

УДК 561.284 602.44

## Подбор условий глубинного культивирования *Pleurotus ostreatus*

Е. В. АНТОНЦЕВА<sup>1</sup>, С. С. СОРОКИН<sup>2</sup>, Д. О. ТЕРЕНТЬЕВ<sup>3</sup>,  
В. А. СЕДЫХ<sup>4</sup>, канд. техн. наук М. М. ШАМЦЯН<sup>5</sup>

<sup>1</sup>antontseva@gmail.com, <sup>2</sup>sersorock@yandex.ru, <sup>3</sup>daniil.terentyev@gmail.com,

<sup>4</sup>vktsedykh@yandex.ru, <sup>5</sup>mark.shamtsyan@yandex.ru

Санкт-Петербургский государственный технологический институт (технический университет)

*Произведен подбор условий глубинного культивирования гриба *P. ostreatus* для получения наибольшего выхода биомассы. Для выращивания грибов глубинным методом были выбраны источники углерода и азота, в качестве замены глюкозе и пептону в составе стандартной среды. Кроме того, был изучен рост *P. ostreatus* на средах с различными начальными значениями pH и при различных скоростях растворения кислорода. В результате были определены значения pH и степень аэрации среды культивирования, обеспечивающие наибольший выход биомассы. В качестве источника углерода выбраны цельнозерновая ржаная мука и пшеничная мука второго сорта, в качестве источника азота выбрана соевая мука. Биомасса *P. ostreatus* может быть использована для получения β-глюкан содержащих препаратов, применяемых в качестве самостоятельных БАВ или функциональной добавки для обогащения молочных и других пищевых продуктов.*

**Ключевые слова:** *Pleurotus ostreatus*, β-глюканы, глубинное культивирование, источники углерода, источники азота, питательная среда.

### Информация о статье:

Поступила в редакцию 20.11.2018, принята к печати 17.01.2019

doi: 10.17586/1606-4313-2019-18-1-34-38

Язык статьи — русский

### Ссылка для цитирования:

Антонцева Е. В., Сорокин С. С., Терентьев Д. О., Седых В. А., Шамцян М. М. Подбор условий глубинного культивирования *Pleurotus Ostreatus* // Вестник Международной академии холода. 2019. № 1. С. 34–38.

## Selection of conditions for submerged cultivation of *Pleurotus ostreatus*

E. V. ANTONTCEVA<sup>1</sup>, S. S. SOROKIN<sup>2</sup>, D. O. TERENCEV<sup>3</sup>,  
V. A. SEDYKH<sup>4</sup>, Ph. D. M. M. SHAMTSYAN<sup>5</sup>

<sup>1</sup>antontseva@gmail.com, <sup>2</sup>sersorock@yandex.ru, <sup>3</sup>daniil.terentyev@gmail.com,

<sup>4</sup>vktsedykh@yandex.ru, <sup>5</sup>mark.shamtsyan@yandex.ru

Saint-Petersburg State Institute of Technology

*The aim of this study was to select the conditions for submerged cultivation to obtain the highest yield of biomass. For the submerged cultivation various carbon and nitrogen sources were used as a replacement for glucose and peptone in the composition of the basic medium. Also, the growth of *P. ostreatus* was studied on media with different initial pH values and at the different dissolution rates of oxygen. As a result, the pH value and aeration level of the cultivation medium providing the highest biomass yield were determined. Medium rye flour or dark wheat flour were selected as a source of carbon, soy flour was selected as the source of nitrogen. Submerged biomass of *P. ostreatus* can be used for obtaining β-glucan-containing preparations used as BAS or functional supplements for the fortification of dairy and other food products.*

**Keywords:** *Pleurotus ostreatus*, β-glucans, submerged cultivation, sources of carbon, sources of nitrogen, nutrient medium.

### Article info:

Received 20/11/2018, accepted 17/01/2019

DOI: 10.17586/1606-4313-2019-18-1-34-38

Article in Russian

### For citation:

Antontceva E. V., Sorokin S. S., Terentyev D. O., Sedykh V. A., Shamtsyan M. M. Selection of conditions for submerged cultivation of *Pleurotus ostreatus*. *Vestnik Mezhdunarodnoi akademii kholoda*. 2019. No 1. p. 34–10.

### Введение

*Pleurotus ostreatus* или вешенка обыкновенная, является ценным диетическим продуктом, плодовые тела которого употребляются в пищу, производятся

в промышленном масштабе во многих странах мира. Также, благодаря широкому спектру биологически активных веществ, нашел широкое применение в медицине.

В наших предыдущих исследованиях были продемонстрированы гипополипидемическое и гипохолестерольное действия вешенки обыкновенной [1]. К тому же, *P. ostreatus* известен своими иммуномодулирующим, противоаллергенным, противоопухолевым, противовоспалительным, антиоксидантным, антибактериальным, антипролиферативным, пребиотическим и радиопротекторным действиями [2–8].

Особое внимание следует уделить β-глюканам, которые являются структурными полисахаридами клеточных стенок грибов и проявляют значительную биологическую активность. β-глюканы встречаются во многих организмах: злаковых культурах, водорослях, бактериях, грибах и дрожжах [3]. β-глюканы дрожжей и грибов имеют разветвленное строение (рис. 1). Основная цепь макромолекулы состоит из остатков β-D-глюкопираноз, соединенных β-1–3-гликозидными связями. К этой цепи в положениях 6 присоединяются боковые ответвления, частота и размер которых варьиабельны [9].

Как уже известно, β-глюканы, выделенные из базидиомицетов, при включении в состав обычных ежедневно употребляемых пищевых продуктов, могут придать им различные профилактические и функциональные свойства, такие как иммуностимулирующее, гипополипидемическое, противоопухолевое, противовоспалительное и гипогликемическое свойства [10]. Полисахариды, выделенные из культуры гриба *P. ostreatus*, могут быть использованы для разработки новых функциональных продуктов и нутрицевтиков [11].

Функциональные продукты — это классические пищевые продукты, в состав которых включаются биологически активные вещества, придающие им новые полезные для здоровья человека свойства. Функциональные продукты, обогащенные β-глюканами могут повысить качество жизни человека при систематическом употреблении. В нашем предыдущем исследовании мы изучали возможность использования грибных полисахаридов, содержащих β-глюканы, для создания функциональных продуктов на основе ферментированных молочных продуктов [12]. Возможно создание и других функциональных продуктов с включением β-глюканов, таких как шоколад или хлеб. Так, например, изучалось влияние грибных β-глюканов, используемых в качестве добавки к муке на реологические свойства теста при производстве хлеба [13]. Планируются исследования по включению β-глюканов в различные кондитерские изделия. В целом β-глюканы можно включать в любые матричные структуры, так как препарат представляет собой водорастворимый порошок. При этом надо учиты-

вать его влияние на цвет продукта, так как он имеет собственный природный пигмент.

Препараты β-глюканов могут использоваться в медицине в качестве иммуностимулирующих агентов. Например, некоторые исследования показали, что β-глюканы *P. ostreatus* эффективны в борьбе с инфекциями дыхательных путей у детей с хроническими респираторными заболеваниями [2, 14, 15].

Помимо выращивания вешенки в виде плодовых тел, возможно ее культивирование глубинным способом. Метод глубинного культивирования позволяет получать гомогенную биомассу, что упрощает выделение продукта, а также обеспечивает стабильность свойств готового продукта и его относительную стандартизацию [16]. Одной из наиболее распространенных питательных сред для культивирования базидиомицетов является полусинтетическая глюкозо-пептонная среда. Состав питательной среды имеет важное значение для культивирования. Выход биомассы, биосинтетическая активность продуцента и конечная стоимость продукта сильно зависят от состава среды. Например, было изучено влияние источника углерода на свойства и антиоксидантную активность экзополисахаридов, полученных из культуры *Trametes robiniophila* [17]. В другом исследовании проверялось влияние температуры и состава питательной среды на рост мицелия двух видов грибов рода *Pleurotus* (*P. ostreatus* и *P. cystidiosus*) [18]. Из литературного источника известно, что органические соединения азота лучше всего подходят для культивирования гриба *P. ostreatus*. Наиболее широко используемым источником азота является пептон, а на втором месте — мочевины.

Цель данной работы — подобрать состав среды и режим аэрации, обеспечивающие наибольший выход биомассы. Полученная глубинным способом биомасса гриба *P. ostreatus* может использоваться в качестве источника полисахаридов, выделяемых с помощью последовательных спиртовых и водных экстракций [10].

### Экспериментальная часть

Объектом исследования стала культура гриба *Pleurotus ostreatus*. Культура базидиомицета *P. ostreatus* (*Jacq.*) *P. Kumm* была взята из коллекции кафедры технологии микробиологического синтеза Санкт-Петербургского государственного технологического института (технического университета).

Данная культура изначально выращивалась на стандартной глюкозо-пептонной питательной среде. Состав питательной среды представлен в табл. 1.

Начальное значение pH среды, до стерилизации, было равно 6,5.

Для определения влияния аэрации среды на синтез биомассы, вешенку культивировали в колбах с различными объемами жидкой питательной среды: 50, 100, 150 и 200 мл. Во всех случаях глубинное культивирование проводилось в течение 7 сут на роторной качалке с частотой вращения 230 мин<sup>-1</sup> при температуре 28–30 °С. Объем вносимого посевного материала составлял 10% от объема жидкой среды в колбах Эрленмейера.

Скорость растворения кислорода в колбах составляла 4,4; 3,0; 1,8 и 1,2 г/ (л×ч) для объема среды равного 50, 100, 150 и 200 мл, соответственно.

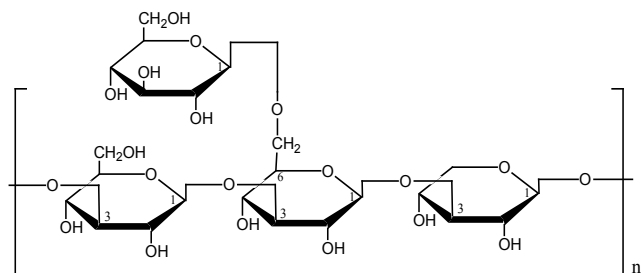


Рис. 1. Структурная формула β-1,3/1,6-D-глюкана  
Fig. 1. Structural formula of β-1,3/1,6-D-glucan

По окончании культивирования, мицелий *P. ostreatus* отделяли от нативного раствора путем фильтрования через бумажный фильтр. Влажную биомассу высушивали в сушильном шкафу при температуре 50 °С. Массу полученного сухого грибного мицелия определяли гравиметрически.

Для изучения влияния различных начальных значений pH питательной среды гриб *P. ostreatus* культивировали на средах с pH: 5; 6; 6,5; 7 и 7,5. Начальные значения pH питательных сред доводили до нужных значений путем добавления к стандартной среде определенных количеств HCl или NaOH. Объем стандартной глюкозо-пептонной среды для глубинного культивирования составлял по 100 мл в каждой колбе.

Для изучения роста культуры *P. ostreatus* на питательной среде с различными источниками углерода и азота модифицировалась стандартная глюкозо-пептонная питательная среда (табл. 1). В качестве источников углерода вместо глюкозы были взяты ржаная цельнозерновая мука, цельносомолотая ржаная мука, пшеничная мука первого сорта, пшеничная мука второго сорта, кукурузная мука, картофельный крахмал и соевая мука. Концентрации источников углерода в средах были эквивалентны содержанию глюкозы 15 г/л.

В качестве источника азота вместо пептона использовались мочевины,  $\text{NaNO}_3$ ,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  и соевая мука в количествах, эквивалентных содержанию азота

в исходной среде. Остальные компоненты и их количества соответствовали, указанным в табл. 1.

Все эксперименты проводились в трех повторностях. Стандартные отклонения были рассчитаны и включены в графическое представление данных. Результаты были обработаны статистически с помощью программы Microsoft Office Excel.

### Обсуждение результатов

Концентрация кислорода в среде оказывает значительное влияние на биосинтез биомассы грибами [19]. Так как  $\beta$ -глюканы являются полисахаридами клеточной стенки грибов, то их количество напрямую зависит от выхода биомассы. Таким образом синтез  $\beta$ -глюканов зависит от скорости растворения кислорода в среде культивирования. Изучено влияние скорости растворения кислорода в питательной среде на выход биомассы *P. ostreatus*. Результаты этих исследований показаны на рис. 2.

Из представленных на рис. 2 данных видно, что наибольший выход биомассы *P. ostreatus* наблюдается при выращивании культуры при режиме аэрации, обеспечивающем скорость растворения кислорода 4,4 г/(л×ч)

Выход биомассы *P. ostreatus* при росте на полусинтетической глюкозо-пептонной среде с различными начальными значениями pH, представлен на рис. 3.

Из полученных результатов видно, что при значении pH среды меньше 6, накопление биомассы культурой *P. ostreatus* уменьшается; в диапазоне значений pH среды от 6 до 7, культура демонстрирует хороший рост и лучший рост наблюдается при значении pH 7,5.

Выявлено, что источник углерода влияет на метаболизм грибных культур и их биосинтетическую активность. Так как в нашем случае целевым продуктом являются полисахариды клеточной стенки, важным параметром культивирования будет концентрация биомассы, накопление которой, прежде всего, зависит от источника углерода. Кроме того, задача заключалась в том, чтобы заменить глюкозу на недорогой источник углерода, что увеличило бы экономическую эффективность процесса. Рост культуры *P. ostreatus* на питательной среде с различными источниками углерода показан на рис. 4.

Таблица 1  
Состав питательной среды

Table 1  
Composition of nutrient media

Компонент питательной среды	Концентрация, г/л
Глюкоза	15
Пептон	2,5
Дрожжевой экстракт	2,0
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0,6
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	0,4
$\text{MgSO}_4$	0,5
NaCl	0,5
$\text{CaCl}_2$	0,05

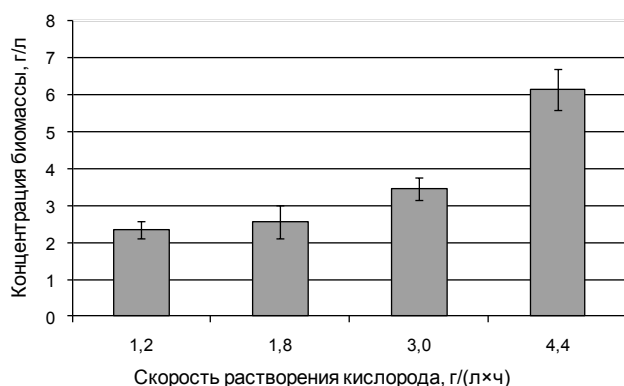


Рис. 2. Выход биомассы *P. ostreatus* при разных скоростях растворения кислорода

Fig. 2. The yield of biomass at the different level of oxygen dissolution

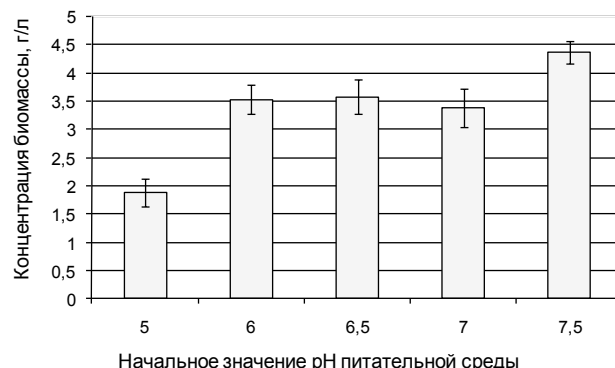


Рис. 3. Зависимость выхода биомассы *P. ostreatus* от начальных значений pH питательной среды

Fig. 3. Influence of pH on yield of *P. ostreatus* biomass

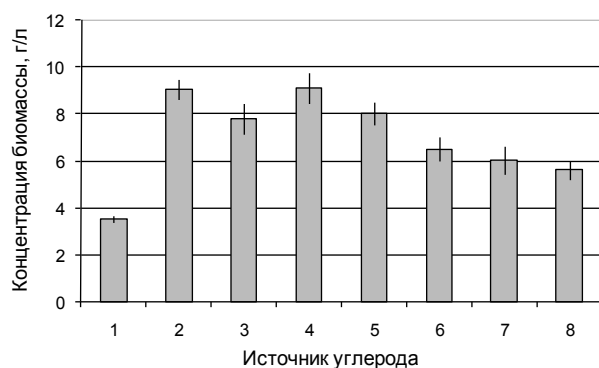


Рис. 4. Выход биомассы *P. ostreatus* при выращивании на средах с различными источниками углерода: 1 — глюкоза, 2 — ржаная цельнозерновая мука, 3 — цельнозерновая ржаная мука, 4 — пшеничная мука первого сорта, 5 — пшеничная мука второго сорта, 6 — кукурузная мука, 7 — крахмал, 8 — соевая мука

Fig. 4. Yield of *P. ostreatus* biomass by growing on media with different carbon source: 1 — glucose, 2 — rye wholemeal flour, 3 — wholemeal rye flour, 4 — wheat flour of the first grade, 5 — wheat flour of the second grade, 6 — corn flour, 7 — starch, 8 — soy flour

Все источники углерода, которые использовались в эксперименте, обеспечивали более высокий выход биомассы, по сравнению с глюкозой. Исходя из этих данных, глюкоза может быть заменена более дешевым источником углерода, что также увеличит выход продукта. Наибольший выход биомассы наблюдался при выращивании грибной культуры на средах, где в качестве источника углерода использовались цельнозерновая ржаная мука и пшеничная мука второго сорта.

Второй по важности компонент питательной среды — источник азота. Рост культуры *P. ostreatus* на питательной среде с различными источниками азота показан на рис. 5.

Из полученных данных видно, что пептон возможно заменить неорганическими источниками азота. Наибольший выход биомассы наблюдался на среде с соевой мукой в качестве источника азота.

### Выводы

В результате проведенного исследования выявлено, что для глубинного культивирования *P. ostreatus* рекомендуются следующие условия:

- продолжительность культивирования 7 дней;
- скорость аэрации 3,3–4,0 г/(л×ч);
- начальное значение pH среды культивирования 7,5.

Для культивирования *P. ostreatus* предлагается использовать питательную среду следующего состава (г/л): цельнозерновая ржаная мука или пшеничная мука второго сорта — 20; соевая мука — 4,4; дрожжевой экстракт — 2;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ —0,6;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ —0,4;  $\text{MgSO}_4$ —0,5;  $\text{NaCl}$  — 0,5;  $\text{CaCl}_2$ —0,05.

Глубинная биомасса *P. ostreatus* может быть использована для получения препарата β-глюканов, используемого в качестве функциональной добавки для обогащения молочных продуктов и других традиционных пищевых продуктов.

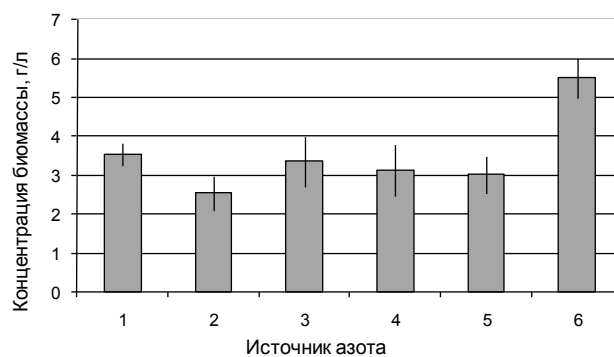


Рис. 5. Влияние различных источников азота в питательной среде на выход биомассы *P. Ostreatus*. Источник азота:

- 1 — пептон, 2 — мочеви́на, 3 —  $\text{NaNO}_3$ , 4 —  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , 5 —  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 6 — соевая мука

Fig. 5. Influence of different nitrogen source on *P. ostreatus* growing. Nitrogen source: 1 — pepton, 2 — urea, 3 —  $\text{NaNO}_3$ , 4 —  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , 5 —  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 6 — soy flour

### Литература/References

1. Shamtsyan M., et al. Hyperlipidemic and hypocholesterolic action of submerge cultured mushrooms. *Journal of Hygienic Engineering and Design*. 2014. Vol. 7. P. 96–99.
2. Bashir K. M., Choi J. S. Clinical and physiological perspectives of β-glucans: The past, present, and future. *International journal of molecular sciences*. 2017. Vol. 18. No 9. P. 1906. DOI: 10.3390/ijms18091906
3. Friedman M. Mushroom polysaccharides: chemistry and antiobesity, antidiabetes, anticancer, and antibiotic properties in cells, rodents, and humans. *Foods*. 2016. Vol. 5. No 4. P. 80. DOI: 10.3390/foods5040080
4. Kozarski M., et al. Antioxidants of edible mushrooms // *Molecules*. 2015. Vol. 20. No 10. p. 19489–19525. DOI: 10.3390/molecules201019489
5. Facchini J. M., et al. Antitumor activity of *Pleurotus ostreatus* polysaccharide fractions on Ehrlich tumor and Sarcoma 180. *International journal of biological macromolecules*. 2014. Vol. 68. P. 72–77. DOI: 10.1016/j.ijbiomac. 2014.04.033
6. Du B., et al. An insight into anti-inflammatory effects of fungal beta-glucans. *Trends in Food Science & Technology*. 2015. Vol. 41. No 1. P. 49–59. DOI: 10.1016/j.tifs. 2014.09.002
7. Llauradó G. et al. Haematopoiesis radioprotection in Balb/c mice by an aqueous mycelium extract from the Basidiomycete *Pleurotus ostreatus* mushroom. *Natural product research*. 2015. Vol. 29. No 16. P. 1557–1561. DOI: 10.1080/14786419.2014.983918
8. Radzki W., et al. Effect of processing on the content and biological activity of polysaccharides from *Pleurotus ostreatus* mushroom. *LWT-Food Science and Technology*. 2016. Vol. 66. P. 27–33. DOI: 10.1016/j.lwt. 2015.10.016
9. Феофилова Е. П. Мицелиальные грибы как источники получения новых лекарственных препаратов с иммуномодулирующей, противоопухолевой и ранозаживляющей активностями // *Имунопатология, аллергология, инфектология*. 2004. № 1. С. 27–32. [Feofilova E. P. Mycelial fungi as sources of new drugs with immunomodulatory, antitumor, and wound healing activity. *Immunopathology, allergology, infectious diseases*. 2004. No. 1. P. 27–32. (in Russian)]
10. Giavasis I. Bioactive fungal polysaccharides as potential functional ingredients in food and nutraceuticals // *Current*

- Opinion in Biotechnology. 2014. T. 26. С. 162–173. DOI: 10.1016/j.copbio. 2014.01.010
11. Gargano M. L., et al. Medicinal mushrooms: Valuable biological resources of high exploitation potential. *Plant Biosystems-An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology*. 2017. Vol. 151. No 3. P. 548–565. DOI: 10.1080/11263504.2017.1301590
  12. Antontceva E., et al. Influence of *Pleurotus ostreatus* preparations on fermentation products of lactic acid cultures. *Journal of Hygienic Engineering and Design*. 2018. Vol. 22. С. 47–52.
  13. Frioui M., et al. Rheological influence of (1-3) (1-6) mushrooms  $\beta$ -Glucan, used as flour substitution in bakery industry. Proceedings of the 45th International Symposium on Agricultural Engineering, Actual Tasks on Agricultural Engineering, 21–24 February 2017, Opatija, Croatia. — University of Zagreb, Faculty of Agriculture, 2017. P. 377–384.
  14. Jesenak M., et al. Immunomodulatory effect of pleuran ( $\beta$ -glucan from *Pleurotus ostreatus*) in children with recurrent respiratory tract infections. *International Immunopharmacology*. 2013. Vol. 15. No 2. P. 395–399. DOI: 10.1016/j.intimp. 2012.11.020
  15. Pasnik J., et al. Preventive effect of pleuran ( $\beta$ -glucan from *Pleurotus ostreatus*) in children with recurrent respiratory tract infections-open-label prospective study. *Current Pediatric Research*. 2017. Vol. 21. No 1. P. 99–104.
  16. Giavasis I., Biliaderis C. G. Microbial polysaccharides. *Functional food carbohydrates*. CRC Press, 2006. P. 178–224.
  17. Zhang H., et al. Effect of carbon source on properties and antioxidant potential of exopolysaccharides produced by *Trametes robiniophila* (Higher Basidiomycetes). *International journal of medicinal mushrooms*. 2015. Vol. 17. No 2. P. 179–186. DOI: 10.1615/IntJMedMushrooms.v17.i2.90
  18. Hoa H. T., Wang C. L. The effects of temperature and nutritional conditions on mycelium growth of two oyster mushrooms (*Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus cystidiosus*). *Mycobiology*. 2015. Vol. 43. No 1. P. 14–23. DOI: 10.5941/MYCO. 2015.43.1.14
  19. Wang L., et al. Bioprocessing strategies to improve heterologous protein production in filamentous fungal fermentations. *Biotechnology advances*. 2005. Vol. 23. No 2. P. 115–129. DOI: 10.1016/j.biotechadv. 2004.11.001

### Сведения об авторах

#### Антонцева Екатерина Валерьевна

старший преподаватель кафедры технологии микробиологического синтеза Санкт-Петербургского государственного технологического института (технического университета), 190013, Россия, Санкт-Петербург, Московский проспект, 26, antontseva@gmail.com

#### Сорокин Сергей Сергеевич

аспирант кафедры технологии микробиологического синтеза Санкт-Петербургского государственного технологического института (технического университета), 190013, Россия, Санкт-Петербург, Московский проспект, 26, sersorock@yandex.ru

#### Терентьев Данил Олегович

магистрант кафедры технологии микробиологического синтеза Санкт-Петербургского государственного технологического института (технического университета), 190013, Россия, Санкт-Петербург, Московский проспект, 26, danil.terentyev@gmail.com

#### Седых Виктория Александровна

магистрант кафедры технологии микробиологического синтеза Санкт-Петербургского государственного технологического института (технического университета), 190013, Россия, Санкт-Петербург, Московский проспект, 26, vktsedykh@yandex.ru

#### Шамцян Марк Маркович

к. т. н., доцент кафедры технологии микробиологического синтеза Санкт-Петербургского государственного технологического института (технического университета), 190013, Россия, Санкт-Петербург, Московский проспект, 26, mark.shamtsyan@yandex.ru

### Information about authors

#### Antontceva Ekaterina Valeryevna

Assistant Professor of Department of Technology of Microbiological Synthesis Saint-Petersburg State Institute of Technology, 190013, Russia, Saint-Petersburg, Moskovsky prospect, 26, antontseva@gmail.com

#### Sorokin Sergey Sergeevich

Postgraduate Student of Department of Technology of Microbiological Synthesis Saint-Petersburg State Institute of Technology, 190013, Russia, Saint-Petersburg, Moskovsky prospect, 26, sersorock@yandex.ru

#### Terentyev Danil Olegovich

Undergraduate of Department of Technology of Microbiological Synthesis Saint-Petersburg State Institute of Technology, 190013, Russia, Saint-Petersburg, Moskovsky prospect, 26, danil.terentyev@gmail.com

#### Sedykh Viktoriya Aleksandrovna

Undergraduate of Department of Technology of Microbiological Synthesis Saint-Petersburg State Institute of Technology, 190013, Russia, Saint-Petersburg, Moskovsky prospect, 26, vktsedykh@yandex.ru

#### Shamtsyan Mark Markovich

PhD, Associate professor of Department of Technology of Microbiological Synthesis Saint-Petersburg State Institute of Technology, 190013, Russia, Saint-Petersburg, Moskovsky prospect, 26, mark.shamtsyan@yandex.ru