

УДК 582.287 : 58.095

© 1994 г.

Э. Ф. Соломко, Н. Ю. Митропольская

**ПОЛУЧЕНИЕ ПОСЕВНОГО МАТЕРИАЛА *LENTINUS EDODES* (BERK.) SING. ГЛУБИННЫМ МЕТОДОМ**SOLOMKO E. F., MITROPOLSKAJA N. Yu. OBTAINANCE OF SEED MATERIAL OF *LENTINUS EDODES* (BERK.) SING. BY THE DEEP CULTIVATION METHOD

*Lentinus edodes* (Berk.) Sing. (сиитакэ) встречается в естественных условиях на дубе и грабе в Японии на о-ве Хоккайдо, на Тайване, в Китае, на о-ве Борнео, о-вах Папуа Новой Гвинеи и в странах Индокитая (Singer, 1961). Исследования морфологии, жизненных циклов и генетики *L. edodes*, начавшиеся около 30 лет тому назад (Mori et al., 1972), заложили научную основу современных методов селекции и культивирования этого гриба, который в настоящее время по объему промышленного производства занимает второе место после шампиньона.

Исследования роста *L. edodes* на жидких средах направлены на изучение питательных потребностей и физиологии роста этого вида в чистой культуре, разработку технологии глубинного культивирования мицелия с целью получения биомассы кормового и пищевого назначения, препаратов, обладающих онкостатическим действием (Соломко, Дудка, 1985). Глубинное культивирование также предлагается как быстрый и эффективный метод производства посевного материала для грибоводства (Yang, Jong, 1989).

Уже к 1978 г. был разработан метод выращивания плодовых тел сиитакэ в закрытых помещениях на дубовых опилках с различными добавками, а также на рисовой соломе, смоченной экстрактом из соевых бобов (Ito, 1978). Подавляющее большинство публикаций и патентов по технологии производства мицелия способом экстенсивного и интенсивного культивирования плодовых тел сиитакэ принадлежат Японии, на долю которой приходится около 80 % мирового объема производства и экспорта плодовых тел *L. edodes*. Вместе с тем растущая популярность сиитакэ в странах Европы и Америки, которая объясняется хорошими вкусовыми качествами и широко рекламируемыми лечебно-профилактическими свойствами этого гриба — интерферонотической и противоопухолевой активностью (Chichaga et al., 1970; Cochran, 1978; Mori et al., 1989), антисклеротическим и антивирусным действием (Chibata et al., 1969; Kamiya et al., 1972), делает актуальным разработку альтернативных вариантов технологии его выращивания с использованием сырьевой базы и отходов растениеводства, характерных для стран Европы (Фомина, Лысенкова, 1989; Kirchoff, Lelley, 1991).

Задачей настоящего исследования являлась разработка метода получения физиологически активного жидкого посевного материала *L. edodes*.

В настоящей работе использованы следующие штаммы из коллекции культур высших *Basidiomycetes* Отдела микологии Института ботаники им. Н. Г. Холодного АН Украины (Бухало, Митропольская, 1990): ИВК-55, ИВК-57, ИВК-65. Их рост в глубинной культуре был исследован на 10 вариантах жидких сред с различными источниками углерода (глюкоза, крахмал, кукурузная мука) и азота (сульфат аммония, L-аспарагин, кукурузный и дрожжевой экстракты), а также на жидком пивном сусле, отварах ржи и пшеницы.

Глубинное культивирование проводили в 300-миллилитровых колбах Эрленмейера при соотношении жидкой и воздушной фаз 1 : 10 на возвратно-поступательной качалке (180 движ./мин) при  $26 \pm 1$  °С. Гомогенизацию глубинно выращенного мицелия осуществляли в стерильном сосуде гомогенизатора (тип 302, ПНР), проводя измельчение в течение 1.5 мин при 6 тыс. об/мин. Гомогенатом мицелия инокулировали опытные среды, оценивая количество вносимого посевного материала путем фильтрации, промывки и высушивания образца при 105 °С в тарированных стеклянных флаконах. По ходу роста культуры проводили определения концентрации биомассы и рН среды.

В своей работе мы применили общий методический подход, который состоит в том, что на каждом из последовательных этапов выращивания мицелия использовали культуру в наиболее активном физиологическом состоянии. Этот принцип реализовывался путем исследования динамики роста мицелия *L. edodes* сперва на агаризованных средах с разными начальными значениями рН, а потом на жидких питательных средах различного состава, для определения оптимальных условий культивирования на каждом из этапов.

Исследование роста *L. edodes* на сусло-агаровой среде (8° Баллинга), применяемой для хранения культур в коллекции, показало, что штамм ИВК-55 по характеру роста и морфологии колоний отличается от других. Он имеет белый, прижатый, стелющийся мицелий, в то время как штаммы ИВК-57 и ИВК-65 образуют колонии с пушистым воздушным мицелием. Средняя скорость радиального роста колоний штамма ИВК-65 — около 2.5 мм/сут, у двух других — 4.5 мм/сут при оптимальном значении рН среды в диапазоне 4.5—5.0.

Динамика роста *L. edodes* на жидкой синтетической среде Сонг (Song et al., 1987) с глюкозой и L-аспарагином представлена на рис. 1. В процессе роста кислотность среды изменялась не значительно. Лучше других рос штамм ИВК-57, который накапливал около 4.5 г/л а. с. в. на 14-е сут культивирования. При замене источника азота (сульфат аммония вместо L-аспарагина) и использовании фосфатного буфера все исследованные штаммы *L. edodes* росли на модифицированной таким образом синтетической среде гораздо лучше. На 9-е сут культивирования концентрация биомассы составляла 8—9 г/л по абсолютно сухой массе, после чего наступала стационарная фаза.

При культивировании *L. edodes* на жидком пивном сусле (4° Баллинга) концентрация биомассы 6—7 г/л а. с. в. достигалась у штаммов 55 и 57 на 7-е сут культивирования, затем активный рост прекращался. Штамм 65 рос медленнее, но концентрация биомассы возрастала до 10 г/л (рис. 1). На основании анализа динамики роста *L. edodes* на жидком пивном сусле нами установлено, что фактором, ограничивающим скорость накопления биомассы, является рН среды, которое в процессе культивирования снижается до значений 3.0—3.05, ингибирующих рост культур. При начальном количестве посевного материала около 0.8 г/л а. с. в. оптимальный срок



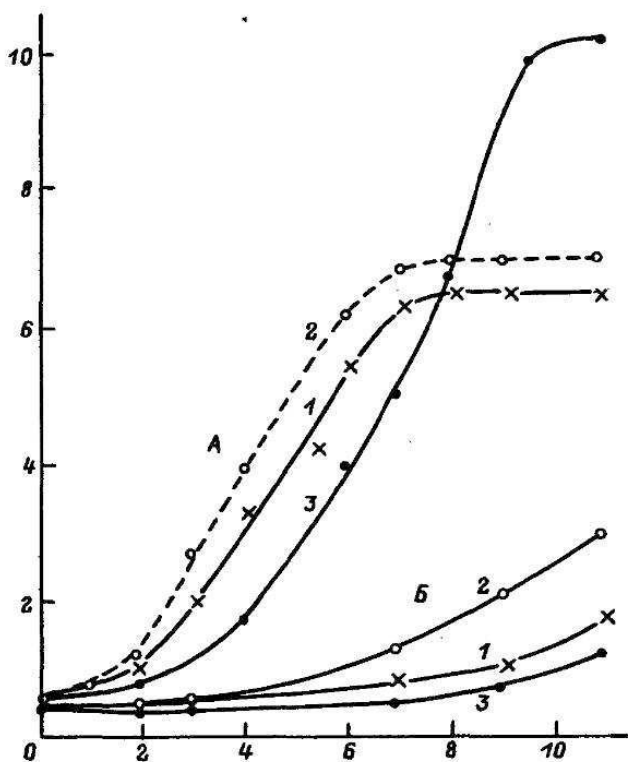


Рис. 1. Динамика накопления биомассы при глубинном культивировании *L. edodes* на жидком пивном сусле (А) и на синтетической среде с глюкозой и *L.* аспарагином (Б).

По оси абсцисс — время культивирования, сут; по оси ординат — концентрация биомассы, г а. с. в./л. Штаммы: 1 — IBK-55, 2 — IBK-57, 3 — IBK-65.

выращивания глубинного инокулюма в указанных условиях составляет 6—7 сут. Увеличение времени культивирования до 10—14 сут не целесообразно, так как накопления биомассы при рН 3.0 не происходит, и культура переходит в стационарную фазу, «старее», появляется большое число вакуолизированных и «пустых» гиф. При инокуляции свежих сред таким мицелием лаг-фаза увеличивается до 2—2.5 сут, что приводит к снижению продуктивности процесса.

Для глубинного культивирования мицелия *L. edodes* ряд авторов использовали крахмалсодержащие среды с кукурузным, мальц- и дрожжевым экстрактами (Sakamoto et al., 1987; Song et al., 1987). На комплексной среде, где нами использовались комбинированные источники углеродного (крахмал+глюкоза) и азотного (кукурузный экстракт+сульфат аммония) питания, за 8 сут глубинного культивирования для исследованных штаммов *L. edodes* была получена концентрация биомассы 8.5—9 г/л а. с. в. Поддержание значений рН на оптимальном уровне и внесение в среду подсолнечного масла (0.1 %) способствовали продлению фазы активного накопления биомассы до 10—12 г/л на 10-е сут культивирования (рис. 2).

Таким образом, установлены оптимальные сроки выращивания культуры на каждом из этапов подготовки жидкого посевного материала (рис. 3): после пересева культур на косяки с сусло-агаром (8° Баллинга) их выращивают в течение 8—10 сут. Жидкое пивное сусло (4° Баллинга) засевают мицелием с кусочками агара. Сусло разливают по 50 мл в 250-миллилитровые колбы с отбойниками (специальные выступы длиной 1—1.5 см на дне и нижней боковой части колб) и инкубируют в течение 8—9 сут до образования мицелиальной пленки на поверхности среды. Затем мицелий измельчают, встряхивая колбы в течение 4—5 мин, и полученной суспензией инокулируют жидкие питательные среды (рН 5.0—4.5), внося 10 % по объему

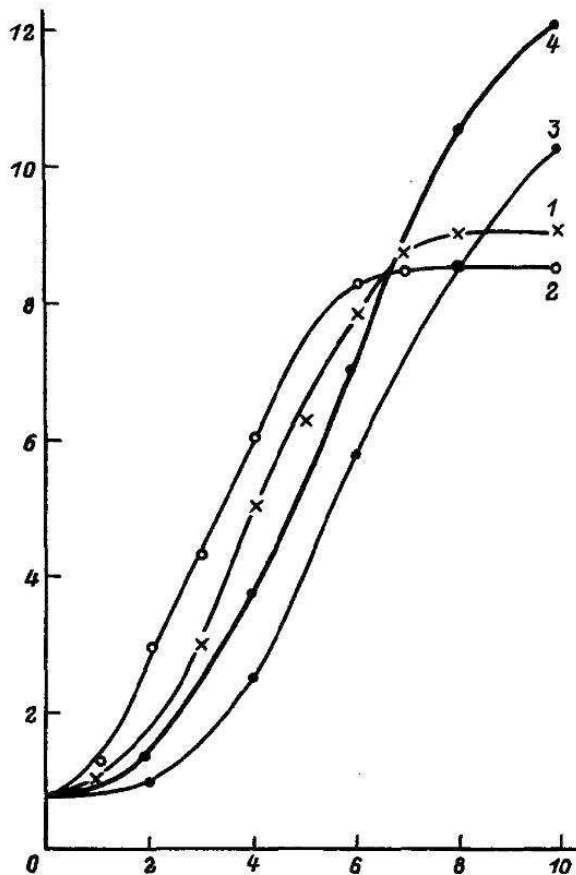


Рис. 2. Динамика накопления биомассы *L. edodes* на комплексной крахмалсодержащей среде.

По оси абсцисс — время культивирования, сут; по оси ординат — концентрация биомассы, г а. с. в./л. Штаммы: 1 — ИВК-55, 2 — ИВК-57, 3 — ИВК-65, 4 — ИВК-65 при добавлении в среду 0.1% подсолнечного масла.

Поверхностно  
в стационарных условиях

В глубинной  
перемешиваемой культуре

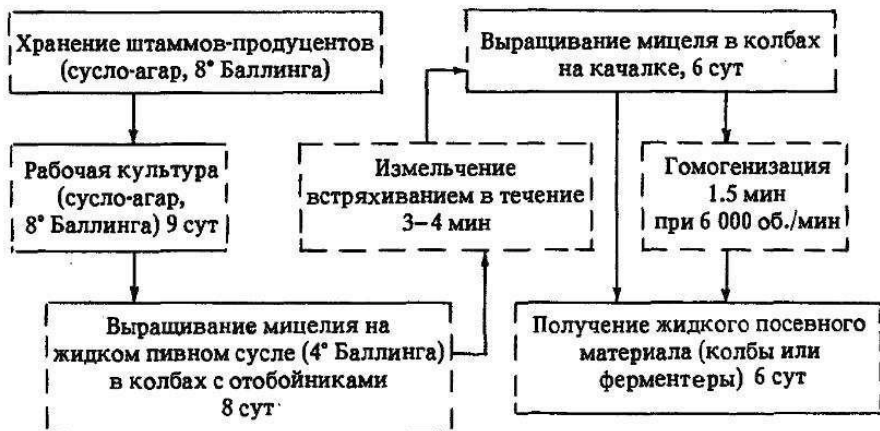


Рис. 3. Схема подготовки физиологически активного жидкого посевного материала *L. edodes*.



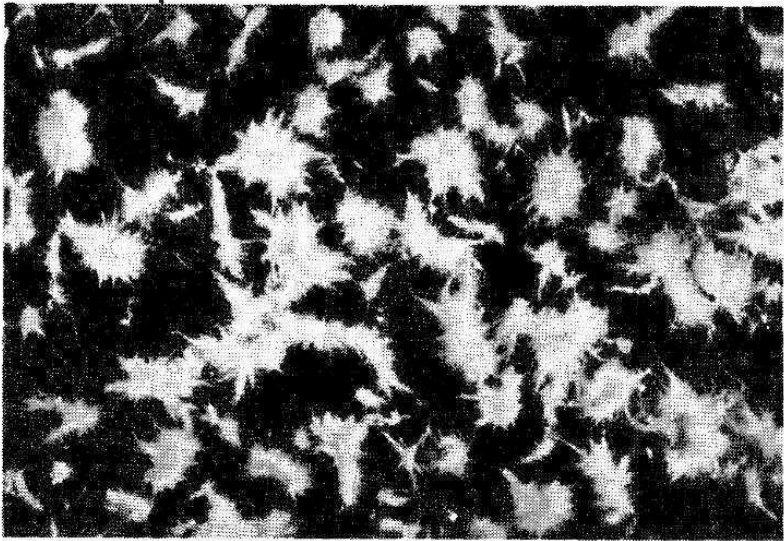


Рис. 4. Мицелий шиитаке в глубинной культуре на крахмалсодержащей жидкой среде.

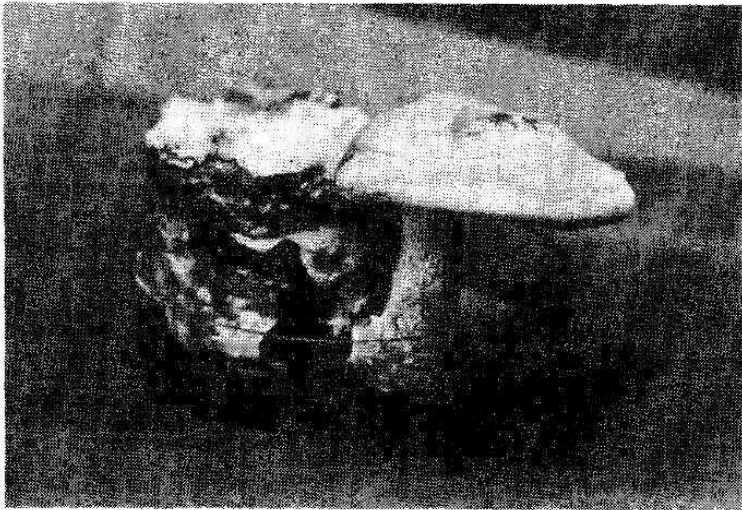


Рис. 5. Плодовые тела *L. edodes* ВК-55 на зерне пшеницы, инокулированном жидким посевным материалом.

суспензии. Посевы инкубируют при оптимальной температуре на качалке. Через 6—8 сут глубинного культивирования мицелий *L. edodes* вырастает в виде шариков, плотность и размер которых в значительной степени зависят от состава среды.

Так, на крахмалсодержащих комплексных средах мицелий шиитаке рос в виде мелких (2—3 мм в диам.) рыхлых клубочков (рис. 4). Такая культура может быть использована без гомогенизации для второго пассажа в глубинной культуре в колбах на качалке или для инокуляции сред в ферментере. При формировании неоднородных по структуре и размерам мицелиальных агломератов, образование которых мы наблюдали на ряде син-



тетических и натуральных сред, для получения активного роста в последующем пассаже требуется гомогенизация при указанных нами режимах.

Использование жидкого инокулюма *L. edodes*, полученного по предлагаемой методической схеме, обеспечивало быстрое и равномерное обрастание пшеницы и сокращало сроки приготовления зернового мицелия до 6—7 сут по сравнению с 45 сут, необходимыми для производства посевного материала ситяке традиционным методом. Наши результаты согласуются с опубликованными данными (Yang, Jong, 1989). В отдельных случаях на зерновом мицелии при длительном хранении (2—2.5 мес) наблюдалось образование плодовых тел *L. edodes* со всеми характерными морфологическими признаками (рис. 5).

При инокуляции плотных субстратов, основу которых составляли опилки ряда лиственных пород деревьев, 7-суточным зерновым мицелием плодовые тела штамма ИВК-55 были получены через 3 мес. При непосредственной инокуляции жидким посевным мицелием срок образования плодовых тел сокращался до 1—1.5 мес, в зависимости от состава субстрата. Разработанная нами методическая схема подготовки физиологически активного глубинного инокулюма *L. edodes* может быть использована в производстве плодовых тел и биомассы этого гриба.

Работа выполнена по программе, финансируемой ГКНТ Украины.

#### Список литературы

- Бухало А. С., Митропольская Н. Ю. Каталог культур (Basidiomycotina). Киев: Ин-т ботаники им. Н. Г. Холодного, 1990. 61 с. — Соломко Э. Ф., Дудка И. А. Перспективы использования высших базидиомицетов в микробиологической промышленности // Обзорная информация ВНИИ СЭНТИ. М., 1985. 48 с. — Фомина В. И., Лысенкова А. В. О возможности культивирования гриба *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. // Раст. ресурсы. 1989. Вып. 4. С. 588—593. — Chibata I., Okumura K., Takeyama S., Kotera K. Lentinacin: A new hypocholesterolemic substance in *Lentinus edodes* // Experimentia. 1969. N 15. P. 1237—1238. — Chihara G., Hamuro J., Maeda Y., Arai Y., Fukuoka F. Fractionation and purification of the polysaccharides with marked antitumor activity, especially lentinan, from *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. (on edible mushroom) // Cancer Res. 1970. N 30. P. 2776—2781. — Cochran K. W. Medical effects // The biology and cultivation of edible mushrooms / Ed. S. T. Chang, W. A. Hayes. New York etc.: Acad. Press, 1978. P. 169. — Ito T. Cultivation of *Lentinus edodes* // Ibid. P. 461—473. — Kamiya T., Saito Y., Hashimoto M., Seki H. Hypocholesterolemic alkaloids of *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. I. Structure and synthesis of eritadenine // Tetrahedron. 1972. N 28. P. 899—906. — Kirchhoff B., Lelley J. Investigations of Shiitake [*Lentinus edodes* (Berk.) Sing.] bag-long cultivation to increase the yield in Germany // Mushroom Sci. 1991. Vol. 13. Part 2. P. 509—516. — Mori K., Zennyozzi A., Kugimiya N. Analysis on the incompatible factors in natural population of *Lentinus edodes* // Jap. J. Genet. 1972. Vol. 47. N 5. P. 359. — Mori K., Toyomasu T., Nanba H., Kuroda H. Antitumor action of fruit bodies of mushrooms orally administered to mice // Mushroom Sci. 1989. Vol. 12. Part 1. P. 653—660. — Sakamoto R., Niimi T., Takahashi. Submerged culture of Edible Fungi in high-consistency starch media // Agricultural chemistry (Japan). 1987. Vol. 52, N 2. P. 83—90. — Singer R. Mushrooms and Truffles. London: Leonard Hill Ltd., 1961. P. 132—146. — Song C. H., Cho K. Y., Nair N. G. A synthetic medium for the production of submerged cultivation of *Lentinus edodes* // Micologia. 1987. Vol. 79, N 6. P. 866—876. — Sugimori T., Oyama Y., Omichi T. Studies on basidiomycetes. (1) Productions of mycelium and fruiting body from noncarbohydrate organic substances // J. Ferment. Technol. 1971. Vol. 49, N 5. P. 435—446. — Yang Q. Y., Jong S. C. A quick and efficient method of making mushroom spawn // Mushroom Sci. 1989. Vol. 12. Part. 1. P. 631—643.