

ОПТИМИЗАЦИЯ СОСТАВА ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД ДЛЯ ГЛУБИННОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ МИКОРИЗНЫХ ГРИБОВ МЕТОДОМ МАТЕМАТИЧЕСКОГО ПЛАНИРОВАНИЯ

Д.В. Минаков, Ю.В. Мороженко

ФГБОУ ВО Бийский технологический институт (филиал) «Алтайский государственный технический университет им. И.И. Ползунова», г. Бийск
MinakovD-1990@yandex.ru

Введение

Бурное развитие промышленной биотехнологии предопределило перспективы в области культивирования грибов. К настоящему времени разработаны методы, позволяющие выращивать некоторые виды базидиальных грибов в глубинной культуре на жидкой среде. Тем не менее, видовой состав грибов, поддающихся культивированию с высокими показателями роста, крайне ограничен.

Целью исследования является оптимизация состава питательных сред для глубинного культивирования высших грибов *S. luteus* и *S. bovinus* методом математического планирования.

Материалы и методы исследований

Для получения чистых культур грибов *S. luteus* и *S. bovinus* в качестве исходного материала использовали свежесобранные плодовые тела. Выбор грибов данных видов обусловлен образованием микоризы с хвойными породами деревьев. Идентификацию грибов проводили с использованием ряда определителей (Т. Лессо, 2003; Л.Г. Переведенцева, 2015) и подтверждали исследованием микроморфологии мицелия [1, 2].

Сбор плодовых тел грибов осуществляли в хвойном лесу Троицкого района Алтайского края. Выделение чистых культур проводили тканевым методом. С помощью стерильных медицинских ножниц вырезали кусочек мякоти из толщи плодового тела, помещали в чашки Петри с сусло-агаровой средой и культивировали в термостате при температуре 22 °С. В течение 7–28 суток (в зависимости от вида гриба) наблюдали рост мицелия, который отсеивали в чашки Петри для повышения его ростовой активности и очистки от сопутствующей микрофлоры. Хранили культуры при температуре 4±1 °С.

Отбор наиболее продуктивных штаммов грибов проводили в результате расчета показателей скорости роста (СР) и ростового коэффициента (РК) [3, 4].

Видовую принадлежность определяли по морфологическим характеристикам плодовых тел (собранных в естественных местах произрастания), по их спорам и культурально-морфологическим признакам выращенного мицелия (характер роста, тип колонии, цвет мицелия, структура и текстура колонии, изменение окраски среды, наличие экссудата на поверхности мицелия). Результаты исследований сопоставляли с определителями грибов [1, 2].

Рост мицелия изучали при различных значениях температуры (от 15 до 30 °С с интервалом в 2 °С) и рН-среды (от 3,5 до 7,5 с интервалом 0,5 единицы), определяя оптимальные значения для каждого штамма.

Получение посевного материала мицелия осуществляли методом глубинного культивирования с использованием термостатируемого шейкера (BioSan ES-20, Латвия). Культивирование биомассы мицелия проводили в колбах Эрленмейера (V=250 мл) на питательной среде следующего состава (г/л): свекловичная меласса (ГОСТ 30561–2013) – 20,0; NH₄NO₃ – 3,0; KH₂PO₄ – 1,2, MgSO₄×7H₂O – 0,5.

Контроль скорости роста мицелия грибов осуществляли по интенсивности потребления редуцирующих веществ (РВ) питательной среды, которые определяли методом Бертрана [5].

Оптимизацию состава жидких питательных сред проводили с использованием математических методов полного факторного эксперимента [6]. Факторами, влияющими на выход биомассы мицелия грибов *S. luteus* и *S. bovinus* являлись компоненты питательной среды (таблица 1).

Таблица 1 – Значения факторов в натуральных переменных, единицы варьирования и концентрация основных компонентов питательных сред

Компонент среды	Фактор	Основной уровень (0), %	Нижний уровень (-1), %	Верхний уровень (+1), %	Единица варьирования, %
Свекловичная меласса	X ₁	4,0	3,0	5,0	1,0
NH ₄ NO ₃	X ₂	1,0	0,5	1,5	0,5
KH ₂ PO ₄	X ₃	0,3	0,2	0,4	0,1
MgSO ₄ ×7H ₂ O	X ₄	0,1	0,05	0,15	0,05

Для наработки биомассы исследуемых грибов были составлены 17 образцов питательных сред (таблица 2). Эксперименты проводились в трехкратной повторности.

Таблица 2 – Полный факторный эксперимент для четырех факторов

№ опыта	Фактор в безразмерной величине			
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄
1	+1	+1	+1	+1
2	-1	+1	+1	+1
3	+1	-1	+1	+1
4	+1	+1	-1	+1
5	+1	+1	+1	-1
6	-1	-1	+1	+1
7	-1	+1	-1	+1
8	-1	+1	+1	-1
9	+1	-1	-1	+1
10	+1	-1	+1	-1
11	+1	+1	-1	-1
12	+1	-1	-1	-1
13	-1	+1	-1	-1
14	-1	-1	+1	-1
15	-1	-1	-1	+1
16	-1	-1	-1	-1
17	0	0	0	0

Микробиологический контроль технологических стадий (контаминация посторонней микрофлорой) осуществляли с помощью отраслевых методик [7].

Определение влажности мицелия производили на анализаторе влажности (ОНАУС МВ-25, США).

Результаты исследований и их обсуждение

При глубинном культивировании грибов для оптимизации состава питательных сред все чаще используют методы математического планирования. Они позволяют одновременно оценить степень влияния нескольких факторов на рост и развитие грибов [8].

Определение благоприятного состава питательной среды для роста грибов *S. luteus* и *S. Bovines* проводили с использованием математического метода полного факторного эксперимента [6].

Факторами, влияющими на выход биомассы исследуемых грибов, являлись компоненты питательной среды: свекловичная меласса (X_1), нитрат аммония (NH_4NO_3) (X_2), дигидрофосфат калия (KH_2PO_4) (X_3) и магний сернокислый семиводный ($\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$) (X_4) (таблица 3).

Таблица 3 – Матрица полного факторного эксперимента

№ опыта	Фактор в % от объема среды				Выход биомассы <i>S. luteus</i> , г/л	Выход биомассы <i>S. bovinus</i> , г/л
	X_1	X_2	X_3	X_4		
1	5,0	1,5	0,4	0,15	17,2	17,1
2	3,0	1,5	0,4	0,15	14,5	17,0
3	5,0	0,5	0,4	0,15	17,3	16,9
4	5,0	1,5	0,2	0,15	18,3	17,1
5	5,0	1,5	0,4	0,05	19,4	19,1
6	3,0	0,5	0,4	0,15	11,5	11,2
7	3,0	1,5	0,2	0,15	13,3	13,0
8	3,0	1,5	0,4	0,05	13,9	13,0
9	5,0	0,5	0,2	0,15	16,2	15,8
10	5,0	0,5	0,4	0,05	16,4	14,8
11	5,0	1,5	0,2	0,05	18,4	16,3
12	5,0	0,5	0,2	0,05	15,4	14,4
13	3,0	1,5	0,2	0,05	12,6	12,4
14	3,0	0,5	0,4	0,05	11,5	10,2
15	3,0	0,5	0,2	0,15	10,4	10,4
16	3,0	0,5	0,2	0,05	10,7	9,9
17	4,0	1,0	0,3	0,1	17,7	17,1

На основании матрицы были составлены 17 образцов питательных сред для оптимизации, которые далее использовали для культивирования грибов *S. luteus* и *S. bovinus*.

Полином первой степени при планировании полного факторного эксперимента имел вид $Y=b_0+b_1X_1+b_2X_2+b_3X_3+b_4X_4$, то есть $Y=14,98+2,37X_1+1,07X_2+0,37X_3+0,01X_4$.

Эффекты взаимодействия определяли аналогично линейным эффектам: коэффициенты парного взаимодействия равны соответственно: $b_{12}=-0,14$; $b_{13}=-0,31$; $b_{14}=-0,10$; $b_{23}=-0,11$; $b_{34}=-0,10$; $b_{24}=-0,14$; $b_{123}=-0,12$; $b_{234}=-0,14$; $b_{124}=-0,33$; $b_{1234}=-0,11$.

Полученное уравнение регрессии имело следующий вид: $Y=14,98+2,37X_1+1,07X_2+0,37X_3+0,01X_4-0,14X_1X_2-0,31X_1X_3-0,1X_1X_4-0,11X_2X_3-0,10X_3X_4-0,14X_2X_4-0,16X_1X_2X_3-0,12X_1X_3X_4-0,14X_2X_3X_4-0,33X_1X_2X_4-0,11X_1X_2X_3X_4$.

Проверку адекватности полученной модели проводили с использованием F-критерия Фишера. Вычисленное значение F было меньше табличного, что доказывает адекватность найденной модели. Полученные данные свидетельствуют о том, что следует признать значимыми коэффициенты b_1 , b_2 , b_3 , b_{12} , b_{13} , b_{24} , b_{123} , b_{234} и b_{124} и включить их в модель, а коэффициенты b_4 , b_{14} , b_{23} , b_{34} , b_{134} и b_{1234} незначимы и их следует отбросить, не включая в искомую модель. На основании полученных данных математическая модель (уравнение регрессии), содержащая только значимые коэффициенты, выглядит следующим образом: $Y=14,98+2,37X_1+1,07X_2+0,37X_3-0,14X_1X_2-0,31X_1X_3-0,14X_2X_4-0,16X_1X_2X_3-0,14X_2X_3X_4-0,33X_1X_2X_4$.

Полное уравнение регрессии для исследуемых штаммов грибов имело следующий вид:

$$Y=14,5+2,37X_1+2,02X_2+1,26X_3+0,49X_4-0,35X_1X_2-0,29X_1X_3-0,23X_1X_4-0,29X_2X_3-0,10X_3X_4-0,09X_2X_4-0,13X_1X_2X_3-0,36X_1X_3X_4-0,03X_2X_3X_4-0,46X_1X_2X_4-0,37X_1X_2X_3X_4$$

Однако, с учетом незначимых коэффициентов парного взаимодействия полученное уравнение регрессии выглядит следующим образом:

$$Y=14,5+2,37X_1+2,02X_2+1,26X_3+0,49X_4-0,35X_1X_2-0,29X_1X_3-0,23X_1X_4-0,29X_2X_3-0,36X_1X_3X_4-0,03X_2X_3X_4-0,46X_1X_2X_4-0,37X_1X_2X_3X_4.$$

Таким образом, на выход биомассы мицелия грибов влияют все компоненты, входящие в питательную среду.

Основными физиологическими показателями, характеризующим кинетические свойства культуры являются удельная скорость роста, продуктивность по биомассе, удельная скорость потребления субстрата и выход биомассы из субстрата (таблица 4).

Таблица 4 – Основные показатели процесса ферментации

Показатель	Символ и ед. измерения	Расчетная формула	Значение	
			<i>S. luteus</i>	<i>S. bovinus</i>
Удельная скорость роста	$\mu, ч^{-1}$	$\mu = \frac{X_1 - X_0}{X_1(t_1 - t_0)}$	0,085	0,082
Продуктивность по биомассе	$Q_x, г/(л \times ч)$	$Q_x = \frac{X_1 - X_0}{t_1 - t_0}$	0,47	0,45
Удельная скорость потребления субстрата	$q_s, г/(л \times ч)$	$q_s = \frac{S_0 - S_1}{X_1(t_1 - t_0)}$	0,03	0,03
Выход биомассы из субстрата	$Y_{x/s}, г/г$	$Y_{x/s} = \frac{\mu}{q_s} = \frac{X_1 - X_0}{S_0 - S_1}$	17,1	16,9

Процесс глубинного культивирования мицелия грибов состоит из нескольких фаз роста [9]:

- лаг-фаза (адаптация клеток к окружающей среде, активация ферментов);
- фаза ускорения (возрастание количества нуклеиновых кислот, необходимых для биосинтеза белков);
- экспоненциальная фаза (размножение клеток с максимальной скоростью роста);
- фаза замедления (снижение скорости роста мицелия, за счет уменьшения концентрации питательных веществ в среде);
- стационарная фаза (возрастание негативного влияния лимитирующих факторов);
- фаза отмирания (количество отмерших клеток превышает прирост) (рисунок 1).

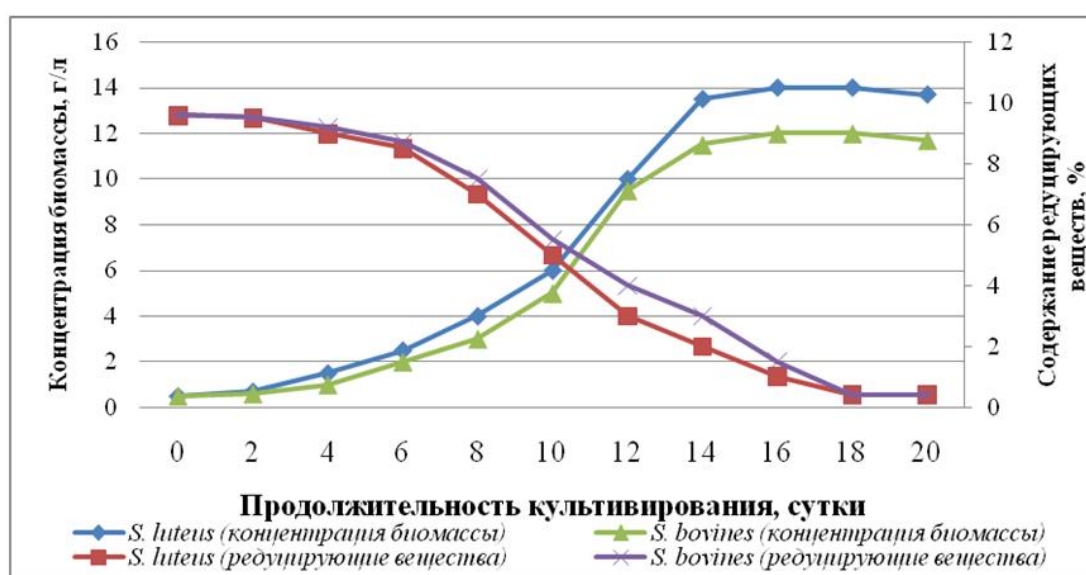


Рисунок 1 – Динамика роста мицелия грибов *S. luteus* и *S. bovinus* и потребление редуцирующих веществ в процессе глубинного культивирования в ферментере

В результате проведенных расчетов с использованием каждой фазы развития удельная скорость роста для грибов *S. bovinus* и *S. luteus* составила 0,082–0,085 ч⁻¹, продуктивность по биомассе 0,45–0,47 г/(л×ч), удельная скорость потребления субстрата 0,03 г/(л×ч) и выход биомассы из субстрата 16,9–17,1 г/г, соответственно.

Заключение

Проведена оптимизация состава питательных сред для глубинного культивирования микоризных грибов *S. luteus* и *S. bovinus*. Оптимальный состав питательной среды включал следующие компоненты (%): свекловичная меласса (ГОСТ 30561–2013) – 5,0; NH₄NO₃ – 1,5; KH₂PO₄ – 0,4, MgSO₄×7H₂O – 0,05.

Примененный метод математического планирования среды обеспечил повышение выхода биомассы мицелия грибов в сравнении с неоптимизированной средой и составил 19,1 и 19,4 г/л для *S. bovinus* и *S. luteus*, соответственно.

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

Литература

1. Лессо, Т. Грибы. Определитель [Текст] / Т. Лессо. – М: Астрель, 2003. – 304 с.
2. Переведенцева, Л.Г. Определитель грибов (агарикоидные базидиомицеты): учебное пособие [Текст] / Л.Г. Переведенцева. – М.: Товарищество научных изданий КМК, 2015. – 119 с.
3. Никитина В.Е., Озерова Р.А., Цивилева О.М. Особенности роста мицелия *Lentinus edodes* на различных средах [Текст] // Бюллетень Ботанического сада Саратовского государственного университета. – 2003. – № 2. – С. 176-179.
4. Трухоновец, В.В. Морфолого-культуральная характеристика и рост съедобных и лекарственных базидиальных грибов в культуре [Текст] // Проблемы лесной фитопатологии и микологии. – 2015. – № 1. – С. 218-221.
5. ГОСТ 12575-2001. Сахар. Методы определения редуцирующих веществ.
6. Гайдадин А.Н. Применение полного факторного эксперимента при проведении исследований. Методические указания [Текст] / А.Н. Гайдадин, С.А. Ефремова // ВолгГТУ. – Волгоград, 2008. – 16 с.
7. Сартакова, О.Ю. Промышленная микробиология: Учебное пособие [Текст] / О.Ю. Сартакова. – Барнаул: Изд-во АлтГТУ, 2009. – 173 с.
8. Бирюков В.В. Основы промышленной биотехнологии [Текст] / В.В. Бирюков. – М.: КолосС, 2004. – 296 с.
9. Минаков Д.В., Севодина К.В., Шадринцева А.И., Севодин В.П. Сравнительная оценка некоторых базидиомицетов в поверхностной и глубинной культуре [Текст] // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. – 2016. – Т. 6. № 4 (19). – С. 46-52.