

УДК 57.083.132

Оптимизация условий глубинного культивирования гриба *Phallus Impudicus*

Канд. биол. наук А. Н. РАЗИН¹, канд. мед. наук Е. В. ВОРОБЕЙЧИКОВ¹,
д-р биол. наук М. Ю. ВОЛКОВ², канд. техн. наук М. М. ШАМЦЯН¹,
д-р техн. наук Е. И. КИПРУШКИНА³

¹Санкт-Петербургский государственный технологический институт (Технический университет)

²Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии МВА
имени К. И. Скрябина

³Университет ИТМО

Проведено исследование по оптимизации накопления биомассы базидиального гриба *Phallus impudicus* в условиях глубинного культивирования. Оптимизация проведена на основе методов факторного регрессионного анализа. В качестве параметра оптимизации использовали значения концентрации биомассы гриба. В качестве факторов, влияющих на изменения величины, варьировались: время культивирования; температура культивирования; водородный показатель; аэрация среды; скорость вращения мешалки; концентрации глюкозы, пептона, дрожжевого экстракта. Для рабочего объема культуральной среды 1750 мл установлены следующие значения факторов: $t=144$; $T=27,0-29,0$ °C; $pH=5,0-5,5$; $Av=1,5-1,75$; $V=200-275$; $Gl=15,0$; $Pe=4,5$; $Ye=2,5$. При этих значениях факторов фиксировали максимальные значения величины (C_m). В данных условиях культивирования лаг-фаза указанного гриба продолжается до 72 ч, а фаза экспоненциального роста отмечается в интервале 72–144 ч. Максимальная скорость накопления биомассы в культуральной среде повышается от 1,0 до 6,0 и находится в интервале от 96 ч до 144 ч. При промышленном культивировании гриба *Ph. impudicus* необходимо учитывать оптимальные значения полученных факторов, продолжительность его лаг-фазы и экспоненциальной фазы роста.

Ключевые слова: базидиальные грибы, биомасса гриба, глубинное культивирование, оптимизация культивирования, регрессионный анализ, факторы роста, фазы роста.

Информация о статье:

Поступила в редакцию 02.03.2023, одобрена после рецензирования 17.03.2023, принята к печати 10.04.2023

DOI: 10.17 586/1606-4313-2023-22-2-59-67

Язык статьи — русский

Для цитирования:

Разин А. Н., Воробейчиков Е. В., Волков М. Ю., Шамцян М. М., Кипрушкина Е. И. Оптимизация условий глубинного культивирования гриба *Phallus Impudicus*. // Вестник Международной академии холода. 2023. № 2. С. 59–67. DOI: 10.17 586/1606-4313-2023-22-2-59-67

Optimization of conditions for submerged cultivation of the fungus *Phallus Impudicus*

Ph. D. A. N. RAZIN¹, Ph. D. E. V. VOROBAYCHIKOV¹, D. Sc. M. Yu. VOLKOV², Ph. D. M. M. SHAMTSYAN¹,
D. Sc. E. I. KIPRUSHKINA³

¹St. Petersburg State Technological Institute (Technical university)

²Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology named after K. I. Skryabin

³ITMO University

Research objective. The optimization of the biomass accumulation of the basidiomycete *Phallus impudicus* under conditions of submerged cultivation.

Methods. Optimization was carried out on the basis of factorial regression analysis. The values of fungal biomass concentration were used as an optimization parameter. The following factors influencing changes in the value of biomass concentration varied: cultivation time; cultivation temperature; pH value; medium aeration; stirrer rotation speed; concentrations of glucose, peptone, and yeast extract. **Results.** For the working volume of 1750 ml culture medium, the following values of the factors were found: $t=144$; $T=27.0-29.0$ °C; $pH=5.0-5.5$; $Av=1.5-1.75$; $V=200-275$; $Gl=15.0$; $Pe=4.5$; $Ye=2.5$. At the indicated values of the factors, the maximum values of the biomass concentration were recorded. It was shown that under these cultivation conditions the lag phase of the specified fungus lasts up to 72 hours, and the exponential growth phase occurs in the range of 72–144 hours. The maximum rate of biomass accumulation in the culture medium increases from 1.0 to 6.0 and is in the range from 96 h to 144 h. **Practical value.** When industrial cultivating the fungus *Ph. impudicus*, it is necessary to take into account

the optimal values of the factors under investigation, the duration of its lag phase, and the exponential growth phase in order to obtain the maximum values of its biomass.

Keywords: basidiomycetes, fungal biomass, submerged cultivation, cultivation optimization, regression analysis, growth factors, growth phases.

Article info:

Received 02/03/2023, approved after reviewing 17/03/2023, accepted 10/04/2023

DOI: 10.17 586/1606-4313-2023-22-2-59-67

Article in Russian

For citation:

Razin A. N., Vorobeychikov E. V., Volkov M. Yu., Shamtsyan M. M., Kiprushkina E. I. Optimization of conditions for submerged cultivation of the fungus *Phallus Impudicus*. *Journal of International Academy of Refrigeration*. 2023. No 2. p. 59–67. DOI: 10.17 586/1606-4313-2023-22-2-59-67

Введение

Актуальным направлением развития биотехнологии является совершенствование производства биологически активных субстанций для последующего создания лекарственных средств или биологически активных добавок к пище. Одним из безопасных источников получения таких субстанций являются базидиомицеты — высшие грибы. Метаболиты или компоненты их клеточных стенок обладают противоопухолевой, иммуностимулирующей, антиоксидантной, нейропротекторной, противодиабетической и противомикробной активностью [1]–[3].

Перспективным продуцентом является представитель гастеромицетов — Веселка обыкновенная (*Phallus impudicus*). В частности, экстракты этого гриба используются в медицине для получения фунгицидных препаратов [4], оказывают влияние на противоопухолевую и противоифекционную защиту организма [5, 6].

Одним из способов получения биомассы гриба *Ph. impudicus* является метод глубинного культивирования [7]–[9]. Этот подход позволяет получить достаточное количество грибного мицелия и выделить из него необходимое количество биологически активных веществ (БАВ) для их использования в композициях с заданными биологическими свойствами. Для промышленного получения биомассы *Ph. impudicus* актуально определение основных параметров его культивирования, влияющих на накопление его мицелия в жидкой питательной среде. Целью работы является оптимизация процесса глубинного культивирования гриба *Ph. impudicus* на основе

следующих контролируемых параметров: t — время культивирования (ч); T — температура культивирования (°C); pH — водородный показатель, A_v — аэрация среды (л/мин); V — скорость вращения мешалки (об/мин); $G1$ — концентрация глюкозы (г/л); Pe — концентрация пептона (г/л); Ye — концентрация дрожжевого экстракта (г/л).

Материалы и методы

В исследовании использовали чистую культуру гриба базидиомицета *Phallus impudicus* (*Phallus impudicus* Linnaeus, 1753: Persoon, 1801; Класс *Basidiomycetes*; порядок *phallales*; семейство *phallaceae*) из коллекции культур микроорганизмов Ботанического института им. В. Л. Комарова РАН, Санкт-Петербург.

При оптимизации глубинного культивирования этого гриба использовали следующие контролируемые факторы: время культивирования; температура культивирования; pH питательной среды, аэрация; скорость вращения мешалки; концентрации в питательной среде: глюкозы, дрожжевого гидролизата, пептона. В качестве параметра эффективности оптимизации определяли количество сухого мицелия указанного гриба, полученного из литра жидкой питательной среды (C_m , г/л), фиксируемого при различных сроках его роста. В табл. 1 представлены уровни варьирования этих факторов.

Посевную дозу гриба получали методом глубинного культивирования на стандартной жидкой глюкозопептонной среде следующего состава: пептон — 1,5 г/л, глюкоза — 15 г/л, NaCl — 0,5 г/л, CaCl₂—0,05 г/л, MgSO₄.

Таблица 1

Уровни варьирования контролируемых параметров (факторов)

Table 1

The ranges of the parameters under investigation

Название параметра	Обозначение, размерность	Уровни варьирования параметра		
		минимальный	средний	максимальный
Время культивирования	t , ч	24–48	72–96	120–144
Температура	T , °C	20,0–22,0	25,0–27,0	30,0–32,0
Кислотность среды	pH	3,5	4,25	5,0–6,0
Аэрация	A_v , л/мин	0,0	1,0	2,0
Скорость вращения мешалки	V , об/мин	0,0	275,0	550,0
Концентрация глюкозы	$G1$, г/л	5,0	10,0	15,0
Концентрация пептона	Pe , г/л	2,5	3,5	4,5
Концентрация дрожжевого экстракта	Ye , г/л	2,0	6,0	10,0

0,5 г/л, KH_2PO_4 —0,6 г/л, K_2HPO_4 —0,4 г/л, дрожжевой экстракт — 1,5 г/л. Стерилизацию среды проводили автоклавированием в течение 40 мин при температуре 120,0 °С и давлении пара $P=0,5$ атм. Дрожжевой экстракт стерилизовали отдельно в течение 30 мин при температуре 120,0 °С и давлении пара $P=0,5$ атм.

Чистую культуру гриба выращивали на лабораторной качалке при 120 об/мин (при непрерывном перемешивании), при 24,0 °С в колбах Эрленмейера с общим объемом 750,0 мл в 200,0 мл питательной среды. В результате предварительного культивирования получена исходная биомасса в количестве 5,0 г/л ± 5,0 мас.%. Соответственно, посевная доза гриба для ферментера с рабочим объемом питательной среды 1750,0 мл составляла 170, мл, что соответствует 0,024 г/л сухого мицелия ±5,0 мас.%. Биомассу гриба собирали после вакуумной фильтрации с использованием фильтров (Whatman № 2, Бакин-гемшир, Великобритания) с последующим ее трехкратным ополаскиванием деионизированной водой [10]. Свежий мицелий переносили в предварительно взвешенные стеклянные флаконы Маккартни и массу мицелия фиксировали с точностью до четвертого знака на весах (Kern AGB, Брайсгау, Германия). Мицелий сушили во флаконах при 60,0±1,0 °С в течение 3 сут и далее снова взвешивали.

Для оптимизации значений величины (C_m) использовали методы регрессионного анализа, учитывающие влияние указанных факторов на вариабельность этой величины [11]–[14].

Результаты исследования

В табл. 2 представлены статистические характеристики параметров для регрессионных моделей (1-6), описывающих зависимости изменений величины (C_m) от исследуемых факторов ($t, T, \text{pH}, A_v, V, \text{Gl}, \text{Pe}, \text{Ye}$). Коэффициенты для этих моделей идентифицированы за счет минимизации суммы квадратов отклонений теоретических значений величины (C_m) от их экспериментальных значений, определяемых в соответствующих временных точках.

Модель 1 базируется на культивировании гриба в условиях фиксированного состава питательной среды (пептон — 1,5 г/л, глюкоза — 15 г/л, NaCl — 0,5 г/л, CaCl_2 — 0,05 г/л, MgSO_4 — 0,5 г/л, KH_2PO_4 — 0,6 г/л, K_2HPO_4 — 0,4 г/л, дрожжевой экстракт — 1,5 г/л) и $\text{pH}=4,5$, но при различной температуре (T) и продолжительности культивирования (t). Это позволяет представить зависимость изменений величины (C_m) от факторов (T) и (t) в виде:

$$C_m = f(T; t). \tag{1}$$

Таблица 2

Статистические характеристики параметров для регрессионных моделей, позволяющих получить зависимости изменений величины C_m от факторов ($t, T, \text{pH}, A_v, V, \text{Gl}, \text{Pe}, \text{Ye}$)

Table 2

Statistical characteristics of the parameters for regression models, which allow to obtain dependencies of the changes of the value C_m on the factors $t, T, \text{pH}, A_v, V, \text{Gl}, \text{Pe}$, and Ye

Обозначение коэффициентов для моделей: 1–6	Коэффициент и его ошибка (±)	T критерий	Уровень значимости (p)	F критерий (Фишера), уровень значимости (p), коэффициент детерминации (R ²)
Модель 1				
Константа	-40,39±8,95	-4,51	<0,01	51,99
T	2,99±0,67	4,45	<0,01	<0,01
T·t	0,03±0,003	11,64	<0,01	91,23
T ²	-0,05±0,01	-4,41	<0,01	
Модель 2				
Константа	-16,01±4,24	-3,77	<0,01	257,4
pH	7,74±2,05	3,78	<0,01	<0,01
t	0,037±0,009	-4,17	<0,01	98,00
pH·t	0,015±0,002	7,52	<0,01	
pH ²	-0,91±0,24	-3,75	<0,01	
Модель 3				
A_v	6,37±0,74	8,54	<0,01	202,14
V	0,017±0,003	6,24	<0,01	<0,01
$A_v \cdot V$	0,003±0,0009	3,93	<0,01	97,87
A_v^2	-2,57±0,39	-6,62	<0,01	
V^2	-0,00002±0,000005	-3,89	<0,01	
Модель 4				
Константа	-0,76±0,30	-2,52	<0,02	366,53
Pe	0,46±0,18	2,51	<0,02	<0,01
Gl	1,01±0,14	6,83	<0,01	98,48
Gl ²	-0,02±0,006	-3,82	<0,01	
Модель 5				
Константа	12,55±0,04	275,00	<0,01	3172,75
ln (Ye)	-1,55±0,02	-56,33	<0,01	<0,01
				99,75
Модель 6				
Константа	0,057±0,012	4,77	<0,01	300,11
t	0,039±0,002	17,32	<0,01	<0,01
				91,00

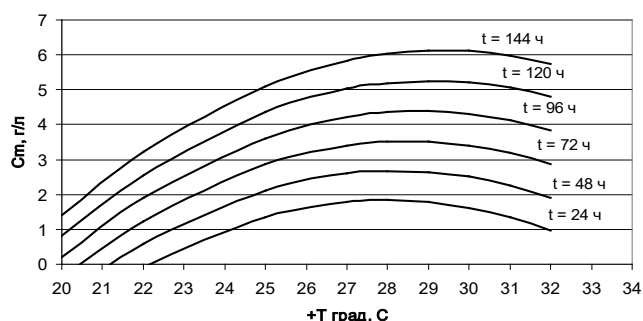


Рис. 1. Зависимость изменений величины (C_m) от температуры ($+T$) и времени глубинного культивирования (t) продуцента *Ph. impudicus*

Fig. 1. The changes of C_m depending on temperature ($+T$) and the time of submerged cultivation (t) of *Ph. impudicus* producer

Полученные значения коэффициентов (T ; Tt ; T^2) для модели (1) статистически достоверны ($p < 0,01$), что позволяет представить зависимость накопления биомассы *Ph. impudicus* в среде культивирования от указанных факторов в виде:

$$C_m = -40,39 + 2,99 \cdot T + 0,03T \cdot t - 0,05T^2. \quad (2)$$

Положительные значения коэффициента фактора (T) и коэффициента взаимодействия факторов (Tt) показывают, что с увеличением их значений происходит повышение величины (C_m). Однако отрицательный квадратичный коэффициент (T^2) свидетельствует о наличии оптимальных значений этого фактора, при которых достигается максимальное накопление в среде биомассы *Ph. impudicus*. Значение критерия Фишера ($F=51,99$), уровень его статистической значимости ($p < 0,01$), а также значение коэффициента детерминации ($R^2=91,23$) демонстрируют приемлемую информационную способность выражения (2). На рис. 1 представлена графическая интерпретация этого выражения, результаты которой показывают, что при увеличении времени культивирования с 72 ч до 144 ч отмечается значительное повышение биомассы *Ph. impudicus* в интервале температур от 28 °C до 29 °C с 3,5 до 6,0 г/л. Увеличение температуры культивирования до 32 °C приводит к снижению величины (C_m). Следовательно, оптимум температурного роста *Ph. impudicus* находится в узком температурном интервале (28–29 °C), при котором отмечается максимальное накопление его биомассы в период с 72 ч до 144 ч.

Модель 2 основывается на влиянии различных значений pH среды в интервале 3,5–6,0 на накопление биомассы гриба и времени его культивирования (t) от 72 ч до 144 ч при фиксированной температуре 28,0 °C. Эти условия позволяют ввести выражение:

$$C_m = f(\text{pH}, t). \quad (3)$$

Полученные расчетные значения коэффициентов (pH , t , $\text{pH} \cdot t$, pH^2) для модели (3) показывают, что они статистически достоверны ($p < 0,01$). Зависимость величины (C_m) от факторов (pH) и (t) приобретает вид:

$$C_m = -16,01 + 7,74 \cdot \text{pH} - 0,037t + 0,015 \cdot \text{pH} \cdot t - 0,91 \cdot \text{pH}^2. \quad (4)$$

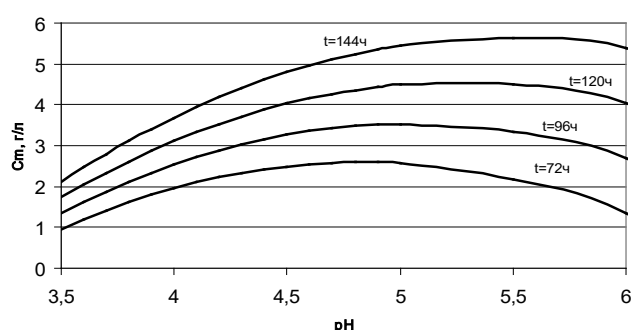


Рис. 2. Зависимости изменений величины (C_m) от pH среды и времени культивирования (t) гриба *Ph. impudicus* при фиксированной температуре 28,0 °C

Fig. 2. The changes of C_m depending on pH of the medium and cultivation time (t) of *Ph. impudicus* under fixed temperature of 28,0 °C

Положительные значения коэффициента фактора (pH) и коэффициента взаимодействия факторов ($\text{pH} \cdot t$) показывают, что с увеличением их значений происходит повышение величины (C_m). Отрицательные значения коэффициента фактора (t) и квадратичного коэффициента (pH^2) свидетельствуют о наличии оптимальной области значений факторов (pH , t), при которых достигается максимальное накопление в среде биомассы гриба. Значение критерия Фишера ($F=257,4$), уровень его статистической значимости ($p < 0,01$), а также значение коэффициента детерминации ($R^2=98,00$) демонстрируют достоверность выражения (4) и его приемлемую информационную способность. На рис. 2 представлена графическая интерпретация модели (4), которая показывает, что через 72 ч выращивания гриба максимальная концентрация биомассы составляет 2,5–2,6 г/л в интервале pH 4,5–5,0. Через 96 ч культивирования максимальная концентрация биомассы гриба достигает 3,5 г/л в интервале pH 4,8–5,0. Через 120 ч культивирования гриба максимальная концентрация биомассы определяется на уровне 4,5 г/л в интервале pH 4,9–5,0. Через 144 ч культивирования гриба максимальная концентрация биомассы находится на уровне 5,6 г/л при pH 5,0–5,5. Это означает, что область оптимальных значений pH для культивирования гриба *Ph. impudicus* определяется на уровне 5,0, т. к. увеличение pH > 5,0 (5,2–6,0) снижает эффективность его накопления.

Модель 3 базируется на влиянии факторов (A_v) и (V) на величину (C_m) при фиксированных значениях факторов: $T=28,0$ °C; $\text{pH}=5,0$ и $t=144$ ч, что позволяет для этой величины записать выражение:

$$C_m = f(A_v, V). \quad (5)$$

Полученные расчетные значения коэффициентов для факторов (A_v , V , $A_v V$, A_v^2 , V^2) статистически достоверны ($p < 0,01$). Тогда, выражение (5) имеет вид:

$$C_m = 6,37A_v + 0,017V + 0,003A_v V - 2,57A_v^2 - 0,00002V^2. \quad (6)$$

Значение критерия Фишера ($F=202,14$), уровень его статистической достоверности ($p < 0,01$), значение коэффициента детерминации ($R^2=97,87$) показывают статистическую достоверность выражения (6) и его достаточную информационную способность для оценки измене-

ний величины (C_m) от этих факторов. На рис. 3 представлена графическая интерпретация модели (6), демонстрирующая, что максимальная концентрация биомассы 6,1 г/л определяется при скорости перемешивания 100 об/мин и аэрации 1,3 л/мин. При 200 об/мин и аэрации 1,4 л/мин максимальная концентрация биомассы фиксируется на уровне 8,0 г/л. При скорости перемешивания 275 об/мин и аэрации 1,5 л/мин концентрация биомассы достигает 9,1 г/л. Однако, максимум накопления биомассы гриба 11,8 г/л отмечается при скорости перемешивания 550 об/мин и аэрации 1,75 л/мин. Увеличение значений аэрации среды до 2,0 л/мин уменьшает эффективность накопления в культуральной среде биомассы гриба *Ph. impudicus*.

Модель 4 основывается на влиянии питательных веществ (Pe) и (Gl) в культуральной среде на величину (C_m) при постоянных значениях факторов: $T=28,0\text{ }^\circ\text{C}$; $pH=5,0$; $t=144\text{ ч}$; $A_v=1,75\text{ л/мин}$ и $V=550\text{ об/мин}$. В этом случае оценка изменений величины (C_m) от факторов (Pe) и (Gl) имеет следующий вид:

$$C_m = f(\text{Pe}, \text{Gl}). \quad (7)$$

Представленные в табл. 2 расчетные значения коэффициентов для факторов (Pe, Gl, Gl²) статистически достоверны ($p < 0,01$), что позволяет записать выражения (7) в виде:

$$C_m = -0,76 + 0,46\text{Pe} + 1,01\text{Gl} - 0,023\text{Gl}^2. \quad (8)$$

Значение критерия Фишера ($F=366,53$), уровень его статистической достоверности ($p < 0,01$), значения коэффициента детерминации ($R^2=98,48$) демонстрируют статистическую достоверность выражения (8) и его достаточную информационную способность. Графическая интерпретация выражения (8) представлена на рис. 4. Результаты на рис. 4 показывают, что увеличение концентрации пептона (Pe) в культуральной среде от 2,0 г/л до 4,5 г/л, не оказывает существенного влияния изменения величины (C_m), т. к. значения этой величины варьируют в интервале 1–2 г/л. Изменение в культуральной среде глюкозы (Gl) от 1,0% до 20,0% оказывают более значимое влияние на величину (C_m), т. к. происходит повышение ее значений от 0,9 до 13,9 г/л, соответственно.

Модель 5 основывается на влиянии различных концентраций дрожжевого экстракта (Ye) в культуральной среде на величину (C_m) при фиксированных значениях факторов: $T=28,0\text{ }^\circ\text{C}$; $pH=5,0$; $t=144\text{ ч}$; $A_v=1,75\text{ л/мин}$; $V=550\text{ об/мин}$; $\text{Pe}=4,5\text{ г/л}$ и $\text{Gl}=15\text{ г/л}$. Это позволяет для величины (C_m) использовать выражение:

$$C_m = f(\text{Ye}). \quad (9)$$

Расчетные значения коэффициентов для фактора (Ye) статистически достоверны ($p < 0,01$). Тогда, выражение (9) может быть представлено:

$$C_m = 12,55 - 1,55 \cdot \ln(\text{Ye}). \quad (10)$$

Значение критерия Фишера ($F=3172,75$), уровень его статистической достоверности ($p < 0,01$), значение коэффициента детерминации ($R^2=99,75$) демонстрируют статистическую достоверность выражения (10) и его приемлемую информативность. Графическая интерпретация модели (10) представлена на рис. 5. Результаты на этом

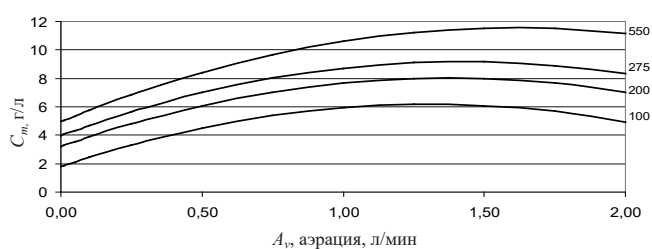


Рис. 3. Зависимости изменений величины (C_m) гриба *Ph. impudicus* от аэрации среды (A_v) и скорости вращения мешалки через 144 ч культивирования при температуре $28,0\text{ }^\circ\text{C}$. 100, 200, 275, 550 — скорости вращения мешалки, об/мин

Fig. 3. The changes of C_m for *Ph. impudicus* depending on medium aeration (A_v) and stirrer rotation speed after 144 hours of cultivation under the temperature of $28.0\text{ }^\circ\text{C}$. 100, 200, 275, and 550 — stirrer rotation speed, rot/min

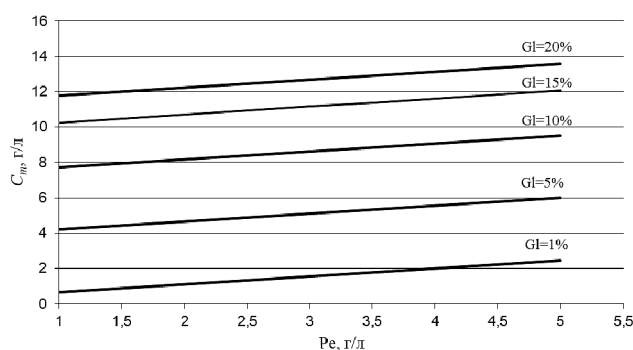


Рис. 4. Зависимости изменений величины (C_m) гриба *Ph. impudicus* от концентрации пептона (Pe) и концентрации глюкозы (Gl) через 144 ч культивирования

Fig. 4. The changes of C_m for *Ph. impudicus* depending the concentration of peptone (Pe) and glucose (Gl) after 144 hours of cultivation

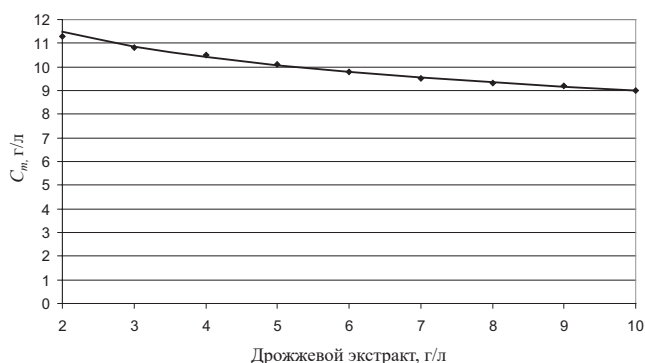


Рис. 5. Зависимость изменений величины (C_m) от концентрации дрожжевого экстракта (Ye) при фиксированных концентрациях глюкозы ($\text{Gl}=15\text{ г/л}$) и пептона ($\text{Pe}=4,5\text{ г/л}$) через 144 ч культивирования гриба *Ph. impudicus*

Fig. 5. The changes of C_m depending on the concentration of yeast extract (Ye) under fixed concentrations of glucose ($\text{Gl}=15\text{ г/л}$) and peptone ($\text{Pe}=4.5\text{ г/л}$) after 144 hours of *Ph. Impudicus* cultivation

рисунке показывают, что повышение в среде концентрации дрожжевого экстракта (Ye) от 2,0 г/л до 10 г/л приводит к незначительному эффекту снижения биомассы с 11,2 г/л до 9 г/л, которым, с практической точки, можно

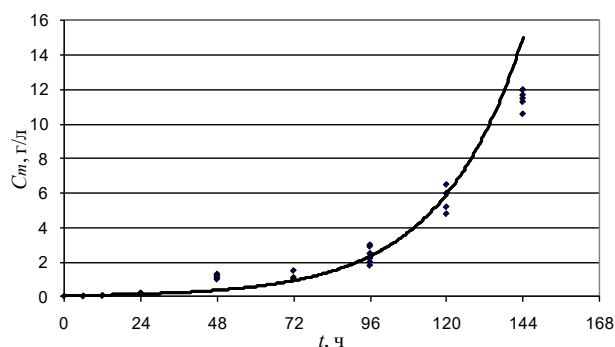


Рис. 6. Зависимость изменений величины (C_m) продуцента *Ph. impudicus* от времени культивирования (t) при фиксированных значениях факторов: $T=28,0\text{ }^\circ\text{C}$; $pH=5,0$; $A_v=1,75\text{ л/мин}$; $V=550\text{ об/мин}$; $Pe=4,5\text{ г/л}$; $Gl=15\text{ г/л}$; $Ye=2,5\text{ г/л}$

Fig. 6. The changes of C_m for *Ph. impudicus* producer depending on the time of cultivation (t) under fixed values of: $T=28,0\text{ }^\circ\text{C}$; $pH=5,0$; $A_v=1,75\text{ l/min}$; $V=550\text{ rot/min}$; $Pe=4,5\text{ g/l}$; $Gl=15\text{ g/l}$; $Ye=2,5\text{ g/l}$

пренебречь. Это означает, что оптимальные значения этого фактора находятся в интервале 2–4 г/л.

Модель 6 базируется на изменениях величины (C_m), полученных в результате оптимизации культивирования данного гриба (модели 1–5) при следующих фиксированных значениях факторов: ($T=28,0\text{ }^\circ\text{C}$, $pH=5,0$, $A_v=1,75\text{ л/мин}$, $V=550\text{ об/мин}$, $Pe=4,5\text{ г/л}$, $Gl=15\text{ г/л}$, $Ye=2,5\text{ г/л}$). При таких условиях культивирования изменения величины (C_m) могут быть представлены:

$$C_m = f(t), \quad (11)$$

где фактор t — время культивирования гриба, ч.

В дифференциальной форме выражение (11) обычно записывают в виде:

$$\frac{dN}{dt} = K \cdot N, \quad (12)$$

где $\frac{dN}{dt}$ — изменение величины C_m в единицу времени;

N — значения величины C_m ; K — коэффициент пропорциональности или интенсивности изменений величины C_m .

Решение уравнения (12) приводит к экспоненциальному выражению:

$$C_m(t) = C_{m0} \exp(K \cdot t), \quad (13)$$

где C_{m0} — исходное значение величины (C_m) гриба в начальный момент его культивирования ($t=0$), т. е. его посевная доза; t — время культивирования, ч.

Расчетные значения коэффициентов для модели 6, представленные в табл. 2, позволяют записать выражение (13):

$$C_m = 0,057 \cdot \exp^{0,039t}. \quad (14)$$

Значения этих коэффициентов статистически достоверны ($p < 0,01$), значение критерия Фишера ($F=300,11$), а также значения коэффициента детерминации ($R^2=95,26$) демонстрируют приемлемую информационную способность выражения (14). Графическая интерпретация этого выражения на рис. 6 показывает, что лаг-фаза этого гри-

ба находится в интервале от 0 ч до 72 ч, а фаза его экспоненциального роста — от 72 ч до 144 ч. Максимальные значения величины (C_m) определяются через 144 ч.

Другой важной характеристикой изменений величины C_m гриба является скорость накопления его биомассы в среде культивирования, которая определяется:

$$V_{cm} \equiv \frac{dC_m}{dt} = 0,057 \cdot 0,039 \cdot \exp^{0,039t}. \quad (15)$$

Тогда, для оценки величины V_{cm} получаем:

$$V_{cm} = 0,0022 \cdot \exp^{0,039t}, \quad (16)$$

где: V_{cm} — скорость накопления биомассы в среде культивирования, г/л/ч. Результаты расчетов выражения (16) показывают, что максимальная скорость накопления биомассы повышается от 1,0 до 6,0 (г/л/ч) и находится в интервале от 96 ч до 144 ч.

Обсуждение результатов

Оптимальный процесс культивирования микроорганизмов зависит от контролируемых и неконтролируемых факторов, влияющих на накопление в питательной среде их биомассы или активных метаболитов. Соответственно, наиболее прямым методологическим подходом для оптимизации контролируемых факторов является мониторинг их значений в непрерывном или дискретном режиме.

Культивирование гриба *Ph. impudicus* изучали методом глубинного роста в течение 144 ч. С технологической точки зрения это важно, т. к. в указанный период времени учитывается потенциальная продолжительность лаг-фазы и фазы экспоненциального роста данного гриба. Проведены эксперименты по оптимизации указанных выше контролируемых факторов.

В работе N. Subhashini et al. [15] было показано, что минимальная и максимальная температура роста базидиальных грибов находится в интервале от 9,0 °C до 32,0 °C. В данном исследовании изучено накопление биомассы *Ph. impudicus* в интервале от 20,0 °C до 32,0 °C. При этом установлено, что оптимальная температура роста этого гриба составляет 28,0–29,0 °C. Полученные значения этого фактора уточняют температурный режим его культивирования.

Значения pH среды культивирования также оказывают существенное влияние на накопление в питательной среде биомассы высших грибов [16]. В нашем исследовании установлено, что оптимальные значения pH культуральной среды находятся в интервале 5,0–5,5, а увеличение значений pH до 6,0 снижает эффективность накопления биомассы *Ph. impudicus*. Эти результаты подтверждают информацию, что эффективный рост базидиальных грибов отмечается при значениях pH среды < 6,0.

Среди физических факторов, влияющих на глубинный рост высших грибов и на перенос питательных веществ между мицелием и средой культивирования, являются скорость вращения мешалки (V) и аэрация среды (A_v). Известно, что скорость вращения мешалки фрагментирует пеллеты на мелкие части, которые образуют новые центры роста гриба, что увеличивает его биомассу [17, 18]. Аэрация среды также способствует повышению биомассы гриба [19]. Оптимизация этих факторов показала

наличие их аддитивного влияния на величину (C_m). Максимальные значения этой величины были получены при аэрации среды (A_v) от 1,5 л/мин до 1,75 л/мин и скорости вращения мешалки (V) от 200 об/мин до 275 об/мин.

Влияние глюкозы (Gl) на накопление биомассы микроорганизмов имеет большое значение. Известно, что концентрация глюкозы в питательных средах для культивирования базидиомицетов варьирует от 20 г/л до 40 г/л [20]. При оптимизации значений этого фактора для культивирования продуцента *Ph. impudicus* варьировали концентрациями глюкозы в интервале от 1,0 г/л до 20,0 г/л. Нами было установлено, что максимальное накопление биомассы гриба определяется при содержании глюкозы в среде 15,0 г/л. Увеличение концентрации глюкозы в питательной среде до 20,0 г/л не приводит к значимому повышению биомассы гриба. По-видимому, более низкие потребности в глюкозе *Ph. impudicus* связаны с видовыми особенностями его метаболизма.

Для культивирования базидиальных грибов также необходимы источники дополнительных веществ: азота (пептон, Pe), витаминopodobных веществ (дрожжевой экстракт, Ye) [21]. Однако нами было показано, что оптимальные концентрации дрожжевого экстракта в питательной среде для продуцента *Ph. impudicus* находятся в интервале 2–4 г/л.

Таким образом, оптимизация глубинного культивирования гриба *Ph. impudicus* позволила определить оптимальные значения контролируемых факторов, влияющих на накопление его биомассы, а также установить продолжительность лаг-фазы и фазы экспоненциального

роста, что необходимо учитывать для эффективного накопления биомассы.

Заключение

В результате проведенной работы установлены следующие оптимальные факторы для культивирования *Ph. impudicus*, реализуемые в конкретных условиях накопления его биомассы (C_m).

1. Время культивирования (t) для максимального накопления биомассы составляет 144 ч; температура культивирования $T=28,0-29,0$ °C; водородный показатель $pH=5,0-5,5$; аэрация $A_v=1,50-1,75$ л/мин; скорость вращения мешалки $V=200-275$ об/мин.

2. Оптимальные значения питательной потребности *Ph. impudicus* составили: концентрация глюкозы (Gl) 15 г/л; концентрация пептона (Pe) 4,5 г/л, концентрация дрожжевого экстракта (Ye) 2,0–4,0 г/л.

3. Лаг-фаза гриба *Ph. impudicus* находится в интервале 0–72 ч, фаза экспоненциального роста — в интервале 72–144 ч. Максимальная скорость накопления биомассы ($V_{cm}=dC_m/dt$, г/л/ч) повышается от 1,0 до 6,0 и находится в интервале от 96 ч до 144 ч.

4. Предложены математические модели выявленных зависимостей концентрации биомассы исследуемого гриба от контролируемых параметров при глубинном культивировании. Рассчитаны параметры моделей и доказана их адекватность.

Конфликт интересов. Авторы подтверждают отсутствие конфликта финансовых и нефинансовых интересов, связанных с представленным исследованием.

Литература

1. Geir Hetland, Jon-Magnus Tangen, Faiza Mahmood, Mohammad Reza Mirlashari, Lise Sofie Haug Nissen-Meyer, Ivo Nentwich, Stig Palm Therkelsen, Geir Erland Tjønnfjord, Egil Johnson. Antitumor, Anti-Inflammatory and Antiallergic Effects of Agaricus blazei Mushroom Extract and the Related Medicinal Basidiomycetes Mushrooms, Hericium erinaceus and Grifola frondosa. // A Review of Preclinical and Clinical Studies. *Nutrients*. 2020 May 8; 12 (5):1339. doi: 10.3390/nu12051339.
2. Jing Xu, Rui Shen, Zhuoya Jiao, Weidong Chen, Daiyin Peng, Lei Wang, Nianjun Yu, Can Peng, Biao Cai, Hang Song, Fengyuan Chen, Bin Liu. Current Advancements in Antitumor Properties and Mechanisms of Medicinal Components in Edible Mushrooms. // *Nutrients*. 2022 Jun 24;14 (13):2622. doi: 10.3390/nu14132622.
3. Junrong Zhang, Shengshu An, Wenji Hu, Meiyu Teng, Xue Wang, Yidi Qu, Yang Liu, Ye Yuan, Di Wang. The Neuroprotective Properties of Hericium erinaceus in Glutamate-Damaged Differentiated PC12 Cells and an Alzheimer's Disease Mouse Model. // *International Journal of Molecular Sciences*. 2016 Nov 1;17 (11):1810. doi: 10.3390/ijms17111810.
4. Филиппова И. А., Соколов В. Д., Андреева Н. Л., Юшкевич Т. В., Разин А. Н., Вознюк Е. В., Яковлев Н. А. Изучение гриба *Phallus impudicus* (веселка обыкновенная) для создания фунгицидных профилактических и лечебных средств // *Успехи медицинской микологии*. Т. 11. М.: Национальная академия микологии, 2013. С. 113–115.
5. Разин А. Н., Кulyrova А. В. Изучение эффективности препарата «Веселка» в отношении ортопоксвирусной инфек-

References

1. Geir Hetland, Jon-Magnus Tangen, Faiza Mahmood, Mohammad Reza Mirlashari, Lise Sofie Haug Nissen-Meyer, Ivo Nentwich, Stig Palm Therkelsen, Geir Erland Tjønnfjord, Egil Johnson. Antitumor, Anti-Inflammatory and Antiallergic Effects of Agaricus blazei Mushroom Extract and the Related Medicinal Basidiomycetes Mushrooms, Hericium erinaceus and Grifola frondosa. *A Review of Preclinical and Clinical Studies. Nutrients*. 2020 May 8; 12 (5):1339. doi: 10.3390/nu12051339.
2. Jing Xu, Rui Shen, Zhuoya Jiao, Weidong Chen, Daiyin Peng, Lei Wang, Nianjun Yu, Can Peng, Biao Cai, Hang Song, Fengyuan Chen, Bin Liu. Current Advancements in Antitumor Properties and Mechanisms of Medicinal Components in Edible Mushrooms. *Nutrients*. 2022 Jun 24;14 (13):2622. doi: 10.3390/nu14132622.
3. Junrong Zhang, Shengshu An, Wenji Hu, Meiyu Teng, Xue Wang, Yidi Qu, Yang Liu, Ye Yuan, Di Wang. The Neuroprotective Properties of Hericium erinaceus in Glutamate-Damaged Differentiated PC12 Cells and an Alzheimer's Disease Mouse Model. *International Journal of Molecular Sciences*. 2016 Nov 1;17 (11):1810. doi: 10.3390/ijms17111810.
4. Filippova I. A., Sokolov V. D., Andreeva N. L., Yushkevich T. V., Razin A. N., Voznyuk E. V., Yakovlev N. A. The study of the fungus *Phallus impudicus* (*veselka vulgaris*) for the creation of fungicidal preventive and therapeutic agents. *Uspekhi meditsinicheskoi mykologii*. Vol. 11. Moscow, National Academy of Mycology, 2013. pp. 113–115. (in Russian)
5. Razin A. N., Kulyrova A. V. Studying the effectiveness of the drug «Veselka» in relation to orthopoxvirus infection. *Issues*

- ции // Вопросы нормативно-правового регулирования в ветеринарии. 2016. № 4. С. 172.
6. Разин А. Н., Волков М. Ю., Вишневецкий В. В., Захаров Э. А. Системно-биологическое исследование влияния метаболитов *Phallus impudicus* на кинетику роста возбудителей микозов // Вопросы курортологии, физиотерапии и лечебной физической культуры. 2020. Т. 97. № 2. С. 92.
 7. Калашников А. А. Новая технология культивирования высших базидиомицетов в искусственно замкнутой экосистеме: дисс... канд. биол. наук. Саратов, 2011. 143 с.
 8. Бухало А. С., Дудка И. А. Высшие съедобные базидиомицеты в чистой культуре. К.: Наукова думка, 1988. 144 с.
 9. Кожемякина Н. В., Ананьева Е. П., Гурина С. В., Галынкин В. А. Условия культивирования, состав биологическая активность мицелия *Flammulina velutipes* (Fr.) // Прикладная биохимия и микробиология. 2010. Т. 46, № 5. С. 583–586.
 10. Diamantopoulou P., Papanikolaou S., Komaitis M., Aggelis G., Philippoussis A. Patterns of major metabolites biosynthesis by different mushroom fungi grown on glucose-based submerged cultures. // *Bioprocess. Biosyst. Eng.* 2014. No 3. P. 1385–1400.
 11. Адлер Ю. П., Маркова Е. В., Грановский Ю. В. Планирование эксперимента при поиске оптимальных условий. М.: Наука, 1976. 279 с.
 12. Боровиков В. Statistica: искусство анализа данных на компьютере. Для профессионалов. СПб.: Питер, 2001. 656 с.
 13. Дрейпер Н. Прикладной регрессионный анализ. М.: ИД Вильямс, 2019. 912 с.
 14. Дрейпер Н., Смут Г. Прикладной регрессионный анализ. Множественная регрессия. Applied Regression Analysis. 3-е изд. М.: Диалектика, 2007. 912 с.
 15. N. Subhashini, G. Nagarajan, and S. Kavimani. In vitro antioxidant and anticholinesterase activities of *Garcinia combogia*. // *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 2011. vol. 3. pp. 129–132.
 16. Fazenda M. L., Seviour R., McNeil B., Harvey L. M. Submerged culture fermentation of «Higher Fungi»: The Macrofungi. // *Advances in applied microbiology*. 2008. p. 33–103.
 17. Papagianni M. Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes. // *Biotechnol Adv.* 2004;22 (3):189–259.
 18. Diamantopoulou P., Papanikolaou S., Kapoti M., Komaitis M., Aggelis G., Philippoussis A. Mushroom polysaccharides and lipids synthesized in liquid agitated and static cultures. Part I: Screening various mushroom species. // *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2012. Vol. 167. P. 536–551.
 19. Lin P. J., Scholz A., Krull R. Effect of volumetric power input by aeration and agitation on pellet morphology and product formation of *Aspergillus niger*. // *Biochem Eng J.* 2010;49 (2):213–20.
 20. Yunfeng Ma, Fu Xiang, Jun Xiang, and Longjiang Yu. Optimization of Soluble Organic Selenium Accumulation during Fermentation of *Flammulina velutipes* Mycelia. // *Z Naturforsch C J Biosci.* 2012 Nov-Dec; 67 (11-12):594–602. doi: 10.1515/znc-2012-11-1210.
 21. Xiao J. H., Chen D. X., Liu J. W., Liu Z. L., Wan W. H., Fang N., Xiao Y., Qi Y., Liang Z. Q. Optimization of submerged culture requirements for the production of mycelial growth and exopolysaccharide by *Cordyceps jiangxiensis* JXPJ 0109. // *J Appl Microbiol.* 2004;96 (5):1105–16. doi: 10.1111/j. 1365–2672.2004.02235. x.
 6. Razin A. N., Volkov M. Yu., Vishnevsky V. V., Zakharov E. A. System-biological study of the effect of metabolites of *Phallus impudicus* on the kinetics of the growth of mycosis pathogens. *Questions of balneology, physiotherapy and therapeutic physical culture*. 2020. Vol. 97. No. 2. p. 92. (in Russian)
 7. Kalashnikov A. A. New technology of cultivation of higher basidiomycetes in an artificially closed ecosystem: diss... cand. biol. sciences. Saratov, 2011. 143 p. (in Russian)
 8. Bukhalo A. S., Dudka I. A. Higher edible basidiomycetes in pure culture. K.: Naukova dumka, 1988. 144 p. (in Russian)
 9. Kozhemyakina N. V., Ananyeva E. P., Gurina S. V., Galynkin V. A. Cultivation conditions, composition biological activity of mycelium *Flammulina velutipes* (Fr.). *Applied biochemistry and microbiology*. 2010. Vol. 46, No. 5. pp. 583–586. (in Russian)
 10. Diamantopoulou P., Papanikolaou S., Komaitis M., Aggelis G., Philippoussis A. Patterns of major metabolites biosynthesis by different mushroom fungi grown on glucose-based submerged cultures. *Bioprocess. Biosyst. Eng.* 2014. No 3. P. 1385–1400.
 11. Adler Yu. P., Markova E. V., Granovsky Yu. V. Experiment planning in the search for optimal conditions. Moscow: Nauka, 1976. 279 p. (in Russian)
 12. Borovikov V. Statistica: the art of data analysis on a computer. For professionals. St. Petersburg: Peter, 2001. 656 p. (in Russian)
 13. Draper N. Applied regression analysis. Moscow, IH Williams, 2019. 912 p. (in Russian)
 14. Draper N., Smith G. Applied regression analysis. Multiple regression. Applied Regression Analysis. 3rd ed. M.: Dialectics, 2007. 912 p. (in Russian)
 15. N. Subhashini, G. Nagarajan, S. Kavimani. In vitro antioxidant and anticholinesterase activities of *Garcinia combogia*. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 2011. vol. 3. pp. 129–132.
 16. Fazenda M. L., Seviour R., McNeil B., Harvey L. M. Submerged culture fermentation of «Higher Fungi»: The Macrofungi. *Advances in applied microbiology*. 2008. p. 33–103.
 17. Papagianni M. Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes. *Biotechnol Adv.* 2004;22 (3):189–259.
 18. Diamantopoulou P., Papanikolaou S., Kapoti M., Komaitis M., Aggelis G., Philippoussis A. Mushroom polysaccharides and lipids synthesized in liquid agitated and static cultures. Part I: Screening various mushroom species. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2012. Vol. 167. P. 536–551
 19. Lin P. J., Scholz A., Krull R. Effect of volumetric power input by aeration and agitation on pellet morphology and product formation of *Aspergillus niger*. *Biochem Eng J.* 2010;49 (2):213–20.
 20. Yunfeng Ma, Fu Xiang, Jun Xiang, and Longjiang Yu. Optimization of Soluble Organic Selenium Accumulation during Fermentation of *Flammulina velutipes* Mycelia. *Z Naturforsch C J Biosci.* 2012 Nov-Dec; 67 (11-12):594–602. doi: 10.1515/znc-2012-11-1210.
 21. Xiao J. H., Chen D. X., Liu J. W., Liu Z. L., Wan W. H., Fang N., Xiao Y., Qi Y., Liang Z. Q. Optimization of submerged culture requirements for the production of mycelial growth and exopolysaccharide by *Cordyceps jiangxiensis* JXPJ 0109. *J Appl Microbiol.* 2004;96 (5):1105–16. doi: 10.1111/j. 1365–2672.2004.02235. x.

Сведения об авторах**Разин Александр Николаевич**

К. биол. н., Санкт-Петербургский государственный технологический институт (Технический университет), 190013, Россия, Санкт-Петербург, Московский пр., 24–26/49 лит. А

Воробейчиков Евгений Владимирович

К. мед. н., Санкт-Петербургский государственный технологический институт (Технический университет), 190013, Россия, Санкт-Петербург, Московский пр., 24–26/49 лит. А

Волков Михаил Юрьевич

Д. биол. н., профессор каф. иммунологии и биотехнологии, Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии МВА имени К. И. Скрябина, 109472, Москва, ул. Академика Скрябина, 23

Шамцян Марк Маркович

К. т. н., доцент, зав. каф. технологии микробиологического синтеза, Санкт-Петербургский государственный технологический институт (Технический университет), 190013, Россия, Санкт-Петербург, Московский пр., 24–26/49 лит. А, mark.shamtsyan@yandex.ru

Кипрушкина Елена Ивановна

Д. т. н., доцент, доцент факультета биотехнологий Университета ИТМО, 191002, Санкт-Петербург, ул. Ломоносова, 9, eikiprushkina@itmo.ru

Information about authors**Razin Aleksandr N.**

Ph. D., St Petersburg State Technological Institute (Technical university), 26, Moskovski ave., St. Petersburg, Russia, 190013

Vorobeychikov Evgeny V.

Ph. D., St Petersburg State Technological Institute (Technical university), 26, Moskovski ave., St. Petersburg, Russia, 190013

Volkov Mikhail Yu.

D. Sc., Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology named after K. I. Skryabin, 23 Akademika Scriabin str., Moscow, Russia, 109472

Shamtsyan Mark M.

Ph. D., Associate Professor, Head of the Department of Microbiological Synthesis Technology, St Petersburg State Technological Institute (Technical university), 26, Moskovski ave., St. Petersburg, Russia, 190013, mark.shamtsyan@yandex.ru

Kiprushkina Elena I.

D. Sc., Associate Professor, Associate Professor of Biotechnologies of ITMO University, 191002, Russia, St. Petersburg, Lomonosov str., 9, eikiprushkina@itmo.ru



Статья доступна по лицензии
Creative Commons «Attribution-NonCommercial»



32 международная агропромышленная выставка-ярмарка
АГРОРУСЬ-2023

Выставка «АГРОРУСЬ»
30 августа – 1 сентября 2023 г.

Ярмарка региональных продуктов «АГРОРУСЬ»
25 августа – 3 сентября 2023 г.

Актуальные темы выставки «АГРОРУСЬ-2023»:

- Цифровизация в сельском хозяйстве.
- Решение кадровых вопросов в сфере агропромышленного комплекса (АПК).
- Импортозамещение в сельскохозяйственной отрасли.
- Актуальные проблемы АПК.
- Современные тенденции развития профессионального аграрного образования.
- Экспорт продукции агропромышленного комплекса России.

Выставка будет состоять из следующих разделов:

- ✓ Выставка-продажа: продукты питания, пищевые добавки и ингредиенты.
- ✓ Зоотехния: питание (комбикорма, кормовые добавки), разведение, содержание (ветеринария, средства по уходу).
- ✓ Растениеводство: селекция, удобрения, средства защиты растений.
- ✓ Оборудование для пищевого производства.
- ✓ Услуги по упаковке, хранению, транспортировке, утилизации.

<http://agrorus.expoforum.ru/>

Организатор выставки-ярмарки:
Министерство сельского хозяйства РФ,
при официальной поддержке Правительств
Санкт-Петербурга и Ленинградской области.

Контакты:
Тел./факс: +7 (812) 240-40-40, доб.2235
E-mail: e.gabuchiya@expoforum.ru,

Место проведения:
КВЦ «Экспофорум»
Петербургское шоссе 64, корпус 1