дикорастущих видов произрастающих на территории России. Известно также, что в плодовых телах, растущих в природных условиях, белка, как правило, меньше, чем при культивировании интенсивным методом на субстратах, обогащенных азотсодержащими добавками.

Традиционно содержание общего белка в грибах рассчитывают по содержанию общего азота, используя коэффициент 6,25, основанный на том, что большинство белков содержат 16 % азота и имеют 100 %-ную перевариваемость [20]. Указанный коэффициент долгое время использовался большинством отечественных и зарубежных исследователей [8, 46]. Однако исследования ряда авторов показали, что из-за наличия в грибах азотсодержащего хитина количество перевариваемого белка, составляет, в среднем, около 70-ти % и поэтому для более корректного его расчета было предложено использовать коэффициент перерасчета 4,38 [20] (таблица 4.1).

Таблица 4.1 – Содержание общего белка в мицелии и плодовых телах

Способ определения белка	Содержание белка, %					
	<i>A. mellea</i> D-13		<i>L. edodes</i> F-1000		<i>G. frondosa</i> 2639	
	мицелий	плодовые тела	мицелий	плодовые тела	мицелий	плодовые тела
N×6,25	21,00 ± 0,50	20,43 ± 0,50	21,18 ± 0,50	17,16 ± 0,50	28,30 ± 0,50	27,28 ± 0,50
N×4,38	14,7 ± 0,50	14,31 ± 0,50	14,84 ± 0,50	12,02 ± 0,50	19,83 ± 0,50	19,12 ± 0,50
N×6,25*	–	20,59	21,56	10,00 – 18,10	28,50	10,50 – 28,00
Примечание: N×6,25* – литературные данные [28, 49, 169, 190, 193, 195, 197]; «–» нет данных						

Было показано, что содержание общего белка в плодовых телах *L. edodes* F-1000 в 1,23 раза ниже, чем в мицелии. Тогда как, количественные показатели доли общего белка в мицелии и плодовых телах *A. mellea* D-13 и *G. frondosa* 2639

различаются не существенно. Полученные значения согласуются с литературными данными [53, 132, 155, 169, 183, 191].

Сравнение аминокислотного состава мицелия и плодовых тел исследуемых грибов показало, что в образцах *L. edodes* F-1000 и *G. frondosa* 2639 более высокое содержание аминокислот выявлено в мицелии. Тогда как у *A. mellea* D-13 наибольшее содержание аминокислот обнаружено в плодовых телах. При этом среди незаменимых аминокислот в мицелии и плодовых телах исследуемых культур преобладают – лейцин+изолейцин, тирозин+фенилаланин и лизин. Для сравнения, у эталонного белка ФАО/ВОЗ наибольший удельный вес также приходится на вышеуказанные аминокислоты (таблица 4.2).

Таблица 4.2 – Аминокислотный состав общего белка мицелия и плодовых тел

Наименование определяемой аминокислоты	Содержание, г/100 г белка						
	ФАО	<i>A. mellea</i> D-13		<i>L. edodes</i> F-1000		<i>G. frondosa</i> 2639	
		мицелий	плодовое тело	мицелий	плодовое тело	мицелий	плодовое тело
Незаменимые							
лизин	5,50	2,10	2,36	5,12	4,15	5,20	5,00
тирозин+фенилаланин	6,00	2,70	2,94	4,86	4,65	5,10	4,70
лейцин+изолейцин	11,00	4,80	5,00	9,60	7,93	9,80	9,20
метионин	3,50	0,22	0,23	3,45	2,81	3,41	3,30
валин	5,00	1,85	1,90	3,90	2,70	4,21	3,20
треонин	4,00	0,74	0,84	3,40	1,50	3,75	2,20
Заменимые							
аргинин	–	2,26	2,33	3,25	2,24	3,17	2,27
гистидин	–	2,44	2,30	4,00	1,40	3,80	2,20
пролин	–	3,00	2,56	4,60	2,00	5,20	4,70
серин	–	0,23	0,16	1,95	1,34	2,03	1,76
аланин	–	2,10	2,60	2,53	1,20	2,60	1,80
глицин	–	1,90	1,60	2,80	2,10	3,10	2,60
Общее содержание аминокислот	–	24,34	24,82	49,46	34,02	51,37	42,93

Полученные данные свидетельствуют о том, что плодовые тела исследуемых видов по содержанию незаменимых аминокислот от общего количества аминокислот превосходят мицелий *A. mellea* D-13и *G. frondosa* 2639 на 10,5 %, *L. edodes* F-1000 на 11,4 %.

В таблице 4.3 приведены результаты расчета аминокислотного сора белка грибов в соответствии с эталоном ФАО/ВОЗ.

Таблица 4.3 – Аминокислотный score белка мицелия и плодовых тел грибов

Незаменимые аминокислоты	Score, %						
	ФАО	<i>A. mellea</i> D-13		<i>L. edodes</i> F-1000		<i>G. frondosa</i> 2639	
		мицелий	плодовое тело	мицелий	плодовое тело	мицелий	плодовое тело
лизин	100	38	43	93	75	94	90
тирозин+ фенилаланин	100	45	49	81	77	85	78
лейцин+ изолейцин	100	44	45	87	72	89	84
метионин	100	6	7	98	80	97	94
валин	100	37	38	78	54	84	64
треонин	100	18	21	85	37	94	55
Итого	600	188	203	522	395	543	465

Белковые вещества мицелия и плодовых тел штаммов *L. edodes* F-1000 и *G. frondosa* 2639 обладают высоким содержанием лейцина+изолейцина, метионина и лизина при сравнении со стандартом ФАО/ВОЗ. Тогда как мицелий и плодовые тела *A. mellea* D-13 по аминокислотному составу показали более низкие значения по сравнению с ФАО/ВОЗ.

Показателем биологической ценности белков служит отношение суммы серосодержащих аминокислот к количеству общего азота в биомассе (S/T) (таблица 4.4).

Таблица 4.4 – Показатели биологической ценности белка мицелия и плодовых тел

Показатель	<i>A. mellea</i> D-13		<i>L. edodes</i> F-1000		<i>G. frondosa</i> 2639	
	мицелий	плодовое тело	мицелий	плодовое тело	мицелий	плодовое тело
NI	7,30	7,70	18,20	11,60	25,40	21,50
S/T	0,07	0,08	0,95	0,88	0,73	0,83

Для сравнения – E/N казеина – 0,75; яичного альбумина – 1,0 [155].

Известно, что существует определенная взаимосвязь между аминокислотным составом белка и степенью его расщепления пищеварительными

ферментами [19]. Чем выше соотношение аргинина и лизина к пролину, тем выше перевариваемость. Для мицелия *A. mellea* D-13 оно составило (аргинин+лизин/пролин= $(2,26+2,1)/3=1,45$). Для мицелия *L. edodes* F-1000 и *G. frondosa* 2639 – 1,82 и 1,61, соответственно. Для плодовых тел *A. mellea* D-13, *L. edodes* F-1000 и *G. frondosa* 2639 – 1,83; 3,19; 1,55, соответственно. Так, для сравнения белка риса, это соотношение близко к 4, соевой муки – 2,1 [20].

Индекс питательности (NI) для мицелия и плодовых тел видов *A. mellea* D-13, *L. edodes* F-1000 и *G. frondosa* 2639 составил 7,3–7,7; 18,2–11,6 и 25,4–21,5, соответственно (таблица 5.4). Например, в мицелии и плодовых телах вешенки (*Pleurotus osteratus*) NI составляет 29,0 и 20,0, соответственно [20].

Таким образом, целесообразно использовать в качестве источника белка мицелий всех исследуемых штаммов, но наиболее перспективным, по содержанию общего количества белка в мицелии, является штамм *G. frondosa* 2639, который может представлять интерес для сельского хозяйства и пищевой промышленности.

Сравнение соотношения незаменимых и заменимых аминокислот показало высокое содержание в мицелии и плодовых телах грибов особенно ценных незаменимых аминокислот. Аминокислотный состав биомассы благоприятен для использования мицелия и плодовых тел в пищевых целях. Дисбаланс белков *A. mellea* D-13, *L. edodes* F-1000 и *G. frondosa* 2639 невелик и компенсируется избытком этих аминокислот в основных продуктах, например, в белке зерновых.

Таким образом, сравнение полученных данных с данными других авторов показывает, что аминокислотный состав мицелия и плодовых тел *A. mellea* D-13, *L. edodes* F-1000 и *G. frondosa* 2639 близок к аминокислотам других съедобных грибов и включает все незаменимые аминокислоты.

Содержание легко- и трудногидролизуемых полисахаридов. Исследованиями ряда авторов установлено, что биологическая активность высших базидиомицетов, связана с наличием в их мицелии и плодовых телах большого количества полисахаридов [46].

Изучение общего содержания легко- и трудногидролизуемых полисахаридов (ЛГП, ТГП) в мицелии испытуемых грибов показало, что наибольшее их количество обнаружено у штамма *G. frondosa* 2639, при этом количество ЛГП существенно отличается от количества ТГП и составляет 24,0–6,75 %, соответственно. Следует отметить, что количественное содержание ЛГП и ТГП в мицелии *A. mellea* D-13 и *L. edodes* F-1000, также значительно различается (таблица 4.5).

Таблица 4.5 – Содержание углеводов в мицелии и плодовых телах грибов

№	Основные показатели	М.д., %					
		<i>A. mellea</i> D-13		<i>L. edodes</i> F-1000		<i>G. frondosa</i> 2639	
		мицелий	плодовые тела	мицелий	плодовые тела	мицелий	плодовые тела
1	ЛГП	18,83±0,85	16,81±0,96	19,00±1,01	22,7±0,78	24,00±0,98	21,6±0,34
2	ТГП	4,56±0,45	4,60±0,65	5,50±0,62	6,21±0,32	6,75±0,62	5,90±0,46
3	Углеводы*	57,68	50,00-60,00	17,62	67,5-78,0	50,29	26,66-49,69
Примечание: Углеводы* – литературные данные [28, 49, 169, 190, 193, 195, 197].							

Сравнительный анализ содержания углеводов в плодовых телах испытуемых грибов показал, что плодовые тела штаммов *G. frondosa* 2639 и *L. edodes* F-1000 по содержанию ЛГП и ТГП превосходят *A. mellea* D-13 в 1,28 и 1,35 раза, соответственно (таблица 4.5). При сравнении с литературными данными было показано, что мицелий и плодовые тела испытуемых грибов характеризуются пониженным содержанием углеводов. Это связано с тем, что в литературных данных показано общее содержание углеводов (моносахариды, дисахариды, олигосахариды, полисахариды), тогда как наши исследования отражают наиболее ценные из них – полисахариды.

Таким образом, перспективными источниками полисахаридов являются мицелий и плодовые тела штаммов *G. frondosa* 2639 и *L. edodes* F-1000, которые могут представлять интерес для нужд пищевого и фармацевтического назначения.

Помимо этого, полисахариды мицелия являются биологически активными соединениями, обладающими лечебными свойствами [64, 100, 102].

Общее содержание липидов. Липиды наряду с углеводами являются основными энергетическими компонентами грибов [58].

Исследования по определению количества общих липидов в мицелии и плодовых телах *A. mellea* D-13, *L. edodes* F-1000 и *G. frondosa* 2639 показали широкий диапазон данных от 0,75 до 6,20 % (таблица 4.6).

Таблица 4.6 – Содержание липидов в мицелии и плодовых телах грибов

№	Основные показатели	М.д., %					
		<i>A. mellea</i> D-13		<i>L. edodes</i> F-1000		<i>G. frondosa</i> 2639	
		мицелий	плодовые тела	мицелий	плодовые тела	мицелий	плодовые тела
1	Липиды	2,75± 0,14	6,20± 0,25	0,75± 0,10	1,29± 0,12	0,80± 0,31	0,90± 0,36
2	Липиды*	2,10	5,56-6,29	0,35	0,60-8,00	0,23	0,44-1,70
Примечание: Липиды* – литературные данные [28, 49, 169, 190, 193, 195, 197].							

Из данных таблицы 4.6 видно, что наибольшее количество общих липидов содержит мицелий штамма *A. mellea* D-13 и составляет 2,75 %. Количественный показатель в 3,4 и 3,6 раза выше, чем содержание липидов в мицелии штаммов *G. frondosa* 2639 и *L. edodes* F-1000, соответственно. Содержание доли липидов в мицелии этих грибов мало отличается и составляет 0,75 и 0,80 %, соответственно.

При сравнении плодовых тел было обнаружено, что отличительной чертой *A. mellea* D-13 является высокое содержание в их плодовых телах доли общих липидов – 6,20 %, в то время как штаммы *L. edodes* F-1000 и *G. frondosa* 2639 содержат лишь 1,29 и 0,90 %, соответственно. Полученные значения согласуются с литературными данными [28, 49, 169, 190, 193, 195].

Таким образом, по содержанию общих липидов, для практического использования большую значимость в различных отраслях народного хозяйства (пищевой, фармацевтической промышленности) могут представлять мицелий и плодовые тела *A. mellea* D-13.

Содержание жирных кислот. Жирнокислотный состав является одним из достоинств грибов, повышающих их пищевую ценность [26].

Исследование состава фракции жирных кислот (ЖК) биомассы мицелия и плодовых тел *A. mellea* D-13, *L. edodes* F-1000 и *G. frondosa* 2639, методом газожидкостной хроматографии показало следующие результаты, представленные в таблице 4.7.

Таблица 4.7 – Состав липидной фракции мицелия и плодовых тел грибов

№	Жирные кислоты	Содержание в мг/г					
		<i>A. mellea</i> D-13		<i>L. edodes</i> F-1000		<i>G. frondosa</i> 2639	
		мицелий	плодовые тела	мицелий	плодовые тела	мицелий	плодовые тела
	Насыщенные						
1	Миристиновая	0,42	0,44	0,39	0,55	0,48	0,46
2	Пальмитиновая	14,05	13,48	15,81	13,86	12,81	13,79
3	Стеариновая	2,51	3,21	2,46	2,34	2,52	2,44
	Ненасыщенные						
4	Пальмитолеиновая	4,54	6,73	5,84	5,64	5,51	5,17
5	Олеиновая	27,65	38,33	34,41	32,32	34,19	35,53
6	Линолевая	48,38	36,14	40,98	53,05	42,25	40,21

Из насыщенных жирных кислот (НЖК) в образцах мицелия вышеперечисленных грибов преобладает пальмитиновая кислота, а из ненасыщенных (ННЖК) – линолевая. При этом содержание ННЖК от общего количества ЖК для *A. mellea* D-13 составляет 83 %, для *L. edodes* F-1000 – 81,3 % и для *G. frondosa* 2639 84 %. В меньших количествах были обнаружены – миристиновая, стеариновая и пальмитолеиновая кислоты.

При анализе данных по содержанию ЖК в плодовых телах исследуемых грибов следует, что из НЖК преобладает пальмитиновая кислота, а также то, что основное содержание ЖК у штаммов *L. edodes* F-1000 и *G. frondosa* 2639 приходится на линолевую – 44 % и 41 %, соответственно. В то время как у *A. mellea* D-13 на олеиновую – 39 %.

При сравнении мицелия и плодовых тел у штаммов *L. edodes* F-1000 и *G. frondosa* 2639 значительных изменений в содержании двух групп ЖК не наблюдается. Однако в плодовых телах *A. mellea* D-13 снижается содержание

линолевой кислоты, но при этом возрастает доля олеиновой и стеариновой кислот.

Из имеющихся литературных данных видно, что качественный состав липидов *A. mellea* D-13, *L. edodes* F-1000 и *G. frondosa* 2639 приближается к маслам растительного происхождения (рисовое, кукурузное) [26, 130].

Содержание витаминов. Кроме веществ, обеспечивающих организм энергией и пластинчатым материалом для построения различных тканей, достоинство пищевого продукта составляют физиологически активные вещества – витамины [2].

Известно, что грибы содержат витамины группы В [26]. В результате проведенных исследований установлено, что биомасса мицелия и плодовые тела грибов содержат витамины в количестве, представленные в таблице 4.8.

Таблица 4.8 – Содержание витаминов в мицелии и плодовых телах грибов

№	Витамин	Содержание в мг/100 г					
		<i>A. mellea</i> D-13		<i>L. edodes</i>		<i>G. frondosa</i>	
		мицелий	плодовые тела	мицелий	плодовые тела	мицелий	плодовые тела
1	В ₁ (тиамин)	–	0,47	0,91	1,20	–	0,85
2	В ₂ (рибофлавин)	0,39	1,30	0,30	1,70	0,20	2,30
3	В ₆ (пиридоксин)	0,32	1,40	1,92	5,10	0,75	4,20

Как показали исследования, из витаминов группы В в мицелии *L. edodes* F-1000 и *G. frondosa* 2639 количественно преобладает витамин В₆, тогда как в *A. mellea* витамин В₂. Следует отметить, что содержание витамина В₁ в образце мицелия *L. edodes* F-1000 составило 0,91 мг/100 г, в то время как в биомассе мицелия *A. mellea* D-13 и *G. frondosa* 2639 он отсутствовал.

В плодовых телах испытуемых грибов было отмечено содержание витаминов В₁, В₂ и В₆. Из этих витаминов наибольшее количество составлял витамин В₆ (таблица 4.8). Помимо этого, плодовые тела *A. mellea* D-13, *L. edodes* F-1000 и *G. frondosa* 2639 выращенные на лигноцеллюлозном субстрате по содержанию витамина В₂ превышают мицелий в 3,3, 5,6 и 11,5 раза соответственно.

При сравнении полученных данных количественного содержания витаминов группы В в плодовых телах *A. mellea* D-13, *L. edodes* F-1000 и *G. frondosa* 2639 с содержанием их в пищевых продуктах показало, что уровень рибофлавина в 2,9; 3,8 и 5,2 раза выше, чем в куриных яйцах (0,45 мг/100 г). Концентрация пиридоксина больше, чем в картофеле (0,24 мг/100 г), фасоли (0,9 мг/100 г), капусте (0,23 мг/100 г) и моркови (0,10 мг/100 г). Количество тиамина в плодовых телах *A. mellea* D-13 соответствует содержанию его в овсяной крупе (0,50 мг/100 г), тогда как у *G. frondosa* 2639 и *L. edodes* F-1000 его концентрация выше в 1,7 и 2,4 раза, соответственно.

Минеральные вещества. Общее количество минеральных веществ, играющих наряду с витаминами важную роль в обменных процессах, выражается содержанием золы. Анализ литературных данных показал, что содержание минеральных веществ в ксилотрофных грибах составляет от 1 до 15 % и отличается в зависимости от вида и условий культивирования [26].

Как показали исследования, общее количество золы в плодовых телах *A. mellea* D-13 и *L. edodes* F-1000 значительно выше, чем в мицелии, тогда как у *G. frondosa* 2639 ее количество примерно одинаково (таблица 4.9).

Таблица 4.9 – Содержание золы в мицелии и плодовых телах грибов

№	Основные показатели	М.д., %					
		<i>A. mellea</i> D-13		<i>L. edodes</i> F-1000		<i>G. frondosa</i> 2639	
		мицелий	плодовые тела	мицелий	плодовые тела	мицелий	плодовые тела
1	Зольность	4,64± 0,12	10,60± 0,84	3,70± 0,42	8,45± 0,64	6,50± 0,56	8,50± 0,82
2	Зольность*	7,95	12,05	1,36	3,70-10,00	1,15	6,61
Примечание: Зольность* – литературные данные [28, 49, 169, 190, 193, 195, 197].							

Минеральный состав мицелия и плодовых тел грибов, в общем, характеризуется высоким содержанием минеральных веществ (таблица 4.10).

Таблица 4.10 – Минеральный состав мицелия и плодовых тел грибов

№	Элемент	*СанПиН, не более мг/кг	Содержание в мг/кг					
			<i>A. mellea</i> D-13		<i>L. edodes</i> F-1000		<i>G. frondosa</i> 2639	
			мицелий	плодовые тела	мицелий	плодовые тела	мицелий	плодовые тела
1	натрий	–	3,29	0,59	4,41	0,63	4,70	0,72
2	кальций	–	3,39	0,14	2,57	0,10	4,93	0,54
3	калий	–	22,80	13,86	20,99	24,661	20,41	12,36
4	магний	–	1,26	1,48	1,62	0,98	1,55	0,96
5	алюминий	–	0,04	0,02	0,04	0,08	0,02	0,04
6	мышьяк	0,5	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
7	бор	–	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
8	барий	–	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
9	фосфор	–	6,85	5,92	8,63	5,56	8,29	4,38
10	железо	50	0,09	0,07	0,08	0,01	0,08	0,06
11	кадмий	0,03	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
			Содержание в мкг/г					
13	цинк	20	3,35	4,65	4,31	5,15	6,19	6,54
14	медь	10	0,91	1,36	0,91	1,41	0,78	1,04
15	марганец	–	0,11	0,13	0,10	0,16	0,16	0,19
16	хром	0,6	1,57	0,11	0,68	0,72	0,44	0,04
17	свинец	0,5	0,38	0,38	0,19	0,13	0,46	0,27
18	кремний	–	0,11	0,21	0,12	0,11	0,14	0,11
*Допустимые уровни по СанПин 2.3.2.1078-01								

Относительно содержания каждого элемента у испытуемых грибов можно отметить, что калия и фосфора значительно больше, чем других элементов, затем следуют кальций, натрий и магний. По содержанию калия значительное отличие биомассы мицелия от плодовых тел обнаружено у *A. mellea* D-13 и *G. frondosa* 2639, тогда как у штамма *L. edodes* F-1000 его количество приблизительно одинаково. В наименьших количествах в испытуемых образцах содержатся цинк, медь, марганец, хром, свинец и кремний.

Содержание обнаруженных в мицелии и плодовых телах элементов сравнивали с нормами СанПиН. Установлено, что содержание токсичных элементов в биомассе мицелия и плодовых тел испытуемых грибов не превышает предельно допустимых уровней по нормативным требованиям безопасности для пищевых продуктов. В мицелии и плодовых телах отсутствуют ртуть и мышьяк, которые являются особо токсичными элементами.

Сравнение минерального состава мицелия и плодовых тел испытуемых грибов с другими пищевыми продуктами, например картофелем, свидетельствует, что в данных грибах содержится меньше калия и магния, примерно столько же фосфора, и значительно больше кальция и натрия [81]. В их минеральный состав входят все элементы, необходимые в питании человека.

Содержание экстрактивных веществ. Исследования показали, что водные экстракты мицелия *A. mellea* D-13, *L. edodes* F-1000 и *G. frondosa* 2639 имели светло-желтую окраску, тогда как водные экстракты плодовых тел *A. mellea* D-13 и *L. edodes* F-1000 – темно-коричневую окраску, а экстракт *G. frondosa* 2639 светло-желтую. Экстракты с темно-коричневой окраской, возможно, связаны с наличием в них каротиноидных пигментов [67, 129].

Таблица 4.11 – Массовая доля экстрактивных веществ в мицелии и плодовых телах грибов

Основные показатели	М.д., %					
	<i>A. mellea</i> D-13		<i>L. edodes</i> F-1000		<i>G. frondosa</i> 2639	
	мицелий	плодовые тела	мицелий	плодовые тела	мицелий	плодовые тела
Экстрактивные вещества	16,40± 0,21	22,80± 1,12	10,60± 0,18	21,76± 0,46	11,00± 0,48	12,50± 0,54

Из данных таблицы 4.11 видно, что массовая доля экстрактивных веществ в плодовых телах испытуемых грибов больше, чем в мицелии. Наибольшее количество экстрактивных веществ обнаружено в плодовых телах *A. mellea* D-13 и составило 22,80 % что больше по отношению к мицелию в 1,4 раза, в то время как у *L. edodes* F-1000 в 2,0 раза. Массовая доля экстрактивных веществ в мицелии и плодовых телах у штамма *G. frondosa* 2639 мало отличалось.

Таким образом, установленный химический состав биомассы мицелия и плодовых тел испытуемых грибов по содержанию белков, аминокислот, полисахаридов, липидов, жирных кислот, витаминов, минеральных и экстрактивных веществ, обосновывает их высокую пищевую ценность и перспективы использования в различных отраслях народного хозяйства.

4.2 Химический состав и пищевая ценность продуктов биоконверсии субстратов

Проведены исследования по биодеструкции компонентов субстрата в процессе зарастания их мицелием. В качестве объекта для изучения был выбран наиболее перспективный субстрат (образец №2), который можно рекомендовать для культивирования штаммов *A. mellea* D-13, *L. edodes* F-1000 и *G. frondosa* 2639.

Степень разложения субстрата ксилотрофными грибами в значительной степени зависит от культуры грибов, состава субстрата, фазы развития культуры и условий культивирования [18, 92].

На рисунках 4.1 и 4.2 представлена динамика содержания лигнина и целлюлозы в субстрате в процессе зарастания его мицелием испытываемых грибов.

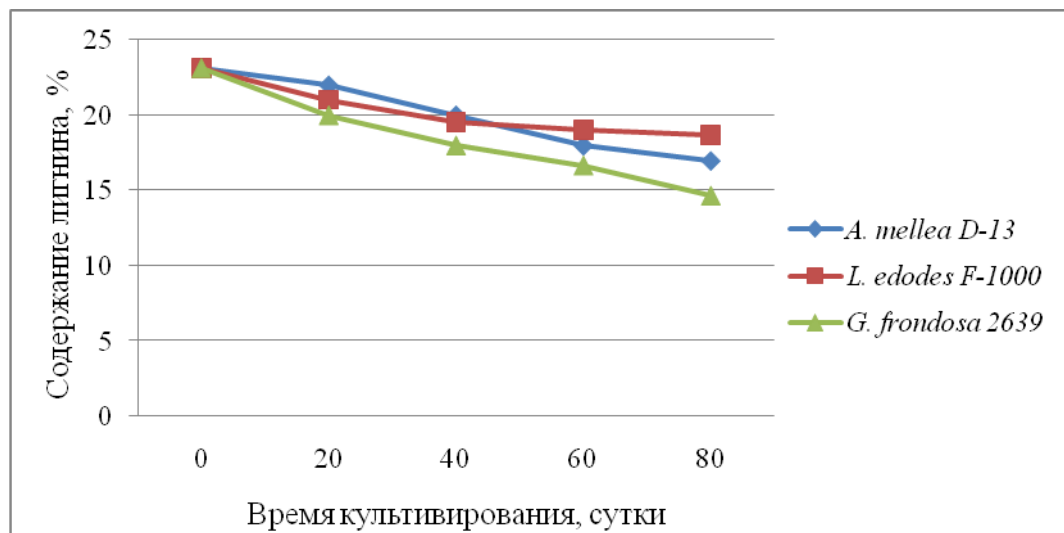


Рисунок 4.1 – Динамика содержания лигнина (образец №2) в процессе культивирования грибов

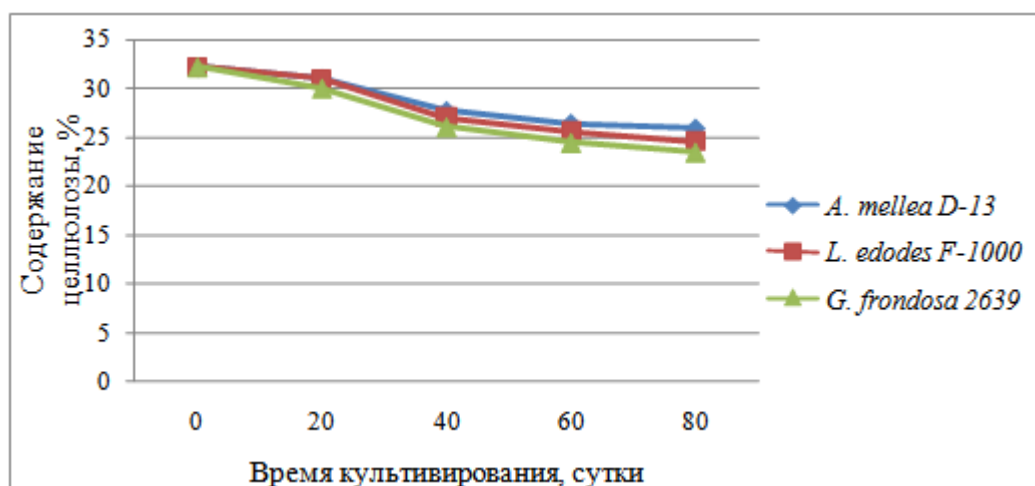


Рисунок 4.2 – Динамика содержания целлюлозы (образец №2) в процессе культивирования грибов

Результаты исследований показали, что для *G. frondosa* 2639 характерна большая степень разложения лигнина (8,44 %) в сравнении с *A. mellea* D-13 и *L. edodes* F-1000 – 6,14 % и 4,47 %, соответственно. По данным Линденфелсера Л.А. и др., грибы-ксилотрофы разлагают лигнин пшеничной соломы на 20 суток развития мицелия примерно также как и целлюлозу [145]. Это наблюдение подтверждается рисунками 4.1 и 4.2.

При полном заращении и плодоношении процент целлюлозы в субстрате составил для *A. mellea* D-13 – 25,90 %, *L. edodes* F-1000 – 24,60 % и *G. frondosa* 2639 – 23,40 % при содержании ее в исходном субстрате 32,20 % (таблица 4.12).

Таблица 4.12 – Изменение состава субстрата (образец №2) в процессе культивирования грибов (после всего периода плодоношения)

№	Основные показатели	М.д., %			
		Исходный субстрат (образец №2)	<i>A. mellea</i> D-13	<i>L. edodes</i> F-1000	<i>G. frondosa</i> 2639
1	Лигнин	23,12±0,32	16,98±0,50	18,65±0,84	14,68±0,65
2	Целлюлоза	32,20±0,20	25,90±0,28	24,60±0,26	23,40±0,32
3	Зольность	3,54±0,08	2,10±0,05	2,45±0,09	1,96±0,06
4	Общий азот	1,45±0,05	1,65±0,16	1,70±0,08	1,60±0,08
5	Общий белок, N×4,38	–	7,23	7,44	7,01
6	Индекс микогенного ксилолиза	–	0,50	0,62	0,51

Окончание таблицы 4.12

№	Основные показатели	М.д., %			
		Исходный субстрат (образец №2)	<i>A. mellea</i> D-13	<i>L. edodes</i> F-1000	<i>G. frondosa</i> 2639
7	Полисахариды:	69,20±0,34	44,20±0,22	40,50±0,82	36,50±0,56
	– легкогидролизуемые	25,50±0,14	27,20±0,24	23,40±0,56	19,60±0,22
	– трудногидролизуемые	43,60±0,19	17,00±0,32	17,10±0,24	16,90±0,28
8	Липиды	1,30	2,90	2,10	2,23
9	pH	6,00	5,7	5,8	5,8

Одним из основных показателей твердофазного культивирования ксилотрофных грибов на лигноцеллюлозных субстратах является индекс микогенного ксилолиза, который выражается в виде потерь целлюлозы к сумме потерь целлюлозы и лигнина [109, 110]. Величина микогенного ксилолиза определяется биологическими особенностями штаммов [14].

Минимальный индекс микогенного ксилолиза, характеризующий максимальную степень разложения лигнина и целлюлозы, отмечен у штамма *A. mellea* D-13 – 0,50. Затем, у штамма *G. frondosa* 2639 – 0,51. Максимальный индекс ксилолиза был обнаружен у штамма *L. edodes* F-1000 – 0,62 (таблица 4.12). Таким образом, степень разложения лигнина и целлюлозы у *A. mellea* D-13 и *G. frondosa* 2639 выше, чем у *L. edodes* F-1000.

Кроме того, важной особенностью твердофазного культивирования грибов-ксилотрофов является увеличение содержания общего азота в субстрате в процессе их культивирования. Автор Дворнина А.А. [47] отметила увеличение азота у грибов рода *Pleurotus*, культивируемых на стерильной соломе. По ее мнению, это увеличение связано с потерей влаги.

Было показано, что в субстрате уменьшается доля зольных элементов на 40,68; 30,80; 44,63 % и увеличивается количество общего азота на 13,79 %; 17,24 %; 10,34 % для *A. mellea* D-13, *L. edodes* F-1000 и *G. frondosa* 2639, соответственно (таблица 4.12).

Таким образом, было установлено, что в процессе биодеструкции компонентов субстрата для *G. frondosa* 2639 характерна большая степень разложения лигнина 8,44 % и целлюлозы 8,8 % в сравнении с *A. mellea* D-13 –

6,14–6,30 % и *L. edodes* F-1000 – 4,47–7,6 %. Индекс микогенного ксилолиза у вышеперечисленных грибов составил от 0,50 до 0,64.

Оценивая отработанные субстраты после выращивания грибов, следует принимать во внимание тот факт, что утилизация отходов лесного и сельского хозяйства и связанная с ней защита окружающей среды в настоящее время являются острыми проблемами и любые рациональные и экономически выгодные решения должны всячески поддерживаться.

Известно, что солому возвращают в почву в качестве удобрения и энергетического материала для развития процессов почвообразования, из-за содержания в ней ценных питательных веществ, которые положительно влияют на рост и развитие растений. Помимо этого, внесение соломы способствует выделению углекислого газа, вызывая усиление «дыхания» почвы, тем самым улучшая процесс фотосинтеза у растений [12, 113].

Отработанные субстраты, по мнению ряда авторов, как и солому можно использовать в качестве удобрения, измельчая и разбрасывая их по полям [115].

Отработанный субстрат после выращивания штаммов грибов содержит целлюлозу и лигнин, которые являются углеродистыми энергетическими субстратами почвенных микроорганизмов, улучшающих плодородие почвы. Это основной строительный материал для гумуса почвы. Кроме того, отработанный субстрат содержит азот, макро- и микроэлементы, позволяющие использовать его в качестве источников питания для растений (таблица 4.12, 4.13). Отработанные субстраты за счет активности мицелия и способности разлагать лигноцеллюлозное сырье можно применять на свалках, содержащих лигноцеллюлозные отходы, а также использовать при производстве строительных материалов.

В настоящее время особое внимание уделяется вопросам токсикологии в связи с необходимостью контроля содержания ионов ртути, свинца, фтора, мышьяка, кадмия и радионуклидов, учитывая их токсичное действие на окружающую среду, сельскохозяйственных животных и здоровье человека. В

таблице 4.13 приведены результаты исследования минерального состава отработанного субстрата.

Таблица 4.13 – Минеральный состав отработанного субстрата (образец №2) после выращивания грибов

№	Элемент	*ВетПиН – 13-5-01/0101, не более мг/кг	Содержание в 1 кг		
			<i>A. mellea</i> D-13	<i>L. edodes</i> F-1000	<i>G. frondosa</i> 2639
макроэлементы, г					
1	кальций	—	2,00	2,50	4,10
2	калий	—	10,90	10,00	10,20
3	магний	—	4,30	4,10	2,20
4	фосфор	—	9,60	9,20	8,50
5	натрий	—	0,90	1,00	1,30
6	хлор	—	1,00	1,20	1,50
7	сера	—	1,90	1,36	1,10
микроэлементы, мг					
8	цинк	—	93,00	95,00	87,00
9	медь	—	15,00	12,70	12,30
10	марганец	—	149,00	89,00	120,00
11	железо	—	232,00	351,0	220,00
12	кобальт	—	0,15	0,23	0,15
13	йод	—	2,00	0,38	1,50
токсичные элементы, мг					
14	ртуть	0,20	—	—	—
15	свинец	10,00	0,44	0,12	0,30
16	фтор	150,00	4,00	15,00	6,00
17	кадмий	1,00	0,0014	0,002	0,0009
18	мышьяк	4,00	—	—	—
19	радионуклиды	—	—	—	—
*Допустимые уровни по ВетПиН – 13-5-01/0101					

Из данных таблицы 4.13 видно, что содержание экотоксикантов в отработанном субстрате (образец №2) после выращивания грибов не превышает предельно допустимых концентраций по нормативным требованиям безопасности ВетПиН – 13-5-01/0101. В субстрате отсутствовали мышьяк и ртуть, являющиеся особо токсичными элементами.

Благодаря содержанию в субстрате белков, липидов, легко- и трудногидролизуемых полисахаридов, макро- и микроэлементов в достаточном

количестве, его можно использовать в качестве кормовых добавок для птицеводства.

4.3 Использование продуктов биоконверсии в птицеводстве

В настоящее время для реализации генетического потенциала высокопродуктивной сельскохозяйственной птицы необходимо не просто увеличивать уровень потребления кормов, но и повышать в определенных концентрациях обменную энергию (ОЭ), оптимизировав ее соотношение с белком либо с аминокислотами с учетом их доступности. Все это требует точности определения энергетической ценности кормовых ресурсов и комбикормов, а также адекватного повышения уровня ОЭ. В большинстве случаев ОЭ определяет величину конверсии корма и экономическую эффективность производства мяса и яиц птицы.

При нормировании потребления кормов для птицы необходимо обращать внимание на их энергетическую ценность. Известно, что продуктивность птицы на 40–50 % определяется поступлением в ее организм энергии. При этом основными источниками энергии в комбикормах являются зерновые корма и жиры [138].

Энергетическая питательность кормов оценивается по физиологически полезной энергии, доступной для организма птицы.

Для расчета ОЭ комбикормов по их химическому составу рекомендуется использовать формулу Всемирной научной ассоциации по птицеводству (WPSA, 1985):

$$ОЭ, МДж/кг = 13,92 + 0,042П + 0,162Ж - 0,139(К + 3),$$

где П – массовая доля сырого протеина; Ж – сырого жира; К – сырой клетчатки; 3 – сырой золы в сухом веществе, %

Использование этой формулы дает более точные данные благодаря разделению углеводов на крахмал и сахар. В таблице 4.14 приведена ориентировочная суточная потребность цыплят-бройлеров в ОЭ и результаты расчета ОЭ в мицелиально-субстратных комплексах.

Таблица 4.14 – Ориентировочная потребность взрослой птицы в обменной энергии (на голову в сутки)

Вид и возраст птицы	Суточная потребность в ОЭ, ккал [138]	Обменная энергия (ккал/100 г)								
		Мицелиально- субстратный комплекс <i>A. mellea</i> D-13			Мицелиально- субстратный комплекс <i>L. edodes</i> F-1000			Мицелиально- субстратный комплекс <i>G. frondosa</i> 2639		
		1	2	3	1	2	3	1	2	3
Цыплята- бройлеры (дней): 51-56	326,2	25,8	–	–	25,3	30,4	28,2	26,3	32,6	29 ,2
Примечание: 1 – березовые опилки+пшеничные отруби (3:1); 2 – шелуха овса; 3 – пшеничная солома										

Из данных таблицы 4.14 видно, что добавление в рацион цыплят-бройлеров (возраст 51-56 дней) 100 г мицелиально-субстратного комплекса испытуемых грибов составит 7,9 %, 7,7–9,3 % и 8,0–10,0 % от суточной потребности ОЭ.

Использование мицелиально-субстратных комплексов грибов на основе древесных отходов, вероятно, будет малоперспективным, предположительно из-за плохой перевариваемости, благодаря высокому содержанию лигнина и целлюлозы (отработанные субстраты лучше использовать для повышения плодородия почв или для производства экологических строительных материалов). Однако, получение кормовых добавок на основе отходов сельскохозяйственных производств (лузга подсолнечника, шелуха овса и др.) может стать перспективным направлением в кормопроизводстве.

Установив содержание комбикорма в граммах, которое получают цыплята-бройлеры в сутки, и, определив количество в нем питательных веществ, вносить кормовые добавки нужно с таким расчетом, чтобы обеспечить птицу всеми питательными веществами (таблица 4.15).

Таблица 4.15 – Ориентировочные нормы кормления цыплят-бройлеров

Цыплята-бройлеры, возраст (сутки)	М.д., %							
	Сырой протеин	Сырая клетчатка	Кальций	Фосфор	Натрий	Линолевая кислота	Лизин	Метионин +цистин
51–56	16,00	5,50	2,00	0,70	0,20	1,20	0,73	0,60

В дальнейшем применение кормовых добавок с использованием мицелия ксилотрофных грибов и сельскохозяйственных культур и отходов позволит сэкономить расход корма, увеличить убойный вес птицы, сократить сроки откорма, снизить смертность (отход) цыплят, повысить устойчивость к инфекционным заболеваниям и стрессам, улучшить химический состав мяса (придавая ему диетическую чистоту и вкус), отказаться от применения гормональных добавок в кормах.

Таким образом, полученные данные химического состава показывают перспективность использования отработанного субстрата после выращивания штаммов *A. mellea* D-13, *L. edodes* F-1000 и *G. frondosa* 2639 в сельскохозяйственном производстве.

4.4 Оценка экономической эффективности производства плодовых тел грибов

Грибоводство является одним из перспективных направлений сельскохозяйственной промышленности в России. Среди овощной и грибной категорий грибы составляют значительную часть от общего объема отраслевого рынка. Основной проблемой при организации производства грибов является обеспечение окупаемости капиталовложений и правильный выбор технологической системы. Создаваемые в разных районах страны грибоводческие комплексы включают лаборатории по производству мицелия, цеха приготовления субстратов и теплицы [99].

В условиях рыночных отношений создание крупномасштабного промышленного производства грибов обеспечивает эффективное использование дорогостоящих культивационных грибоводческих сооружений и технологического оборудования.

Для оценки экономической эффективности грибоводства применяют общеэкономические показатели: урожайность, кг/м²; цена реализации, руб./кг; себестоимость, руб./кг; прибыль от реализации, руб./кг; доходы, тыс. руб.; расходы, тыс. руб.; рентабельность, %.

Показатели экономической эффективности следует рассматривать в динамике с учетом факторов, влияющих на уровень показателя [99].

Был произведен расчет экономической эффективности организации нового производства плодовых тел *A. mellea* D-13, *L. edodes* F-1000 и *G. frondosa* 2639 на предприятии ООО «Биотехнологии переработки облепихи».

На предприятии предусмотрены климатическая камера общей площадью 32 м² и высотой 210 мм, лаборатория для стерилизации субстратов и получения посевного мицелия, место для сортировки грибов, установлена холодильная камера для хранения грибов, моечное отделение для оборотной тары. Для равномерного выхода продукции необходимо иметь 4 камеры плодоношения, которые загружают последовательно через 2 недели. В каждой камере необходимо установить металлические стеллажи для размещения полипропиленовых банок с субстратом, приточный вентилятор с нагревателем и охлаждением воздуха, мелкодисперсный увлажнитель воздуха, а также светодиодные лампы.

В таблице В.1 (приложение В) приведены затраты на обустройство климатической камеры, в таблице В.2 (приложение В) – смета затрат на сырье и материалы.

Проектная мощность предприятия – 4,2 кг/сут. (1 544 кг/год) для *A. mellea* D-13, 16,1 кг/сут. (5 871 кг/год) для *L. edodes* F-1000 и 26,7 кг/сут. (9 743 кг/год) для *G. frondosa* 2639 рассчитана исходя из вводимого оборудования. Данное предприятие будет перерабатывать от 3 000 до 21 000 кг березовых опилок и от 1 000 до 7 000 кг пшеничных отрубей в год, что составляет 1,4–10,0 % и 0,13–0,9 % от годовых запасов Алтайского края. Ориентировочный технико-экономический расчет опытного производства приведен в таблице В.3 (приложение В).

С учетом производительности предприятия себестоимость 1 кг плодовых тел грибов *A. mellea* D-13, *L. edodes* F-1000 и *G. frondosa* 2639 составит 811,0; 221,0 и 134,0 руб. или 14,2; 3,8 и 2,3 доллара (USD), соответственно. Из данных таблицы 4.16 видно, что наиболее выгодными культурами грибов для

промышленного культивирования плодовых тел являются штаммы *L. edodes* F-1000 и *G. frondosa* 2639. В то время как экономические расчеты по производству штамма *A. mellea* D-13 показали высокую себестоимость.

Таблица 4.16 – Основные экономические показатели производства плодовых тел грибов

Наименование показателя	Культура гриба		
	<i>A. mellea</i> D-13	<i>L. edodes</i> F-1000	<i>G. frondosa</i> 2639
Урожайность, кг/м ²	5 744	14 561	18 124
Цена реализации, руб./кг	–	300,0	300,0
Себестоимость, руб./ кг	811,0	221,0	134,0
Прибыль от реализации, руб./кг	–	456718	1619273
Доходы, руб.	–	1743300	2923200
Расходы, руб.	1252834	1286582	1303927
Рентабельность, %	–	35,5	124,2
Срок окупаемости	–	3 года 3 месяца	11 месяцев

Себестоимость плодовых тел шиитаке и мейтаке в данном проекте сопоставима с себестоимостью этих продуктов в большинстве стран мира (таблица 4.17).

Таблица 4.17 – Себестоимость грибов шиитаке и мейтаке в некоторых странах

Страна, год	Стоимость, \$/кг	Литературный источник
Соединенные Штаты Америки, 2008	2,20-27,50	[158]
Соединенные Штаты Америки, 2018	5,30-32,00	[189]
Мексика, 2011	4,0-59,32	[149]
Китай, 2017	7,0-12,0	[142]
Корея, 2017	7,0-12,0	[142]
Япония, 2017	7,0-12,0	[142]

Учитывая приведенные данные, можно констатировать, что разработанная технология производства грибов позволяет получать конкурентноспособные продукты в условиях мирового рынка. Цены на грибы в каждой стране колеблются в широких пределах, это связано с климатическими условиями места, где организовано производство грибов, стоимостью оборудования и сырья,

экономикой отдельных штатов (США, Мексика), провинций (Китай, Япония, Корея) и другими факторами.

Таким образом, показана целесообразность внедрения в промышленность технологии производства грибов *L. edodes* F-1000 и *G. frondosa* 2639 разработанной на предприятии ООО «Биотехнологии переработки облепихи» с использованием в качестве сырья массовых отходов лесного и сельского хозяйств.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Мировые объемы отходов производств сельского и лесного хозяйств составляют – 2,5 и 3,2 млрд. тонн, соответственно. В Российской Федерации эти показатели составляют около 773,0 млн. тонн для сельского хозяйства и 1167,0 млн. тонн – для лесного. Только в Алтайском крае ежегодное накопление лигноцеллюлозных отходов составляет более 10 млн. тонн. Возможность использования этих отходов является актуальной задачей для России. Одним из важных направлений сельского хозяйства в ряде ведущих стран является грибоводство, которое основано на получении пищевых продуктов с использованием растительных отходов и одновременным сохранением окружающей среды.

На сегодняшний день в Российской Федерации оптимальные методы культивирования грибов являются малоизученными. Основная причина заключается в том, что грибоводство в России длительное время не развивалось. В промышленных масштабах в основном выращивали шампиньоны (*Agaricus bisporus*) и вешенки (*Pleurotus ostreatus*). В связи с этим, в области промышленного производства грибов и его материально-технического обеспечения в России имеются значительные отставания. Поэтому разработка методов интенсивного культивирования ценных грибов-ксилотрофов с применением различных активно воздействующих абиотических и биотических факторов роста (максимально приближенных к природным), приведет к эффективности утилизации отходов деревообрабатывающей промышленности и сельскохозяйственного производства, интенсификации процессов развития мицелия и плодовых тел, что, в свою очередь, позволит организовывать малоотходные производства на основе культивируемых грибов и получать дополнительные продукты для пищевых, фармацевтических и сельскохозяйственных целей. На основании результатов проведенных исследований можно сделать следующие выводы.

1. Определены эколого-биохимические особенности интенсивного культивирования грибов. Установлено, что для роста мицелия *A. mellea* D-13,

L. edodes F-1000 оптимальной является температура 26 ± 1 °С, для *G. frondosa* 2639 28 ± 1 °С, значение pH среды 5,8–6,0. Оптимальная влажность субстрата для роста мицелия – 65 ± 5 %, относительная влажность воздуха для формирования примордиев и образования плодовых тел – 85–90 %, освещенность в пределах 200–250 люкс и стационарная специфическая атмосфера с определенной концентрацией CO₂ и других летучих газов. При использовании оптимальной концентрации рибофлавина и тиамин (0,20 мг/мл) достоверно достигалось ($p=0,95$) увеличение биомассы мицелия *L. edodes* F-1000 в 1,26–1,32 раза и выхода плодовых тел в 1,35–1,40 раза.

2. Показано, что наиболее благоприятной средой для роста мицелия *A. mellea* D-13, *L. edodes* F-1000 и *G. frondosa* 2639 в глубинных условиях является среда со свекловичной мелассой, превышающая контроль в 2,9; 2,1; 1,3 раза, соответственно.

3. Разработаны методы интенсивного культивирования грибов *A. mellea* D-13, *L. edodes* F-1000 и *G. frondosa* 2639 на лигноцеллюлозных отходах производств Алтайского края. Установлен оптимальный субстрат для интенсивного культивирования грибов: березовые опилки / пшеничные отруби (3:1). Выход на этом субстрате превышал контроль в 1,8 раза для *A. mellea* D-13 и *L. edodes* F-1000, в 1,2 раза – для *G. frondosa* 2639.

4. Установлено, что полученные образцы ХтГК из плодовых тел грибов по показателям характеристической вязкости ($1,6\text{--}2,2$ см³/г), молекулярной массы (37,5–51,8 кДа) и степени деацетилирования (75,6–79,5 %) значительно превосходят ХтГК, выделенного из плодовых тел *Pleurotus osteratus*, и сопоставимы с ХтГК из *Aspergillus niger*. По физико-химическим свойствам полученные ХтГК идентифицированы, как соответствующие требованиям пищевого хитозана (ТУ 9289-067-00472124). Показана высокая сорбция ионов кобальта и железа ХтГК, выделенными из *A. mellea* D-13, *L. edodes* F-1000 и *G. frondosa* 2639 – 8,0–10,0; 4,0–6,2 и 5,0–7,8 мг×экв./г, соответственно.

5. Впервые на используемых субстратах изучен химический состав биомассы мицелия, плодовых тел и мицелиально-субстратных комплексов грибов

и исследована возможность их применения в качестве продуктов питания и кормовых добавок для сельскохозяйственной птицы. Показано, что добавление в рацион цыплят-бройлеров 100 г мицелиально-субстратного комплекса грибов *A. mellea* D-13, *L. edodes* F-1000 и *G. frondosa* 2639 составит 7,9 %, 7,7–9,3 % и 8,0–10,0 % от суточной потребности обменной энергии.

6. Установлено, что с учетом производительности предприятия ООО «Биотехнологии переработки облепихи» 1544 кг/год для *A. mellea* D-13, 5871 кг/год для *L. edodes* F-1000 и 9843 кг/год для *G. frondosa* 2639, себестоимость производства 1 кг грибов составит 811,0; 221,0 и 134,0 рублей, соответственно. Период окупаемости единовременных капитальных вложений при организации нового производства грибов составит 3,3 года для *L. edodes* F-1000 и 11 месяцев – для *G. frondosa* 2639.

Перспективы дальнейшей разработки темы.

Дальнейшие исследования могут быть посвящены разработке способов получения лекарственных препаратов из биомассы мицелия и плодовых тел высших базидиальных грибов.

Тысячелетиями люди используют базидиальные грибы для лечения внутренних болезней. В научных лабораториях многих стран ведутся активные исследования биологических соединений тех видов грибов, которые широко использовались в народной медицине [7]. Установлено, что грибы имеют широкий спектр различных биологически активных веществ – полисахариды и их комплексы с белками, органические кислоты, липиды, стероидные вещества, тетрациклические тритерпены, эргостеролы, нуклеозиды, антибиотики [146].

Исследования в области медицинской микологии, начатые с 60-х годов 20 века доказали, что многие высшие базидиальные грибы имеют противоопухолевые и иммуномодулирующие свойства. В Японии препараты на основе полисахаридов используются в лечении онкобольных. Грибы помогают преодолеть негативное последствие химиотерапии рака, снижают содержание холестерина в крови, оказывают общий иммуномодулирующий эффект,

восстанавливают гормональный баланс, улучшают состояние нервной системы [175].

Появились сведения о противовирусных и противобактериальных свойствах грибов, в том числе и тех, у которых ранее была установлена противоопухолевая активность. Для получения лекарственных препаратов до сих пор используют плодовые тела дикорастущих видов [181].

С активным развитием биотехнологии во всем мире открываются большие перспективы в получении лечебно-профилактических препаратов на основе грибов, полученных методом глубинного и твердофазного культивирования. При этом установлено, что по содержанию многих биологически активных веществ мицелий не уступает плодовым телам, а по накоплению белков, липидов, полисахаридов и каротиноидов превосходит их [20]. Большое значение при этом должно уделяться поиску эффективных штаммов – продуцентов биологически активных веществ и разработке методов их выделения.

Несмотря на возрастающее количество зарубежных публикаций, описывающих наличие биологической активности грибов, лекарственные препараты на основе высших базидиомицетов практически отсутствуют на фармацевтическом рынке Российской Федерации.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

ГП – глюкозо-пептонная среда;

КГА – картофельно-глюкозный агар;

СА – сусло-агаровая среда;

ЛГП – легкогидролизуемые полисахариды;

ТГП – трудногидролизуемые полисахариды;

НЖК – насыщенные жирные кислоты;

ННЖК – ненасыщенные жирные кислоты;

ОЭ – обменная энергия;

РК – ростовой коэффициент;

СР – среднесуточная скорость роста;

ХтГК – хитозан-глюкановый комплекс;

БАВ – биологически активные вещества;

A. mellea D-13, *L. edodes* F-1000 и *G. frondosa* 2639 – грибы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Автономова, А.В. Оптимизация состава питательной среды для погруженного культивирования *Ganoderma lucidum* (Curt.:Fr.) P. Karst / А.В. Автономова, Л.М. Краснопольская, В.Н. Максимов // Микробиология. – 2006. – Т. 75. – №2. – С. 186–192.
2. Алексеенко, Е.Н. Пищевая, лечебная и экологическая ценность грибов *Pleurotus ostreatus* / Е.Н. Алексеенко, Т.М. Полишко, А.И. Винников // Вісник Дніпропетровського університету. Біологія, екологія. – 2010. – № 18 (1). – С. 3–9.
3. Анненков, Б.Г. Биотехнология производства и применения посевного мицелия вешенок / Б.Г. Анненков, В.А. Азарова // Дальневосточный аграрный вестник. – 2014. – № 1 (29). – С. 24–32.
4. Бабицкая, В.Г. Ферментативная деструкция лигнина, содержащегося в растительных субстратах мицелиальными грибами / В.Г. Бабицкая // Прикладная биохимия и микробиология. – 1994. – Т. 30., №6. – С. 827–835.
5. Барков, А.В. Использование методов оптимизации питательных сред для выявления штаммов базидиомицетов, активно утилизирующих липиды / А.В. Барков [и др.] // Башкирский химический журнал. – 2013. – № 4 (20). – С. 98–104.
6. Беккер, З.Э. Физиология и биохимия грибов / З.Э. Беккер. – М. : Издательство Московского университета, 1988. – 230 с.
7. Белова, Н.В. Перспективы использования биологически активных соединений высших базидиомицетов в России / Н.В. Белова // Микология и фитопатология. – 2004. – Т. 38. – Вып. 2 – С. 1–7.
8. Билай, В.И. Методы экспериментальной микологии. Справочник / В.И. Билай. – Киев : Наукова думка, 1982. – 334 с.
9. Билай, В.Т. Грибы нынче / В.Т. Билай // АГРО перспектива. – 2000. – № 5. – С. 11.
10. Бисько, Н.А. Биология и культивирование съедобных грибов рода вешенка / Н.А. Бисько, И.А. Дудка. – Киев : Наукова думка, – 1987. – 148 с.
11. Бисько, Н.А. Разработка методики получения физиологически активного инокулюма и изучение кинетических параметров синтеза грибной биомассы и

биологически активных веществ / Н.А. Бисько [и др.] // European journal of biomedical and life sciences. – 2016. – № 3. – С. 4–10.

12. Богданов, А.И. Съедобные макромицеты и энтомопатогенные микромицеты на одном субстрате / Богданов, А. И. [и др.] // Современная микология в России : материалы 3-го Съезда микологов России. – М. : Национальная академия микологии. – 2012. – Т. 3. – С. 368–369.

13. Боголицын, К.Г. «Зеленая» химия лигнина – новые аспекты / К.Г.Боголицын // Физ. хим. лигнина : материалы международной конференции – Архангельск : АГТУ, 2007. – С. 16–21.

14. Богомоллова, О.И. Характеристика процесса микогенного разложения древесины *Quercus robur* L. на территории Оренбургского Предуралья / О.И. Богомоллова // Фундаментальные исследования. – 2014. – № 9–10. – С. 2191–2194.

15. Большаков, С.Ю. О деревообитающих грибах / С.Ю. Большаков // Мордовский заповедник. – 2014. – № 6 (6). – С. 10–14.

16. Бондарцева, М.А. Определитель грибов России : выпуск 1 / М.А. Бондарцева. – СПб. : Наука, 1996. – 193 с.

17. Бондарцева, М.А. Определитель грибов России. Порядок Афиллофоровые : выпуск 2 / М.А. Бондарцева. – СПб. : Наука, 1998. – 198 с.

18. Бондарь, П.Н. Использование отходов деревообрабатывающей промышленности для создания биопрепаратов на основе грибов рода *Trichoderma* / П.Н. Бондарь, В.С. Садыкова // Хвойные бореальной зоны. – 2015. – № 5–6. – С. 286–290.

19. Бухало, А.С. Высшие *Basidiomycetes* – продуценты пищевого белка в глубинной культуре / А.С.Бухало // Мицелиальные грибы (физиология, биохимия, биотехнология) : тезисы докладов Всесоюзной конференции. – Пущино, 1983. – С. 99–100.

20. Бухало, А.С. Биологические особенности лекарственных макромицетов в культуре / А.С. Бухало [и др.]. – Киев : Альтерпрес, 2011. – 212 с.

21. Бухало, А.С. Высшие съедобные базидиомицеты в чистой культуре / А.С. Бухало. – Киев : Наукова думка, 1988. – 144 с.
22. Бухало, А.С. Культивирование съедобных и лекарственных грибов. Практические рекомендации / А.С. Бухало. – Киев : Наукова думка, 2004. – 128 с.
23. Вассер, С.П. Биологические особенности лекарственных макромицетов в культуре. Сборник научных трудов в двух томах. Том 1. / С.П. Вассер. – Киев : Альтерпрес, 2011. – 212 с.
24. Вассер, С.П. Биологические особенности лекарственных макромицетов в культуре. Сборник научных трудов в двух томах. Том 2 / С.П. Вассер. – Киев : Альтерпрес, 2012. – 459 с.
25. Вдовенко, С.А. Влияние температуры на урожайность вешенки обыкновенной при интенсивном выращивании/ С.А. Вдовенко // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. – 2013. – № 2(22). – С. 17–20.
26. Величко, Н.А. Химический состав плодового тела гриба *Pleurotus ostreatus* (Fr) Kumm. / Н.А. Величко, З.Н. Берикашвили // Вестник Красноярского государственного аграрного университета. – 2008. – № 4 – С. 274–278.
27. Ветчинникова, Е.В. Морфологические особенности роста мицелия и плодоношения некоторых штаммов съедобного ксилотрофного базидиомицета *Lentinus edodes* / Е.В. Ветчинникова, В.Е. Никитина // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. – 2007. – Т. 9, № 4. – С. 1085–1090.
28. Вишневский, М. Лекарственные грибы. Большая энциклопедия / М. Вишневский. – М. : Эксмо, 2014. – 402 с.
29. Власенко, В.А. Экологические особенности трутовых грибов в лесостепной зоне Западной Сибири / В.А. Власенко // Сибирский экологический журнал. – 2013. – Т. 20, № 4. – С. 507–513.
30. Волкова, Т.С. Развитие производства грибов в Саратовской области / Т.С. Волкова, Л.А. Бондарь // Концепт. – 2015. – № 5. – С. 1–5.

31. Волчатова, И.В. Использование грибов для удаления древесных остатков в условиях урбанизированных экосистем / И.В. Волчатова, С.А. Медведева // Успехи медицинской микологии. – 2006. – Т. VII. – С. 234–235.
32. Высокоэффективные способы погруженного культивирования ксилотрофных лекарственных и лекарственно-съедобных видов базидиальных грибов / Л.М. Краснопольская, А.В. Автономова, М.И. Леонтьева, И.В. Белицкий, Е.Б. Исакова, В.М. Бухман // Успехи медицинской микологии : пятый всероссийский конгресс по медицинской микологии. – Москва, 2007. – Т. 9. – С. 241.
33. Гарибова, Л.В. Основы микологии : Морфология и систематика грибов и грибоподобных организмов: учебное пособие / Л.В. Гарибова, С.Н. Лекомцева. – Москва : Товарищество научных изданий КМК, 2005. – 220 с.
34. Гарибова, Л.В. Японский гриб шиитаке / Л.В. Гарибова // Наука и жизнь. – 2003. – № 4. – С. 15–18.
35. Гетманец, В.Н. Переработка молочной сыворотки в альбумин молочный / В.Н. Гетманец // Вестник Алтайского государственного аграрного университета. – 2013. – № 4 (102). – С. 78–79.
36. ГОСТ 13586.5-93 Зерно. Метод определения влажности. – М. : ИПК Издательство стандартов, 2001. – 8 с.
37. ГОСТ 27494-87 Мука и отруби. Методы определения зольности. – М. : Стандартинформ, 2007. – 5 с.
38. ГОСТ 32195–2013 (ISO 13903:2005) Корма, комбикорма. Метод определения содержания аминокислот. – М. : Стандартинформ, 2016. – 23 с.
39. ГОСТ ISO 750–2013 Продукты переработки фруктов и овощей. Определение титруемой кислотности. – М. : Стандартинформ, 2014. – 12 с.
40. ГОСТ Р 13192–73 Вина, виноматериалы и коньяки. Метод определения сахаров. – М. : ИПК Издательство стандартов, 2005. – 14 с.
41. ГОСТ Р 13496.4–93 Корма, комбикорма, комбикормовое сырье. Методы определения содержания азота и сырого протеина. – М. : Стандартинформ, 2011. – 15 с.

42. Грецкий, С.В. Метод исчерпывающей экстракции из плодов шиповника собачьего / С.В. Грецкий, Л.А. Павлова // Современные проблемы науки и образования. – 2015. – № 1–1. – С. 1859.

43. Грибов, В.Д. Экономика предприятия : Учебник. Практикум / В.П. Грузинов, В.Д. Грибов.– 3-е изд., перераб. и доп. – М. : Финансы и статистика, 2005. – 336 с.

44. Грин, Н. Биология / Н. Грин, У. Стаут, Д. Тейлор. – М. : Мир, 1993. – 376 с.

45. Громовых, Т.И. Влияние когерентного света на показатели роста мицелия штаммов *Laetiporus sulphureus* (Bull.) Murill, *Fomitopsis officinalis* (Vill.:Fr.) Bond. et Sing., *Fomitopsis pinicola* (Sw.: Fr) P. Karst. и *Trametes versicolor* (L.: Fr.) Lloyd / Т.И. Громовых, Н.В. Жилинская, А.В. Иванов // «Современная микология в России» : тезисы в материалах III международного микологического форума. – Москва, 2015. – Т. 5. – С. 186–188.

46. Гулич, М.П. Пищевая и биологическая ценность мицелия гриба *Ganoderma lucidum*, культивируемого на питательной среде, обогащенной цитратами цинка и германия / Гулич М.П. [и др.] // Микроэлементы в медицине. – 2014. – Т. 15. – С. 13–19.

47. Дворнина, А.А. Базидиальные съедобные грибы в искусственной культуре / А.А. Дворнина. – Кишинев: Штиинца, 1990. – 112 с.

48. Досон, К. Справочник биохимика / К. Досон, Д. Эллиот, У. Эллиот. – М. : Мир, 1991. – 544 с.

49. Дудка, И.А. Культивирование съедобных грибов / И.А. Дудка, В.Т. Билай. – Киев : Наукова думка, 1992. – 31 с.

50. Дудкин, М.С. Пищевые волокна / М.С. Дудкин, Н.К. Черно. – Киев : Урожай, 1988. – 152 с.

51. Евдокимова, О.А. Организация и регуляция физиолого-биохимических процессов / О.А. Евдокимова, С.В. Польских, В.Е. Аксеновская. – Воронеж : ВГУ, 2000. – 58 с.

52. Емельянова, И.З. Химико-технический контроль гидролизных производств / И.З. Емельянова. – М. : Лесная промышленность, 1976. – 328 с.
53. Закутнова, В.И. Биохимические исследования грибов долины Нижней Волги / М.П. Гулич [и др.] // Астраханский вестник экологического образования. – 2013. – № 3 (25). – С. 110–114.
54. Звягинцев, В.Б. Распространенность, вредоносность грибов комплекса *Armillaria* в лесах Беларуси и обоснование лесозащитных мероприятий: автореф. дис. ... канд. биол. наук : 06.01.11 / Звягинцев Вячеслав Борисович. – Минская область, п. Прилуки, 2003. – 19 с.
55. Ильина, Г.В. Биологические особенности видов ксилотрофных базидиомицетов лесостепи правобережного Поволжья *in situ* и *ex situ* / Г.В. Ильина, Ю.С. Лыков // Поволжский экологический журнал. – 2010. – № 3. – С. 263–273.
56. Ильина, Г.В. Ксилотрофные базидиомицеты в чистой культуре : монография / Г.В. Ильина, Д.Ю. Ильин. – Пенза : Издательство Пензенского университета, 2013. – 206 с.
57. Использование базидиальных грибов в технологиях переработки и утилизации техногенных отходов: фундаментальные и прикладные аспекты / Н.А. Куликова, О.И. Кляйн, Е.В. Степанова, О.В. Королева // Прикладная биохимия и микробиология. – 2011. – №6. – С. 619–634.
58. Исследование биоконверсии кукурузного масла в полиненасыщенные грибные липиды с помощью фикомицета *Mortierella alpina* гр-1 / Н.И. Петухова, А.В. Хузина, О.В. Ландер, В.В. Зорин // Башкирский химический журнал. – 2009. – № 4 (16) – С. 83–85.
59. Кучина, Ю.А. Инструментальные методы определения степени деацетилирования хитина / Ю.А. Кучина, Н.В. Долгопятова, В.Ю. Новиков // Вестник МГТУ. – 2012. – Т.15. №1. – С. 107–113.
60. Казарцев, И.А. Изменения химического состава древесины под действием лигнинразрушающего гриба *Phanerochaete sanguinea* / И.А. Казарцев, В.А. Соловьев // Известия Санкт-Петербургской лесотехнической академии. – 2009. – Вып. 188. – С. 253–259.

61. Казарцев, И.А. Разрушение лигнина некоторыми ксилотрофными грибами / И.А. Казарцев // «Молодые исследователи – регионам» : мат. Всероссийск. научн. конф. студентов и аспирантов. – Вологда, 2009. – С. 243–244.
62. Кейтс, М. Техника липидологии. Выделение, анализ и идентификация липидов / М. Кейтс. – М. : Изд-во «Мир», 1975. – 322 с.
63. Киселева, О.В. Морфологические особенности базидиального гриба *Laetiporus sulphureus* в поверхностной и глубинной культуре / О.В. Киселева, П.В. Миронов, Ю.А. Литовка // Вестник Красноярского государственного аграрного университета. – 2012. – № 1 – С. 91–95.
64. Коваленко, А.Г. Гликаны высшего базидиального гриба *Ganoderma adspersum* (Schulzer) Donk: получение и антифитовирусная активность / А.Г. Коваленко, О.Н. Полищук, С.П. Вассер // Biotechnologia Acta. – 2010. – № 5 (3). – С. 83–91.
65. Комиссаренков, А.А. Рентгенофлуоресцентный метод анализ: методические указания к лабораторным работам / А.А. Комиссаренков, С.Б. Андреев. – СПб. : ГОУВПО СПб ГТУ РП, 2008. – 36 с.
66. Кононов, Г.Н. Химия древесины и ее основных компонентов / Г.Н. Кононов. – М. : МГУЛ, 1999. – 247 с.
67. Костина, Н.Е. Выделение, характеристика и противовирусные свойства биологически активных веществ из высших грибов Западной Сибири / Н.Е. Костина [и др.] // Современные проблемы науки и образования. – 2013. – № 3. – С. 15–25.
68. Круподерова, Т.А. Культивирование *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) Kumm. на растительных отходах / Т.А. Круподерова // Biotechnologia Acta. – 2014. – № 4 (7). – С. 92–99.
69. Кузнецов, А.А. Микогенный ксилолиз крупных древесных остатков в лесах средней подзоны тайги / А.А. Кузнецов, Е.В. Шорохова, Е.А. Капица, И.А. Казарцев // «Биологическое разнообразие, озеленение, лесопользование» : сборник материалов международ. научн.-практ. конф.. – СПб. : СПбГЛТА, 2008. – С. 108–112.

70. Кукина, Т.П. Полипренолы некоторых гомобазидиальных грибов (*Homobasidiomycetidae*) / Т.П. Кукина, И.А. Горбунова, И.И. Баяндина // Химия растительного сырья. – 2007. – № 3 – С. 33–38.

71. Куликова, Н.А. Использование базидиальных грибов в технологиях переработки и утилизации техногенных отходов: фундаментальные и прикладные аспекты (обзор) / Н.А. Куликова, О.И. Кляйн, Е.В. Степанова, О.В. Королёва // Прикладная биохимия и микробиология. – 2011. – Т. 47, №6. – С. 619–634.

72. Кутафьева, Н.П. Морфология грибов / Н.П. Кутафьева. – Новосибирск : Сибирское унв. изд-во, 2003. – 215 с.

73. Леонтьева, М.И. Погруженная биомасса *Agrocybe egerita*, *Lentinus edodes*, *Laetiporus sulphureus* с высоким содержанием эссенциальных жирных кислот и противоопухолевыми свойствами / М.И. Леонтьева // Иммунопатология, аллергология, инфектология. – 2010. – №1. – С. 257.

74. Лессо, Т. Грибы. Определитель / Т. Лессо. – М : Астрель, 2003. – 304 с.

75. Лунин, В.В. Зеленая химия в России / В.В. Лунин // Физ. хим. лигнина : материалы междунар. конф. – Архангельск : АГТУ, 2005. – С. 9–10.

76. Логинова, Н.В. Исследование сорбционной способности хитозана по извлечению ионов тяжелых металлов из водных растворов / Н.В. Логинова, Л.А. Смирнова, Н.Г. Черноруков // Вестник Нижегородского университета им. Н.И. Лобачевского. – 1998. – №1. – С. 128–131.

77. Лыков, Ю.С. Роль специфики лигнинсодержащих субстратов при культивировании ксилотрофных грибов *in vitro* / Г.В. Ильина, Д.Ю. Ильин, Ю.С. Лыков // Микология и Фитопатология. – 2009. – Том 43. – Вып. 2. – С. 135–141.

78. Методика выполнения измерений массовой доли жирных кислот в жирах и маслах животных и растительных, маргаринах, жирах для кулинарии, кондитерской и хлебопекарной промышленности методом высокоэффективной жидкостной хроматографии / Свидетельство №36-08 от 04.03.2008. – ФР.1.31. 2008.04633.

79. Минаков, Д.В. Культивирование *Grifola frondosa* на субстрате с березовыми опилками / Д.В. Минаков, К.В. Севодина, В.П. Севедин // Техника и

технология пищевых производств. – 2016. – № 1 (40). – С. 39–45.

80. Минаков, Д.В. Получение биомассы мицелия *Armillaria mellea* в жидкой среде / Д.В. Минаков, А.И. Шадринцева // Пища. Экология. Качество: труды XII международной научно-практической конференции : в 2-х тт. / ФАНО России, Минобрнауки РФ, ФГБНУ «Сиб. науч.-исслед. и технол. ин-т перераб. с.-х продукции», ФГБОУ ВПО Моск. гос. ун-т пищевых производств, Науч.-практ. центр Нац. акад. Наук Беларуси по продовольствию, С.-х. акад. Республики Болгарии, ТОО «КазНИИ ПСХП»; [отв. за вып.: Мотовилов О.К., Еделев Д.А. и др.]. – Новосибирск, 2015. – С. 594–598.

81. Минеральные удобрения и химический состав клубней картофеля / Т.А. Санникова, В.А. Мачулкина, М.Ю. Пучков, Г.В. Гуляева // Технологии пищевой и перерабатывающей промышленности АПК – продукты здорового питания. – 2014. – № 3 – С. 15–19.

82. Морозов, А.И. Грибы: руководство по разведению / А.И. Морозов. – Донецк : Сталкер, 2000. – 304 с.

83. Морозов, А.И. Современное промышленное грибоводство. Популярное издание / А.И. Морозов – М. : АСТ, Донецк : Сталкер, 2007. – 222 с.

84. Музыка, С.М. Грибы северного Присаянья (Состав, экологические особенности и ресурсы) / С.М. Музыка. – Иркутск : ИрГСХА, 2002. – 154 с.

85. Мухин, В.А. Биота ксилотрофных базидиомицетов Западно-Сибирской равнины / В.А. Мухин. – Екатеринбург : УИФ «Наука», 1993. – 161 с.

86. Никитина, В.Е. Особенности роста мицелия *Lentinus edodes* на различных средах / В.Е. Никитина, Р.А. Озерова, О.М. Цивилева // Бюллетень Ботанического сада Саратовского государственного университета. – 2003. – № 2. – С. 176–179.

87. Оболенская, А.В. Лабораторные работы по химии древесины и целлюлозы: учебное пособие для вузов / А.В. Оболенская, З.П. Ельницкая, А.А. Леонович. – М. : Экология, 1991. – 320 с.

88. Овчаренко, Н.С. Влияние метеорологических факторов на развитие грибов отдела *Basidiomycetes* на ароматических и лекарственных растениях /

Н.С. Овчаренко // Научные ведомости Белгородского государственного университета. – 2014. – Том 26., № 3 (174). – С. 43–47.

89. Павлов, И.Н. Морфологические признаки грибов комплекса *Armillaria mellea* sensu lato бореальной области / И.Н. Павлов, А.Г. Миронов, Н.П. Кутафьева // Хвойные бореальной зоны. – 2006. – Вып. 23 (1). – С. 14–21.

90. Переведенцева, Л.Г. Микология: грибы и грибоподобные организмы : учебник / Л.Г. Переведенцева. – 2-е изд., испр. и доп. – СПб. : Издательство «Лань», 2012. – 272 с.

91. Переведенцева, Л.Г. Определитель грибов (агарикоидные базидиомицеты) : учебное пособие / Л.Г. Переведенцева. – Москва : Товарищество научных изданий КМК, 2015. – 119 с.

92. Пикозина, М.А. Культивирование грибов рода *Trichoderma* на вегетативной части топинамбура / М.А. Пикозина [и др.] // Химия растительного сырья. – 2013. – № 1. – С. 77–81.

93. Погруженное культивирование *Flammulina velutipes* и химический состав мицелия / М.И. Шуктуева, А.В. Автономова, Я.А. Масютин, А.А. Новиков, Л.М. Краснопольская // Башкирский химический журнал. – 2001. – Том 18, № 4. – С. 144–148.

94. Поединок, Н.Л. Использование искусственного света при культивировании грибов / Н.Л. Поединок // Biotechnologia Acta. – 2013. – № 6 (6). – С. 58–70.

95. Поединок, Н.Л. Использование низкоинтенсивного лазерного излучения для обработки посевного мицелия некоторых культивируемых высших базидиомицетов / Н.Л. Поединок, Ж.С. Потемкина // Современная микология в России: первый съезд микологов России. – Москва, 2002. – С. 284.

96. Поединок, Н.Л. Световой фактор в биотехнологии культивирования лекарственных грибов / Н.Л. Поединок // Успехи медицинской микологии. – 2004. – Т.3. – С. 230–232.

97. Поединок, Н.Л. Способы интенсификации культивирования съедобных и лекарственных грибов / Н.Л. Поединок, Н.А. Бисько // «Грибоводство и

смежные биотехнологии. Инновации для инвестиций» : научно- практическая конференция.– М. : ВВЦ, Центр «Москва», 2005. – С. 12–13.

98. Получение плодовых тел и глубинного мицелия *Lentinus edodes* (Berk.) Sing [*Lentinula edodes* (Berk.) Pegler] / Е.А. Александрова, Л.А. Завьялова, В.М. Терешина, Л.В. Гарибова, Е.П. Феофилова // Микробиология. – 1998. – Т. 67., № 5. – С. 649–654.

99. Попова, Р.Г. Финансы предприятий 3-е изд. / Р.Г. Попова. – СПб. : Питер, 2010. – 208 с.

100. Получение экстрактов и характеристика биологически активных соединений из *Fomes fomentarius* / М.А. Проценко // Медицина и образование в Сибири. –2013. – № 4 – С. 11.

101. Протасова, М.В. Перспективные направления использования отходов сахарного производства / М.В. Протасова [и др.] // Auditorium. – 2016. – № 2 (10) – С. 32–41.

102. Проценко, М.А. Биологически активные соединения плодовых тел и культивируемого мицелия базидиального гриба *Daedaleopsis tricolor* / М.А. Проценко [и др.] // Фундаментальные исследования. – 2014. – № 12–1. – С. 136–140.

103. Рабинович, М.Л. Разложение природных ароматических структур и ксенобиотиков грибами (обзор) / М.Л. Рабинович, А.В. Болобова, Л.Г. Васильченко // Прикладная биохимия и микробиология. – 2004. – Т. 40., № 1. – С. 5–23.

104. Рабинович, М.Л. Теоретические основы биотехнологии древесных композитов / М.Л. Рабинович, А.В. Болобова, В.И. Кондращенко. – М. : Наука, 2001. – 134 с.

105. Рабинович, М.Л. Теоретические основы биотехнологии древесных композитов. Книга 1: Древесина и разрушающие её грибы / М.Л. Рабинович, А.В. Болобова, В.И. Кондращенко – М. : Наука, 2001. – 262 с.

106. Разумов, И.А. Противовирусная активность водныхэкстрактов и полисахаридных фракций, полученных из мицелия и плодовых тел высших

грибов: научное издание / И.А. Разумов [и др.] // Антибиотики и химиотерапия. – 2010. – Т. 55, № 9–10. – С. 14–18.

107. Решетникова, И.А. Накопление селена и фракционирование его изотопов микроорганизмами. Деструкция лигнина ксилотрофными макромицетами / И.А. Решетникова. – М. : Новинтех-Пресс, 1997. – 197 с.

108. Рублев, С.И. Комплекс дереворазрушающих грибов лиственницы Сукачева на пороге ареала / С.И. Рублев, И.А. Алексеев // Лесной журнал. – 2004. – № 6. – С. 13–19.

109. Сафонов, М.А. Анализ методов изучения экосистемных функций дереворазрушающих базидиальных грибов / М.А. Сафонов // *Universon* : химия и биология. – 2016. – № 11 (29) – С. 8–11.

110. Сафонов, М.А. Скорость микогенной деструкции древесины в лесах Южного Приуралья / М.А. Сафонов // Вестник Оренбургского государственного университета. – 2006. – № 2–2. – С. 18–21.

111. Сидоренко, М.Л. Проблемы искусственного культивирования трутовика лекарственного / М.Л. Сидоренко // Вестник Красноярского государственного аграрного университета. – 2012. – № 2 – С. 98–100.

112. Синицын, А.П. Биоконверсия лигноцеллюлозных материалов : учебное пособие / А.П. Синицын, А.В. Гусаков, В.М. Черноглазов. – М. : Изд-во МГУ, 1995. – 224 с.

113. Скалий, Л.П. Эффективность применения отработанного шампиньонного субстрата и опилок в искусственных смесях при укоренении зеленых черенков садовых культур / Л.П. Скалий // Известия ТСХА. – 2005. – № 3. – С. 48–58.

114. Соловьев, В.А. Микогенный ксилолиз, его экологическое и технологическое значение. Научные основы устойчивости лесов к дереворазрушающим грибам / В.А. Соловьев. – М. : Наука, 1992. – 171 с.

115. Сорокин, И.Б. Применение соломы зерновых культур на удобрение в Томской области: рекомендации / И.Б. Сорокин, Э.В. Титова, Л.В. Касимова,

А.В. Кравец, Н.А. Щедрухина, Н.Н. Терещенко, М.С. Калиниченко. – Томск : ГНУ СибНИИТ СО РАСХН, 2004. – 10 с.

116. Сортамент строительных материалов из древесины [Электронный ресурс]. – Электрон. текст дан. – Новосибирск : Эксперт Сибирь, 2006. – Режим доступа: <http://www.mukhin.ru/stroysovet/framehouse/07.html>. (дата обращения: 05.10.2016). – Загл. с экрана.

117. Сравнительная оценка аминокислотного и белкового составов мицелия и плодовых тел некоторых базидиомицетов / Д.В. Минаков, К.В. Севодина, А.И. Шадринцева, В.П. Севодин // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. – 2016. – № 3 (18). – С. 51–56.

118. Сравнительная оценка некоторых базидиомицетов в поверхностной и глубинной культуре / Д.В. Минаков [и др.] // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. – 2016. – № 4 (19). – С. 46–52.

119. Стахеев, И.В. Биотехнология малотоннажного производства микробного протеина / И.В. Стахеев, Э.И. Коломиец, Н.А. Здор. – Минск : Навука і тэхніка, 1991. – 264 с.

120. Степанова, Л.В. Выделение и характеристика лектина с поверхности мицелия *Grifola frondosa* (Fr.) S.f. Gray. / Л.В. Степанова, В.Е. Никитина, А.С. Бойко // Микробиология. – 2007. – №1. – С. 488–493.

121. Степень, Р.А. Альтернативные пути рациональной переработки древесных отходов / Р.А. Степень, С.М. Репях // Инвестиционный потенциал лесопромышленного комплекса Красноярского края: мат. науч.-практ. конф. – Красноярск, 2001. – С. 14–19.

122. Скрябин, К.Г. Хитин и хитозан: получение, свойства и применение / К.Г. Скрябин, Г.А. Вихревой, В.П. Варламова. – М. : Наука, 2002. – 368 с.

123. Танащук, Т.Н. Разработка биотехнологии производства съедобного гриба *Lentinus edodes* (Berk.) Sing, на отходах переработки винограда : автореф. дис. ... канд. техн. наук :03.00.20 / Танащук Татьяна Николаевна. – Ялта, 1997. – 16 с.

124. Теплякова, Т.В. Высшие грибы Западной Сибири – перспективные объекты для биотехнологии лекарственных препаратов / Т.В. Теплякова, Т.А. Косогова. – Новосибирск, 2014. – 298 с.

125. Тищенко, А.Д. Субстраты для культивирования вешенки. Часть 1. Характеристика субстратов / А.Д. Тищенко. – М. : Школа грибоводства, 1999. – 59 с.

126. Тищенко, А.Д. Субстраты для культивирования вешенки. Часть 2. Приготовление субстратов / А.Д. Тищенко. – М. : Школа грибоводства, 2004. – 56 с.

127. Трухоновец, В.В. Морфолого-культуральная характеристика и рост съедобных и лекарственных базидиальных грибов в культуре / В.В. Трухоновец // Проблемы лесной фитопатологии и микологии. – 2015. – № 1. – С. 218–221.

128. Федоров, Н.И. Морфологическое разнообразие опенка осеннего в лесах Беларуси в зависимости от породного состава и субстрата произрастания / Труды БГТУ : Лесное хозяйство/ Н.И. Федоров, В.Б. Звягинцев. – Минск : Мн. – 2001. – Сер.1. – Вып. IX. – С. 69–71.

129. Федотов, О.В. Регуляция синтеза полифенольных веществ некоторыми штаммами базидиомицетов / О.В. Федотов, А.К. Велигодская // Биологический вестник Мелитопольского государственного педагогического университета им. Богдана Хмельницкого. – 2014. – № 1 (10) – С. 35–47.

130. Халипский, А.Н. Жирнокислотный состав растительного масла сортов ярового рапса в условиях Красноярской лесостепи / А.Н. Халипский, Н.Г. Ведров, А.А. Рябцев // Вестник Красноярского государственного аграрного университета. – 2015. – № 3. – С. 90–94.

131. Характеристика метаболитов гликопротеиновой природы ксилотрофного базидиомицета *Lentinus edodes* в условиях глубинного и поверхностного культивирования / А.А. Галицкая, Е.П. Ветчинкина, В.Е. Никитина, В.Г. Бабицкая, В.В. Щерба, Т.А. Пучкова // Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия Химия. Биология. Экология. – 2010. – Вып. № 1. – Т. 10. – С. 29–35.

132. Цапалова, И.Э. Дикорастущие съедобные грибы как источник белковых веществ / И.Э. Цапалова, В.И. Бакайтис // Известия ВУЗов. Пищевая технология. – 2004. – № 1. – С. 64–65.

133. Шелеметьева, О.В. Контроль содержания водорастворимых витаминов в биологически активных добавках, пищевых продуктах и премиксах методом высокоэффективной жидкостной хроматографии / О.В. Шелеметьева, Г.Б. Слепченко, А.Н. Австриевских // Заводская лаборатория. Диагностика материалов. – 2008. – Т. 74., №5. – С. 6–9.

134. Шиврина, А.Н. Биологически активные вещества высших грибов / А.Н. Шиврина. – М.-Л. : Наука, 1965. – 202 с.

135. Шубина, Е.Е. Влияние ионов кадмия на жизненную активность мицелия *Pleurotus osteratus* в питательных средах различного состава / Е.Е. Шубина // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. 2013. – Т.15, №3 (7). – С. 2346–2349.

136. Щеглова, И.В. Влияние вакуумно-импульсной обработки грибов на аминокислотный состав и трипсинингибирующую активность / И.В. Щеглова, А.Л. Верещагин // Техника и технология пищевых производств. – 2010. – № 1. – С. 16.

137. Эксперт Сибирь [Электронный ресурс]. – Электрон. текст дан. – Новосибирск : Эксперт Сибирь, 2011. – Режим доступа: http://fictionbook.ru/author/redaksiya_jurnala_yekspert_sibir/yekspert_sibir_17_19_2011/.html (дата обращения: 17.08.2016).

138. Экспертиза кормов и кормовых добавок : учебно-справочное пособие / К.Я. Мотовилов, А.П. Булатов, В.М. Позняковский, Н.Н. Ланцева, И.Н. Миколайчик. – Новосибирск : Сибирское университетское издательство, 2004. – 303 с.

139. Antitumor and immunomodulating activities of a beta-glucan obtained from liquid cultured *Grifola frondosa* / I. Suzuki, K. Hashimoto, S. Oikawa, K. Sato, M. Osawa, T.Yadomae // Chem Pharm Bull. – 1989. – № 37. – P. 410–413.

140. Atri, N.S. Effect of Vitamins and Growth Regulators on the Vegetative Growth of *Lentinus connatus* Berk / N.S. Atri, D. Kumari, S.K. Sharma // *Indian Journal of Mushroom*. – 2010. – Vol. 28. – P. 63–69.

141. Atri, N.S. Evaluation of vitamin, phytohormone and trace element requirements of *Lentinus cladopus* Lév / N.S. Atri, L. Guleria // *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. – 2013. – Vol. 5 (4). – P. 40–42.

142. Asia Mushrooms and Truffles Market Report [Электронный ресурс]. – Электрон. текст дан. – Analysis and Forecast to 2025 – Research and Markets, 2017. – Режим доступа: <https://www.businesswire.com/news/home/20171005005505/en/Asia-Mushrooms-Truffles-Market-Report-2017--> (дата обращения 15.09.2016).

143. Barros, L. Fatty acid and sugar compositions and nutritional value of five wild edible mushrooms from Northeast Portugal / L. Barros, P. Baptista, D.E. Correia, S. Casal, B. Oliveira, I. C. F. R. Ferreira // *Food Chem.* – 2007. – № 105. – P. 140–145.

144. Bender, S. The antibiotic activity of the edible and medicinal mushroom *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. / S. Bender, G.T. Lonergan, J. Backhaus // *Intern.J. Medicinal Mushrooms*. – 2001. – V. 3, № 2–3. – P. 16–19.

145. Biological modification of the lignin and cellulose components of wheat straw by *Pleurotus ostreatus* / L.A. Lindenfelser, R.W. Detroy, J.M. Ramstack, K.A. Worden // *Develop. Ing. Microbiol.* – 1979. – № 20 (4). – P. 541–551.

146. Borchers, A.T. Mushrooms, tumors and immunity / A.T. Borchers, J.S. Stem, R.M. Hackman, C.L. Keen, M.E. Gershwin // *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* – 1999. – № 221. – P. 281–293.

147. Chemical Compositions and antioxidant activities of polysaccharides from the sporophores and cultured products of *Armillaria mellea* / Z. Shanshan, L. Xiaoqian, Y. Lihua, Z. Qiwei, Z. Jingjing, H. Na, W. Zhimin // *Molecules*. – 2015. – № 4 (20). – C. 5680–5697.

148. Chitosan-glucan complex, method for its production and end uses : United States Patent № 4368322 / R. Muzzarelli; patent owner: R. Muzzarelli, application: 625 A/78 from 14.06.1978, enveloped 11.01. 1983.

149. Consumption of edible mushrooms in developing countries: the case of Mexico / C.P. Romaine, C.B. Keil, D.L. Rinker, D. Royse // Science and cultivation of edible and medicinal fungi. – 2004. – Penn State University Press. – P. 687–696.

150. Cuppers, H.G. A model for the combined effects of temperature and salt concentration on growth rate of food spoilage molds / H.G. Cuppers, S. Oomes, S. Brul // Applied Environmental Microbiology. – 1997. – 6310. – P. 3764–3769.

151. Effect of aeration rate on the mycelial morphology and exobiopolymer production in *Cordyceps militaris* / J.P. Park, Y.M. Kim, S.W. Kim, H.J. Hwang, Y.J. Cho, Y.S. Lee, C.H. Song, J.W. Yun // Process Biochemistry. – 2002. – Vol. 37(11). – P. 1257–1262.

152. Effect of conditions of submerged culturing of a medicinal fungus *Ganoderma lucidum* (Rei Shi) on polysaccharide production / V.G. Babitskaya, V.V. Shcherba, T.A. Puchkova, D.A. Smirnov, N.A. Bisko, N.L. Poyedinok // Biotechnology in Russia. – 2007. – Vol. 6. – P. 42–52.

153. Effect of pH on mycelial growth and sporulation of *Aspergillus parasiticus* / A. Abubakar, H.A. Suberu, I.M. Bello, R. Abdulkadir, O.A. Daudu, A.A. Lateef // Journal of Plant Sciences. – 2013. – 1(4). – P. 64–67.

154. Effect of temperature and lactic acid bacteria on the surface growth of *Geotrichum candidum* / A. Hudecova, L. Valik, D.L. Ptakova, J. Pelikanova, M. Ciznar // Czech J. Food Sci. – 2011. – Vol. 29. – P. 61–68.

155. EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA). Scientific Opinion on the safety of «Lentinus edodes extract» (Lentinex) as a Novel Food / EFSA // Food in gradient. EFSA Journal. – 2010. – Vol. 8(7). – P. 1685.

156. Eger, G. Blue-light photomorphogenesis in mushrooms (Basidiomycetes) / G. Eger // Blue-light syndrome. Berlin etc. – 1980. – P. 555–562.

157. Fengjie, C. Purification and partial characterization of a novel anti-tumor glycoprotein from cultured mycelia of *Grifola frondosa* / C. Fengjie, Z. Xinyi, L. Yunhong, Y. Yan, S. Wenjing, Z. Qiang, Y. Silian, D. Ying // Int J Biol. Macromol. – 2013. – №13. – P. 8114–8130.

158. Gold, M.A. A Competitive Market Analysis of the United States Shiitake Mushroom Marketplace / M.A. Gold, M.M. Cernusca, L.D. Godsey // Horttechnology. – 2008. – Vol. 18(3). – P. 489–499.

159. Grigoryan, K.M. Effect of water activity, pH and temperature on contamination level of dried vine fruit by filamentous fungi during storage / K.M. Grigoryan, L.L. Hakobyan // Chemistry and Biology. – 2015. – №3. – P. 23–28.

160. Hamelinck, C.N. Ethanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance in short-, middle-and long-term / C.N. Hamelinck, G.V. Hooijdonk, A.P.C. Faaij // Biomass and bioenergy. – 2005. – Vol. 28, № 4. – P. 384–410.

161. Hansen, L. Nordic macromycetes (*Polyporales*, *Boletales*, *Agaricales*, *Russulales*) / L. Hansen, H. Knudsen // Nordsvamp-Copenhagen. – 1992. – Vol. 2. – P. 474.

162. Hatvani, N. Antibacterial effect of the culture fluid of *Lentinus edodes* mycelium grown in submerged liquid culture / N. Hatvani // Int. J. Antimicrob. Agents. – 2001. – Vol. 17, №1. – P. 71–74.

163. Ibrahim, M. Effect of Temperature and Relative Humidity on the Growth of *Helminthosporium fulvum* / M. Ibrahim, A.B. Rabah, B.Liman, N.T. Ibrahim // Nig. J. Basic and Appl. Sci. – 2011. – 19 (1). – P. 127–129.

164. Jonathan, S.G. Studies on phytohormones, vitamins and mineral element requirements of *Lentinus subnudus* Berk and *Schizophyllum commune* (Fr. ex. Fr.) Fr. from Nigeria / S.G. Jonathan, I.O. Fasidi // Food Chemistry. – 2001. – Vol. 75. – P. 303–307.

165. Jorgensen, H. Enzymatic conversion of lignocellulose into fermentable sugars: challenges and opportunities / H. Jorgensen, J.B. Kristensen, C. Felby // Biofuels, Bioproducts and Biorefining. – 2007. – Vol. 1., №2. – P. 119–134.

166. Kalac, P. Chemical composition and nutritional value of European species of wild growing mushrooms: A review/P. Kalac // Food Chem. – 2009. – № 9–16. – P. 627–633.

167. Kaur, M.J. Effect of nutrient elements, vitamins and growth regulators on the vegetative growth of *Lentinus edodes* / M.J. Kaur, T.N. Lakhanpal // Mushroom Research. – 1995. – Vol. 4. – P. 1–14.

168. Korhonen, K. Fungi belonging to the Genera *Heterobasidion* and *Armilaria* in Eurasia / K. Korhonen // Грибные сообщества лесных экосистем. – 2004. – Том 2. – С. 89–113.

169. Kwon, H. Nutritional and Medicinal Values of Shiitake. Shiitake Cultivation : Mushroom Growers : Handbook 2. Chapter 1 / H. Kwon, C. Hobbs–Seoul : Mushworld, 2005. – P. 17–28.

170. Lee, B.C. Biological activities of the polysaccharides produced from submerged culture of the edible basidiomycete *Grifola frondosa* / B.C. Lee, J.T. Bae, H.B. Pyo // Enzyme and Microbial Technology. – 2003. – Vol. 32, №5. – P. 574–581.

171. Manjunathan, J. Physicochemical studies on *Lentinus tuberregium* (Fr.) Fr. An Indian Edible Fungus / J. Manjunathan, V. Kaviyarasan // International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences. – 2011. – Vol. 3. – P. 60–63.

172. Mao, C.F. Physicochemical characterization of grifolan: Thixotropic properties and complex formation with Congo Red Carbohydrate / C.F. Mao, M.C. Hsu, W.H. Hwang // Polymers. – 2007. – № 68. – P. 502–510.

173. Mayuzumi, Y. Cultivation methods of maitake (*Grifola frondosa*) / Y. Mayuzumi, T. Mizuno // Food Review International. – 1997. – Vol. 13. – P. 357–364.

174. Mistry, B.D. Handbook of spectroscopic data: chemistry. (UV, IR, PMR, ¹³CNMR and mass spectroscopy) / B.D. Mistry. – Jaipur : Oxford Book Company, 2009. – 242 p.

175. Mushroom lectin enhanced immunogenicity of HBV DNA vaccine in C57BL/6 and HBsAg-transgenic mice / W. Gao, Y. Su, S. Chen, J. Zhang, Y. Wang // Vaccine. – 2013. – № 31. – P. 2273–2280.

176. Muszynska, B. Analysis of indole compounds in fruiting bodies of *Armilaria mellea* fruiting bodies / B. Muszynska, K. Sulkowska-Ziaja, H. Ekiert // Acta Pol. Pharm. – 2011. – № 68. – P. 93–97.

177. Muszynska, B. Phenolic acids in selected edible basidiomycota species: *Armillaria mellea*, *Boletus badius*, *Boletus edulis*, *Cantharellus cibarius*, *Lactarius deliciosus* and *Pleurotus ostreatus* / B. Muszynska, K. Sulkowska-Ziaja, H. Ekiert // Acta Sci. Pol., Hortorum Cultus. – 2013. – № 12(4). – P. 107–116.

178. Muthukumar, A. Effect of light and aeration on the growth of *Sclerotium rolfsii* in vitro / A. Muthukumar, A. Venkatesh // African Journal of Biotechnology. – 2013. – Vol. 12(49). – P. 6843–6846.

179. Pandey, J. New developments in solid-state fermentation / A. Pandey, C.R. Soccol, D. Mitchell // I. Processes Products. Process. Biochem. – 2000. – Vol. 35. – P. 1153–1169.

180. Ponizovskaya, V.B. Effect of water activity and relative air humidity on the growth of *Penicillium chrysogenum* Thom, *Aspergillus repens* (Corda) Sacc., and *Trichoderma viride* Pers. Isolated from living spaces / V.B. Ponizovskaya, A.B. Antropova, V.L. Mokeeva, E.N. Bilanenko, L.N. Chekunova // Microbiology. – 2011. – Vol. 80 (3). – P. 378–385.

181. Przybylowicz, P. Shiitake growers handbook: the art and science of mushroom cultivation. Physical and chemical factors / P. Przybylowicz, J. Donoghue. – Dubuque: Kendall : Hunt Publ. Co., 1991. – 232 p.

182. Regula, J. Dried shiitake (*Lentinula edodes*) and Oyster (*Pleurotus ostreatus*) mushrooms as a good source of nutrient / J. Regula, M. Siwulski // Acta Sci. Pol., Technol. Aliment. – 2007. – № 6(4). – P. 135–142.

183. Rehman, A.U. Purification of laccase II from *Armillaria mellea* and comparison of its properties with those of laccase I. / A.U. Rehman, C.F. Thurston // Mycological Research. – 1996. – Vol. 100. – P. 1099–1105.

184. Reis, F. S. Chemical composition and nutritional value of the most widely appreciated cultivated mushrooms: an inter-species comparative study / F. S. Reis, L. Barros, A. Martins, I.C.F.R. Ferreira // Food and Chemical Toxicology. – 2012. – Vol. 50 (2). – P. 191–197.

185. Ritz, B.W. Supplementation with active hexose correlated compound increases the innate immune response of young mice to primary influenza infection /

B.W. Ritz, S. Nogusa, E.A. Ackerman, E.M. Gardner // The Journal of Nutrition
Nutritional Immunology J. Nutr. – 2006. – № 136. – P. 2868–2873.

186. Selection of white-rot basidiomycetes for bioconversion of mustard (*brassica compestris*) straw under solid-state fermentation into energy substrate for rumen micro-organism / M.K. Tripathi, A.S. Mishra, A.K. Misra, S. Vaithiyanathan, R. Prasad, R.C. Jakhmola // Letters in Applied Microbiology. – 2008. – Vol. 46. – P. 364–370.

187. 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.

188. Singh, R. Physiological and Biochemical Investigations for the Cultivation of *Lentinus squarrosulus* (Mont.) Singer. / R. Singh // Ph. D. Thesis 2010. Punjabi University of Patiala, India.

189. Specialty Crops Market News Division / National Retail Report – Specialty Crops. – 2018. – Vol.12. – №14. – P.38.

190. Stott, K. Specialty Mushroom Production Systems: Maitake and Morels / K. Stott, M. Caroline. – By Publication No. 04/024 Project No. UT-30A. – 2004. – 98 p.

191. Submerged culture conditions for the production of mycelial biomass and exopolysaccharides by the edible Basidiomycete *Grifola frondosa* / B.C. Lee, J.T. Bae, H.B. Pyo, T.B. Choe, S.W. Kim, H.J. Hwang, J.W. Yun // Enzyme and Microbial Technology. – 2004. – Vol. 35, №5. – P. 369–376.

192. Submerged culture fermentation of higher fungi: the macrofungi / M. Fazenda, R. Seviour, B. McNeil, L. Harvey // Adv. Appl. Microbiol. – 2008. – V. 63. – P. 33–92.

193. Tabata, T. Comparison of chemical compositions of maitake (*Grifola frondosa* (Fr.) S. F. Gray) cultivated on logs and sawdust substrate / T. Tabata, Y. Yamasaki, T. Ogura // Food Sci. Technol. Res. – 2004. – №10. – P. 21–24.

194. Taherzadeh, M.J. Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: a review / M.J. Taherzadeh, K. Karimi // International journal of molecular sciences. – 2008. – Vol. 9, № 9. – P. 1621–1651.

195. The cultivation, bioactive components and pharmacological effects of *Armillaria mellea* / L.W. Gao, W.Y. Li, Y.L. Zhao, J.W. Wang // Afr. J. Biotech. – 2009. – 8(25). – P. 7383–7390.

196. Tyagi, S. Effect of different pH on the growth and sporulation of *Fusarium oxysporum*: The causal organism of wilt disease of Tomato / S. Tyagi, R. Paudel // International Journal of Basic and Applied Biology (IJBAB). – 2014. – Vol. 2, № 1. – P. 103–106.

197. Wasser, S.P. Medicinal mushrooms. *Lentinus edodes* (Berk.) Sing, (shiitake mushroom) / S.P. Wasser, E. Nevo – San Antonyo, Haifa, Kiev, 1997. – 87 p.

198. Wu, M.J. Immunomodulatory properties of *Grifola frondosa* in submerged culture / M.J. Wu, T.L. Cheng, S.Y. Cheng, T.W. Lian, L. Wang, S.Y. Chiou // J. Agric. Food Chem. – 2006. – № 54 (8). – P. 2906–2914.

199. Yamamoto, Y.H. Immunopotentiating activity of the water-soluble ligning rich fraction prepared from LEM – the extract of the solid culture medium of *Lentinula edodes* mycelia / Y. Yamamoto, H. Shirono, K. Kona, Y. Ohashi // Bioscience, Biotechnology and Biochemistry. – 1997. – № 61 (11). – P. 1909–1912.

200. Zeng, Y. Lignin plays a negative role in the biochemical process for producing lignocellulosic biofuels / Y. Zeng [et al.] // Current opinion in biotechnology. – 2014. – Vol. 27. – P. 38–45.

ПРИЛОЖЕНИЕ А

**Акт внедрения результатов диссертационной работы
в ООО «Биотехнологии переработки облепихи»
(обязательное)**

УТВЕРЖДАЮ

Директор ООО «Биотехнологии
переработки облепихи»

Е.С. Баташов

«19» апреля 2018 г.



АКТ ВНЕДРЕНИЯ

результатов диссертационного исследования

Предмет внедрения:

Результаты диссертационного исследования по теме «Влияние эколого-биохимических параметров биоконверсии растительного сырья на выход биомассы плодовых тел ксилотрофных базидиомицетов».

Автор:

Минаков Денис Викторович

Место внедрения: ООО «Биотехнологии переработки облепихи», г. Бийск**Результаты и эффективность внедрения:**

Проектирование систем культивирования высших грибов проводилось в теплице общей площадью 32 м². В качестве объекта исследования были выбраны штаммы *Lentinula edodes* F-1000 и *Grifola frondosa* 2639. В качестве субстратов для производства плодовых тел грибов использовались отходы лесного и сельского хозяйств, пивоваренного производства и садоводства (березовые опилки, дробленые ветки облепихи, пивная дробина, шелуха овса, облепиховый шрот, лузга подсолнечника, пшеничная солома). Испытания проводились в январе-апреле 2018 года.

В результате проведенных исследований был установлен оптимальный состав субстрата для интенсивного культивирования грибов *L. edodes* F-1000 и *G. frondosa* 2639: березовые опилки / облепиховый шрот (3:1). Урожайность на этом субстрате превышала контроль в 1,8 раза для *L. edodes* F-1000, в 1,2 раза – для *G. frondosa* 2639.

При изучении регуляторов роста, влияющих на выход плодовых тел грибов, было установлено, что рибофлавин и тиамин оказывают стимулирующее действие на интенсификацию ростовых процессов у мицелия *L. edodes* F-1000 и *G. frondosa* 2639. При использовании оптимальной концентрации этих витаминов (0,20 мг/мл) достоверно достигалось ($p=0,95$) увеличение выхода плодовых тел *L. edodes* F-1000 в 1,35-1,40 раза.

По результатам проведенных исследований была выпущена опытная партия плодовых тел грибов *L. edodes* F-1000 – 123,0 кг, *G. frondosa* 2639 – 132,0 кг.

Технолог ООО «БПО»

А. И. Чумичев

ПРИЛОЖЕНИЕ Б

**Акт внедрения результатов диссертационной работы в учебный процесс
Бийского технологического института (филиала)
Алтайского государственного технического университета им. И.И. Ползунова
(обязательное)**


 МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И
 НАУКИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
 Бийский технологический институт
 (филиал)
 федерального государственного
 бюджетного образовательного учреждения
 высшего образования
 "Алтайский государственный технический
 университет им. И.И. Ползунова"
 (БТИ Алт ГТУ)

УТВЕРЖДАЮ
 Первый заместитель директора
 по учебной работе
 _____ В.А. Харитонов
 « 8 » февраля 2018 г.

АКТ ВНЕДРЕНИЯ

в учебный процесс результатов диссертационной работы
 по теме «Влияние эколого-биохимических параметров биоконверсии
 растительного сырья на выход биомассы плодовых тел ксилотрофных
 базидиомицетов»

Материалы кандидатской диссертации старшего преподавателя кафедры биотехнологии Минакова Д.В. используются при осуществлении образовательного процесса по дисциплине «Промышленная биотехнология», а также при выполнении студентами научно-исследовательских и выпускных квалификационных работ по специальностям 19.03.01 Биотехнология (профиль Биотехнология) и 19.04.01 Биотехнология (магистерская программа «Химия и технология биологически активных веществ»).

Научные положения, практические рекомендации и современные методы исследований, сформулированные автором в диссертационной работе, представляют для студентов 2-4 курсов не только теоретическую, но и практическую ценность.

Заведующий кафедрой биотехнологии,
д, фарм., н., профессор



Ю.А. Кошелев

Начальник отдела учебной работы
и менеджмента качества образования



Т.М. Тушкина

ПРИЛОЖЕНИЕ В
Затраты на обустройство климатической камеры
(обязательное)

Таблица В.1 – Затраты на обустройство климатической камеры

№	Наименование	Ед. изм.	Количество	Цена за 1 ед. в руб.	Сумма в руб.
1.	Кондиционер ElectroluxEACS-12HLO/N3/16Y (3,5 кВт)	шт.	1	24 499	24 499
2.	Транспортер подачи субстрата (ТПС-650) (2,2 кВт)	шт.	1	16 700	16 700
3.	Пресс-машина субстратных блоков ПМСБ-1-э (11 кВт)	шт.	1	250 000	250 000
4.	Дозатор мицелия МФ-05 (1 кВт)	шт.	1	165 000	165 000
5.	Рециркуляционная часть (0,56 кВт)	шт.	1	11 000	11 000
6.	Система автоматического управления САУ КУ-5000/16	шт.	1	15 000	15 000
7.	Смесительный узел СУ2-40-2.5 (0,075 кВт)	шт.	1	98 997	98 997
8.	Компрессорно-конденсаторный блок DK-03WC/F (3,2 кВт)	шт.	1	112 960	112 960
9.	Комплект опор КУ-5000/16	шт.	1000	20	20 000
10.	Воздуховоды	шт.	10	500	5 000
11.	Форсунки и фитинги	шт.	50	350	17 500
12.	Трубки высокого давления	шт.	10	180	1 800
13.	Фильтр Эко Доктор 2-1/2 «ST»	шт.	3	2 000	6 000
14.	Увлажнитель УВД-8 (1,5 кВт)	шт.	1	90 000	90 000
15.	Приточно-вытяжная установка с охлаждением Mitsubishi Electric LGH-15RVX-E (840 Вт)	шт.	1	38 660	38 660
16.	Банки для культивирования (объем 800 дм ³)	шт.	1000	249	249 000
17.	Металлоконструкция покрытая сеткой-рабицей (10 м)	шт.	10	2 030	20 300
18.	Светильники (150 Вт)	шт.	10	527	5 270
19.	Лампы дневного света (25 Вт)	шт.	20	50	1 000
20.	Парогенератор ПЭЭ (7,2 кВт)	шт.	1	72 000	72 000
21.	Ламинар-бокс (790 Вт)	шт.	1	144 000	144 000
22.	Термостат (150 Вт)	шт.	3	18 500	55 500

Окончание таблицы В1

№	Наименование	Ед. изм.	Количество	Цена за 1 ед. в руб.	Сумма в руб.
23.	Шейкер-инкубатор Biosan ES-20 (450 Вт)	шт.	1	110 214	110 214
24.	Холодильник Бирюса 118(0,67 кВт-час)	шт.	1	12 499	12 499
25.	Морозильная камера Бирюса 148(0,49 кВт-час)	шт.	1	10 782	10 782
26.	Сушильный шкаф ШС-80-01 СПУ (1,6 кВт)	шт.	1	16 700	16 700
27.	Емкость для стерилизации	шт.	1	20 000	20 000
28.	Субстратная машина СМ-8 (4 кВт)	шт.	1	900 000	900 000
29.	Прочее – до 10% от общей суммы				136 826
Итого:					1 505 091

Таблица В.2 – Смета затрат на сырье и материалы

Наименование	Расход сырья и реактивов на 1 кг грибов, кг			Стоимость 1 кг сырья и реактивов, руб.	Расход сырья и реактивов на годовой выпуск, кг			Стоимость сырья и реактивов, на годовой выпуск, руб.		
	1	2	3		1	2	3	1	2	3
Березовые опилки	5,125	3,145	2,321	1,0	7914	18465	22616	7914	18465	22616
Пшеничные отруби	1,673	1,015	0,726	4,1	2583	5959	7074	10590	24432	29004
Свекловичная меласса	0,012	0,006	0,004	20,0	18530	35227	38976	371	704	779
NH ₄ NO ₃	0,0008	0,0005	0,004	12,4	1235	2936	3898	15	36	48
KH ₂ PO ₄	0,0004	0,0003	0,0003	250,0	618	1761	2923	154	440	731
Тиамин	–	0,0002	0,0002	1219,0	–	1174	1949	–	1431	2376
Итого:								19046	45509	55554
Примечание: 1 – <i>A. mellea</i> D-13; 2 – <i>L. edodes</i> F-1000; 3 – <i>G. frondosa</i> 2639										

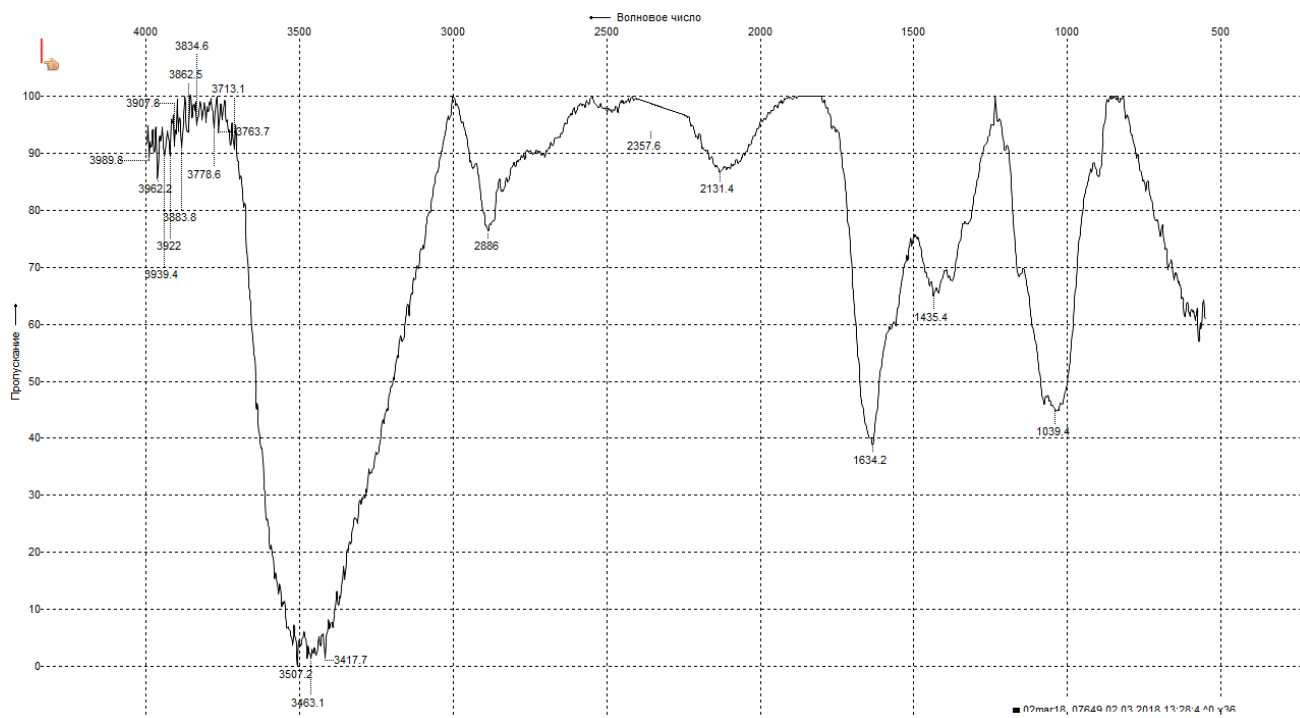
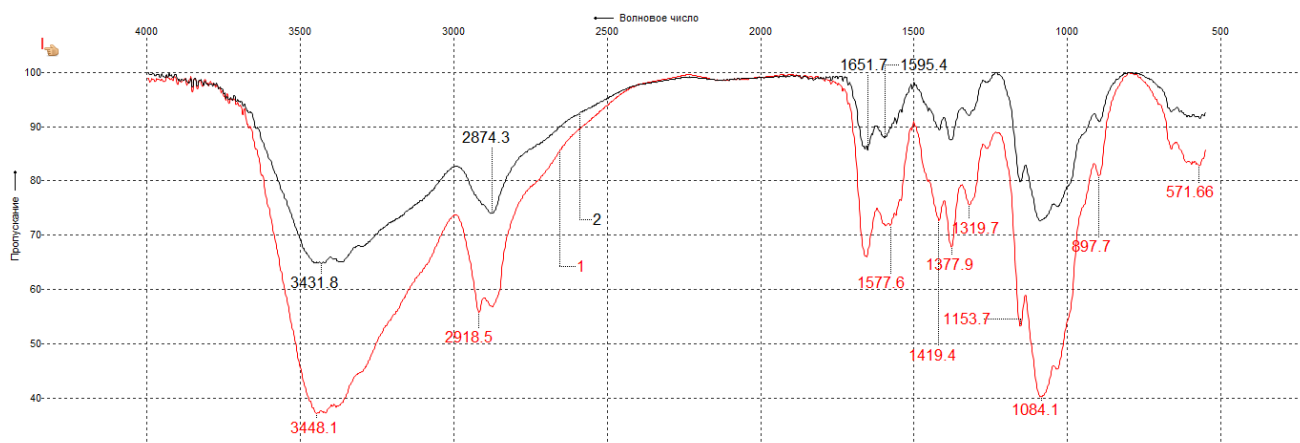
Таблица В.3 – Калькуляция себестоимости плодовых тел грибов на единицу продукции и годовой выпуск

Статьи расхода	Затраты на единицу продукции, руб.			Стоимость годового выпуска, руб.		
	1	2	3	1	2	3
Сырье и материалы	12,3	7,8	5,7	19046	45509	55554
Электроэнергия на технологические нужды	13,5	5,2	3,1	30173	30173	30173
Водоснабжение и водоотведение на технологические нужды	9,4	3,7	3,0	14515	21800	29100
Заработная плата сотрудников	438,0	116,4	69,4	676200	676200	676200
Отчисления на социальные нужды ОПР	131,0	34,9	20,8	202900	202900	202900
Расходы на содержание и эксплуатацию оборудования	132,6	35,2	21,0	204700	204700	204700
Цеховые расходы	25,3	6,7	4,0	39100	39100	39100
Общезаводские расходы	42,9	11,4	6,8	66200	66200	66200
Итого:				1252834	1286582	1303927
С учетом продажи попутной продукции	805,0	221,0	134,0			
Примечание: 1 – <i>A. mellea</i> D-13; 2 – <i>L. edodes</i> F-1000; 3 – <i>G. frondosa</i> 2639						

ПРИЛОЖЕНИЕ Г

ИК-спектры хитозан-глюкановых комплексов

(обязательное)

Рисунок Г.1 – ИК-спектр ХТГК, выделенного из плодовых тел *A. mellea* D-13Рисунок Г.2 – ИК-спектры ХТГК, выделенных из плодовых тел *L. edodes* F-1000 и *G. frondosa* 2639