

ИССЛЕДОВАНИЕ ГЛУБИННОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ГРИБОВ РОДА МАСЛЕНОК (*SUILLUS*) С ЦЕЛЬЮ ПОЛУЧЕНИЯ БЕЛКОВЫХ ПИЩЕВЫХ ДОБАВОК

Д.В. Минаков, Ю.В. Мороженко, М.В. Обрезкова, Н.А. Шавыркина, Е.Ю. Егорова

*Проблема дефицита белка остается в настоящее время одной из наиболее сложных. Сегодня на планете более полумиллиарда человек не имеют возможности полноценного питания, и, в первую очередь, ощущается нехватка продуктов, являющихся источником белка. Одними из перспективных источников значительного количества белка являются высшие базидиальные грибы рода *Suillus*: *S. luteus* (масленок обыкновенный) и *S. bovinus* (козляк), сочетающие в себе высокую пищевую и биологическую ценность при отсутствии токсичности. Цель исследования – глубинное культивирование биомассы мицелия микоризных грибов рода масленок (*Suillus*), как перспективный метод получения белковых пищевых компонентов. Определены оптимальные режимы, влияющие на рост и развитие мицелия грибов *S. luteus* и *S. bovinus* в биореакторе в условиях периодического культивирования. Максимальный выход биомассы мицелия *S. luteus* составил 14,0 г/л, *S. bovinus* – 12,0 г/л, через 16 и 14 суток культивирования соответственно, при соблюдении следующих параметров: температура $26,0 \pm 1,0$ °C; интенсивность перемешивания 250 об/мин; скорость аэрации 1,1 л/л/мин; pH среды 5,9. Исследование биохимического состава грибов рода масленок показало, что их мицелий содержит значительное количество белковых веществ – 21,2 % для *S. luteus* и 21,0 % для *S. bovinus*. По жиродерживающей (158–165 %) и жирозмульгирующей (63–65 %) способности, а также стойкости приготовленных эмульсий (46–49 %), полученные образцы мицелия грибов имеют значения, сопоставимые с технологическими свойствами яичного порошка.*

*Ключевые слова: грибы, мицелий, культивирование, ферментер, *Suillus luteus*, *Suillus bovinus*, пищевой белок, технологические свойства.*

ВВЕДЕНИЕ

Проблема дефицита белка остается в настоящее время одной из наиболее острых и сложных. Сегодня на планете более полумиллиарда человек не имеет полноценного, сбалансированного питания, и, в первую очередь, ощущается нехватка продуктов, являющихся источником белка.

По данным FAO, дефицит пищевого белка к 2025 г. ожидается на уровне 18–20 млн. т/год, а общая потребность в пищевом и кормовом белке может составить 450 млн. тонн в год [1]. Наряду с этим, непрерывное увеличение численности народонаселения сопровождается дальнейшим обострением продовольственной проблемы, особенно в развивающихся странах экваториального и тропического поясов. Так, по данным Всемирной организации здравоохранения, в этих регионах голодает каждый третий человек.

Анализ структуры питания населения Российской Федерации также свидетельствует о недостатке пищевого белка. Согласно исследованиям Института питания РАМН, ежегодный дефицит пищевого белка у граждан России превышает 1 млн. т. [2].

Таким образом, поиск новых ресурсов продовольственного белка и улучшение его качества является актуальной задачей.

Для успешного решения проблемы дефицита пищевого белка важно своевременно учесть и оценить возможность использования новых источников белка, в т. ч. и тех, которыми ранее пренебрегали. В последние годы существенно возрос интерес к высшим грибам, культивируемым на растительных субстратах, как продуцентам протеина [3]. По сравнению с дрожжами, бактериями и микроскопическими грибами, белки высших грибов отличаются более сбалансированным составом аминокислот и лучшей усваиваемостью нашим организмом [4].

Одними из перспективных источников значительного количества белка являются микоризообразователи, высшие базидиальные грибы рода *Suillus*: *S. luteus* (масленок обыкновенный) и *S. bovinus* (козляк), сочетающие в себе высокую пищевую и биологическую ценность при отсутствии токсичности [5]. Исследований по наработке биомассы мицелия данных видов грибов в мире не проводилось. Соответственно, и технологических решений их производства не существует. В тоже время, их потенциал в получении но-

ИССЛЕДОВАНИЕ ГЛУБИННОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ГРИБОВ РОДА МАСЛЕНОК (SUILLUS) С ЦЕЛЬЮ ПОЛУЧЕНИЯ БЕЛКОВЫХ ПИЩЕВЫХ ДОБАВОК

вых пищевых добавок и восполнении дефицита белкового питания неоспорим.

Целью работы является исследование условий глубинного культивирования биомассы мицелия грибов рода масленок (*Suillus*), как перспективного метода получения пищевых белковых компонентов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проводили в соответствии со схемой, приведенной на рисунке 1.

В качестве объектов исследования использовали штаммы микоризных грибов масленка обыкновенного (*S. luteus* D-18) и козляка (*S. bovinus* M-18), выделенные в естественных местообитаниях лесной зоны Алтайского края. Выбор грибов данных видов обусловлен высоким содержанием белка в дикорастущих плодовых телах [5]. Идентификацию *S. luteus* и *S. bovinus* осуществляли по определителю грибов и подтверждали исследованием микроморфологии мицелия [6]. Чистые культуры грибов получали из тканей плодовых тел свежесобранных грибов по методике, описанной А.С. Бухало [7].

Выращивание штаммов грибов осуществляли методом поверхностного культивирования в колбах Эрленмейера на суслотагаровой среде (СА). Хранили культуры при температуре 4 ± 1 °С.

Получение посевного материала мицелия осуществляли методом глубинного культивирования с использованием термостатируемого шейкера (BioSan ES-20). Далее культивирование биомассы мицелия проводили в ферментере (Minipro-Lab 3 л, производство BioTechno Group, Россия), на питательной

среде следующего состава (г/л): свекловичная меласса – 40,0; NH_4NO_3 – 3,0; K_2HPO_4 – 1,2.

В процессе культивирования мицелия в ферментере контролировали следующие параметры: температура (°С), скорость вращения механической мешалки (об/мин), интенсивность аэрации (л/л/мин) и активная кислотность среды (рН).

Контроль скорости роста мицелия осуществляли по интенсивности потребления редуцирующих сахаров питательной среды. При снижении концентрации редуцирующих веществ в культуральной среде до 0,4 % эксперимент по накоплению биомассы прекращали.

Микробиологический контроль технологических стадий (контаминация посторонней микрофлорой) осуществляли с помощью отраслевых методик [8].

Для количественного определения общего азота в биообъектах использовали метод Кьельдаля. Содержание общего белка ($\text{N} \times 6,25$; $\text{N} \times 4,38$) рассчитывали на основании полученных данных о концентрации азота [9, 10].

Определение жиродерживающей (ЖУС) и жироземмульгирующей (ЖЭС) способности проводили по методикам [11]. Определение стойкости эмульсии (СЭ) осуществляли в соответствии с ГОСТ Р 53595–2009 на лабораторной центрифуге (Liston С 2202, Россия).

Исследования выполнялись в четырехкратной повторности. В качестве программы для статистической обработки экспериментальных данных использовали Excel Microsoft Office.

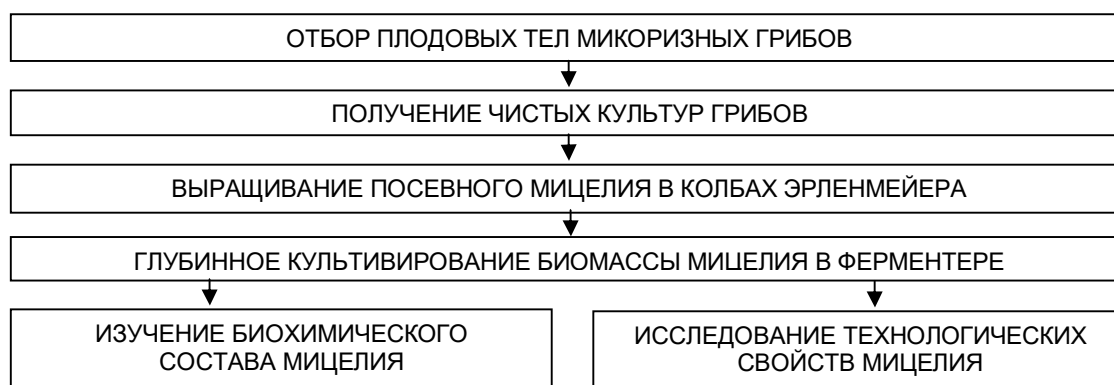


Рисунок 1 – Схема исследований

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В связи с особенностями выращивания базидиомицетов проведена серия экспериментов в условиях глубинного культивирования в биореакторе с перемешиванием и

аэрацией. В результате проведенных исследований установлено, что процесс культивирования мицелия *S. luteus* и *S. bovinus* в ферментере существенно зависит от ряда факторов (рисунок 2).

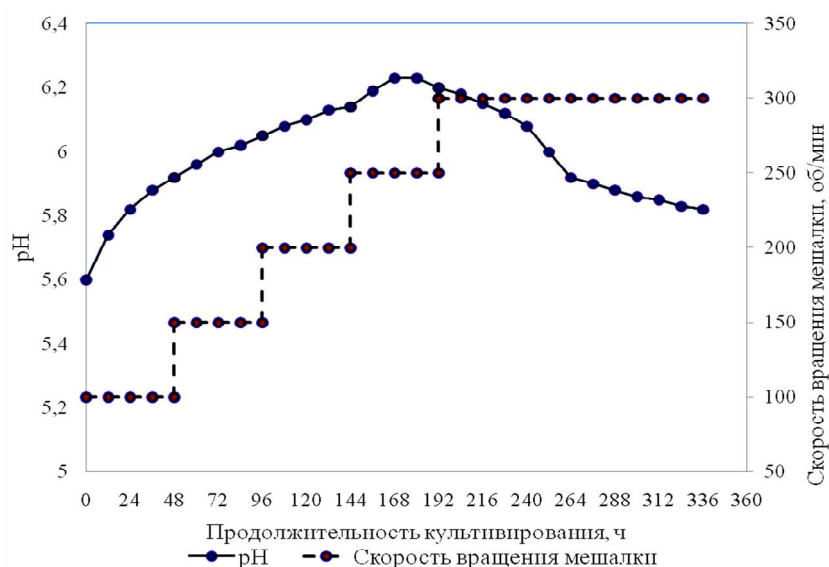


Рисунок 2 – Влияние технологических режимов процесса глубинного культивирования на накопление биомассы мицелия грибов в ферментере (температура 26 ± 1 °С, интенсивность аэрации 1,1 л/л/мин)

При культивировании мицелия в ферментере при pH 5,6–6,2 подобраны оптимальные значения скорости механического перемешивания со ступенчатым увеличением от 100 до 300 об/мин, при которых не возникает повреждения гифов мицелия, отрицательно сказывающихся на скорости роста и накопления биомассы.

В процессе исследования по определению оптимальных параметров механического перемешивания установлено, что при низких значениях скорости вращения мешалки (менее 100 об/мин) возникает уплотнение культуральной среды, зарастание агломератами лопастей мешалки и внутренних стенок биореактора. При этом из-за слабой аэрации глубинной культуры происходит снижение скорости роста мицелия.

Механическое перемешивание культуральной среды при скорости вращения мешалки более 350 об/мин за счет действия воздушных пузырьков аэратора приводит к нарушению контакта мицелия с культуральной средой. При этом наблюдается повреждение агломератов мицелия и снижение скорости их роста.

Анализ зависимости скорости роста мицелия от интенсивности аэрации показал, что для обеспечения благоприятного формирования пеллет (плотные шарообразные образования мицелия) и высокого выхода биомассы необходимо соблюдение следующих условий: температура 26,0 °С, скорость подачи воздуха в культуральную среду – 1,1 л/л/мин. При поддержании указанной в культуральной

среде температуры понижение или повышение интенсивности аэрации сопровождалось уменьшением скорости роста мицелия и последующим снижением выхода биомассы.

Одним из основных факторов, определяющих биосинтетический потенциал роста и развития мицелия, является активная кислотность среды (pH), которая существенно влияет на морфологию и структуру клеток, поглощение питательных веществ, функционирование клеточных мембран, растворимость солей, активность ферментов и биосинтез целевого продукта [8].

Повышение pH среды до 5,0 приводит к ухудшению питающих свойств культуральной среды и, как следствие, к резкому уменьшению скорости роста мицелия у исследуемых штаммов грибов.

Для поддержания pH среды на уровне 5,6–6,2 в процессе культивирования мицелия в ферментере использовали 6 %-ую гидроокись натрия для нейтрализации. Развивающееся при этом пенообразование в ферментере регулировали с использованием пеногасителя пропинол Б-400, из расчета 0,15 мл на 1,0 л культуральной среды.

Таким образом, в результате проведенных исследований определены оптимальные режимы глубинного культивирования, оказывающие влияние на рост и развитие мицелия микоризных грибов *S. luteus* и *S. bovinus*.

Максимальный выход биомассы сухого мицелия *S. luteus* составил 14,0 г/л, *S. Bovinus* – 12,0 г/л, через 16 и 14 суток культивирования соответственно, при соблюдении

ИССЛЕДОВАНИЕ ГЛУБИННОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ГРИБОВ РОДА МАСЛЕНОК (*SUILLUS*) С ЦЕЛЬЮ ПОЛУЧЕНИЯ БЕЛКОВЫХ ПИЩЕВЫХ ДОБАВОК

следующих параметров: температура $26,0 \pm 1,0$ °С; интенсивность перемешивания 250 об/мин; скорость аэрации 1,1 л/л/мин; рН среды 5,9. При указанных технологических режимах не происходило зарастания механической мешалки и внутренних стенок сосуда мицелием.

Анализ морфологии мицелия исследуемых штаммов показал, что он разрастается в форме гранул (пеллет) серого цвета со средним диаметром от 1,0 до 3,0 мм; толщина гиф составила от 2,0 до 5,0 мкм.

По сравнению с культивированием мицелия в колбах Эрленмейера, реализация процесса наращивания биомассы грибов в ферментере позволяет сократить время культивирования в 1,25 раза и увеличить выход биомассы в 1,5 раза. Полученные результаты будут положены в основу валидации и масштабирования разработанного технологического процесса производства мицелия *S. luteus* и *S. bovinus*.

Первичные исследования мицелия грибов показали, что он содержит значительное количество белка ($21,2 \pm 0,5$ % для *S. luteus* и $21,0 \pm 0,5$ % для *S. bovinus*), биологическая

ценность которого, будет проанализирована в дальнейших исследованиях.

Результаты оценки органолептических свойств и содержание белка в мицелии грибов, подсушенном до влажности 10–12 %, приведены в таблице 1.

Данные таблицы свидетельствуют о том, что биомасса мицелия, в целом, соответствует требованиям к сырью продовольственного назначения и может быть использована для обогащения белком пищевых продуктов.

Вместе с тем, введение в рецептуры пищевых продуктов сырья с малоизученными технологическими характеристиками может привести к неприемлемому изменению реологических свойств пищевых масс. В этой связи следующим этапом исследований стало изучение функционально-технологических свойств образцов мицелия.

Технологические свойства исследовали по показателям ЖУС, ЖЭС и СЭ (таблица 2) путем приготовления эмульсий из рафинированного подсолнечного масла с порошком мицелия. В качестве элемента сравнения технологических свойств использовали эмульсию яичного порошка в рафинированном подсолнечном масле.

Таблица 1 – Органолептическая характеристика и содержание белковых веществ в мицелии грибов

Показатель	Характеристика / Образец	
	<i>S. luteus</i>	<i>S. bovinus</i>
Внешний вид	тонкодисперсный порошок	тонкодисперсный порошок
Цвет	насыщенный серый	бледно-желтый
Запах	слабый грибной, цветочный	слабый грибной, морковный
Белок (N × 6,25), %	$21,2 \pm 0,5$	$21,0 \pm 0,5$
Белок (N × 4,38), %	$14,8 \pm 0,5$	$14,7 \pm 0,5$
*Белок (N × 6,25), %	15,0–24,0	19,0–23,0
Примечание: N × 6,25 – литературные данные [5]		

Таблица 2 – Технологические свойства мицелия грибов

Образцы	Функциональные свойства порошков		
	ЖУС, %	ЖЭС, %	СЭ, %
Биомасса мицелия <i>S. luteus</i>	165	65	46
Биомасса мицелия <i>S. bovinus</i>	158	63	49
*Яичный порошок	185	54	56
*Объект сравнения технологических свойств			

По функционально-технологическим свойствам (ЖУС 158–165 %, ЖЭС 63–65 % и СЭ 46–49 %), сопоставимым с характеристиками яичного порошка, биомасса мицелия грибов *S. luteus* и *S. bovinus* может использоваться в составе рецептур продуктов эмульсионной природы в качестве эмульгатора, аналогично специализированным пищевым добавкам [12].

ВЫВОДЫ

Таким образом, по результатам исследований глубинного культивирования мицелия микоризных грибов *S. luteus* и *S. bovinus* в биореакторе в условиях периодического культивирования установлены оптимальные факторы, влияющие на их рост и развитие. Максимальный выход биомассы мицелия *S. luteus* составил 14,0 г/л,

S. bovinus – 12,0 г/л, через 16 и 14 суток культивирования соответственно, при соблюдении следующих параметров: температура 26,0±1,0 °С; интенсивность перемешивания 250 об/мин; скорость аэрации 1,1 л/л/мин; рН среды 5,9.

Исследование биохимического состава полученного мицелия показало, что он содержит значительное количество белковых веществ – 21,2±0,5 % для *S. luteus* и 21,0±0,5 % для *S. bovinus*.

По жиродерживающей (158–165 %) и жироземмулирующей (63–65 %) способности, а также стойкости эмульсии (46–49 %), характеристики полученных образцов мицелия грибов сопоставимы с технологическими свойствами яичного порошка.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и Министерства образования и науки Алтайского края в рамках научного проекта № 19-48-220008.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. OECD-FAO Agricultural outlook 2017–2026. – Paris : OECD Publishing, 2017. – 144 p., doi.org/10.1787/19991142.
2. Нутрициология-2040. Горизонты науки глазами ученых / Под редакцией В.В. Бессонова, В.Н. Княгинина, М.С. Липецкой. – СПб. : Фонд «Центр стратегических разработок «Северо-Запад», 2017. – 105 с.
3. Harris, H.C. Short Chain fatty acid production from mycoprotein and mycoprotein fibre in an in vitro fermentation model / H.C. Harris, C.A. Edwards, D.J. Morrison // *Nutrients*. – 2019. – V. 11. – № 800. – P. 1–7, doi: 10.3390/nu11040800.
4. Ugbogu, E.A. A review of microbial protein production: prospects and challenges / E.A. Ugbogu, O.C. Ugbogu // *FUW Trends in Science and Technology Journal*. – 2016. – V. 1. – № 1. – P. 182–185.
5. Вишневский, М.В. Лекарственные грибы. Большая энциклопедия / М.В. Вишневский. – М. : Эксмо, 2014. – 401 с.
6. Переведенцева, Л.Г. Определитель грибов (агарикоидные базидиомицеты) : учебное пособие. / Л.Г. Переведенцева. – М. : Товарищество научных изданий КМК, 2015. – 119 с.
7. Бухало, А.С. Высшие съедобные базидиомицеты в чистой культуре / А.С. Бухало. – Киев : Наукова думка, 1988. – 144 с.
8. Сартакова, О.Ю. Промышленная микробиология: учебное пособие / О.Ю. Сартакова. – Барнаул : Изд-во АлтГТУ, 2009. – 173 с.
9. Минаков, Д.В. 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 хи-*

мия и биотехнология. – 2016. – Т. 6. – № 3. – С. 50–56, DOI: 10.21285/2227-2925-2016-6-3-50-56.

10. Шепель, О.Л. Анализ биохимического состава и технологических свойств семян сортов сои селекции ФГБНУ «ДВ НИИСХ» с целью получения продуктов функционального назначения / О.Л. Шепель, Е.С. Стаценко // *Вестник КрасГАУ*. – 2019. – № 4 (145). – С. 172–177.

11. Щербаков, В.Г. Лабораторный практикум по биохимии и товароведению масличного сырья / В.Г. Щербаков, С.Б. Иваницкий, В.Г. Лобанов. – М. : Колос, 1999. – 128 с.

12. Билялова, А.С. Получение соуса «Майонез» с использованием грибной пищевой добавки «Летисульфурин» / А.С. Билялова, Л.И. Войно, Д.Г. Шипарева // *Естественные и технические науки*. – 2013. – № 5. – С. 333–334.

Минаков Денис Викторович, к.б.н., ст. преподаватель кафедры биотехнологии Бийского технологического института (филиала) ФГБОУ ВО «Алтайский государственный технический университет им. И.И. Ползунова», 659305, г. Бийск, ул. Трофимова, 27, тел.: (3854) 43-53-05, e-mail: MinakovD-1990@yandex.ru.

Мороженко Юрий Васильевич, к.х.н., доцент, доцент кафедры биотехнологии Бийского технологического института (филиала) ФГБОУ ВО «Алтайский государственный технический университет им. И.И. Ползунова», 659305, г. Бийск, ул. Трофимова, 27, тел.: (3854) 43-53-05, e-mail: uv@bti.secna.ru.

Обрезкова Марина Викторовна, к.т.н., доцент, доцент кафедры биотехнологии Бийского технологического института (филиала) ФГБОУ ВО «Алтайский государственный технический университет им. И.И. Ползунова», 659305, г. Бийск, ул. Трофимова, 27, тел.: (3854) 43-53-05, e-mail: obrezkova1962@mail.ru.

Шавыркина Надежда Александровна, к.т.н., доцент, доцент кафедры биотехнологии Бийского технологического института (филиала) ФГБОУ ВО «Алтайский государственный технический университет им. И.И. Ползунова», 659305, г. Бийск, ул. Трофимова, 27, тел.: (3854) 43-53-05, e-mail: 32nadina@mail.ru.

Егорова Елена Юрьевна, д.т.н., доцент, заведующая кафедрой технологии хранения и переработки зерна ФГБОУ ВО «Алтайский государственный технический университет им. И.И. Ползунова», 656038, г. Барнаул, пр. Ленина, д. 46, тел.: (3852) 29-07-55, e-mail: egorovaeyu@mail.ru.