

УДК 579.67:582.284

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ БАКТЕРИЙ-ПРОДУЦЕНТОВ ЦЕЛЛЮЛАЗ И ОРГАНИЧЕСКИХ КИСЛОТ ДЛЯ СТИМУЛЯЦИИ РОСТА МИЦЕЛИЯ ГРИБА ВЕШЕНКА

Саубенова М.Г., Кузнецова Т.В., Олейникова Е.А.

РГП «Институт микробиологии и вирусологии» КН МОН РК, Алматы, e-mail: raduga.30@mail.ru

Разработан экономически эффективный способ получения белкового кормового продукта на основе мицелия гриба вешенка путем предобработки субстрата, стимуляции роста гриба и защиты ферментации бактериями – продуцентами целлюлолитических ферментов и органических кислот. Положительный эффект достигается главным образом тем, что *B. coagulans* шт.177, не оказывая ингибирующего воздействия на грибы вешенка, является продуцентом антагонистически активных веществ, предохраняющих полученный субстрат от развития в нем посторонней микрофлоры, в том числе и плесневых грибов, что исключает необходимость стерилизации субстрата. Предложенный общедоступный способ выращивания мицелия гриба вешенка отличается экономической эффективностью при минимальных затратах труда и времени, не требует специального оборудования, легко доступен и воспроизводим в любом фермерском хозяйстве, привычен для работников, обеспечивающих подготовку кормов.

**Ключевые слова:** вешенка, предобработка субстрата, целлюлолитические бактерии, молочнокислые бактерии, пропионовокислые бактерии

## THE USE OF BACTERIA-PRODUCERS OF CELLULOSE AND ORGANIC ACIDS FOR STIMULATION OF GROWTH OF THE MYCELIUM OF THE OYSTER MUSHROOM

Saubenova M.G., Kuznetsova T.V., Oleynikova E.A.

SNE «Institute of Microbiology and Virology» SK MES RK, Almaty, e-mail: raduga.30@mail.ru

An economically effective method for obtaining protein food based on mycelium of the oyster mushroom by pretreatment of substrate, stimulation of fungal growth and protection of fermentation by bacteria-producers of cellulolytic enzymes and organic acids has been developed. The positive effect is achieved mainly by the fact that *B. coagulans* str. 177, without exerting an inhibiting effect on oyster mushrooms, is a producer of antagonistically active substances that protect the obtained substrate from the development of extraneous microflora in it, including mold fungi, which eliminates the need to sterilize the substrate. The proposed method of cultivation of the mycelium of the oyster mushroom is economically efficient with minimal labor and time costs, does not require special equipment, is easily available in any farm, and is familiar to workers providing feed preparation.

**Keywords:** oyster mushroom, pre-treatment of the substrate, cellulolytic bacteria, lactic acid bacteria, propionic acid bacteria

Одним из перспективных направлений биотехнологии в последние годы является разработка способов использования древо-разрушающих высших базидиальных грибов, способных к активному разложению лигноцеллюлозного комплекса и поэтому перспективных для получения не только пищевых (плодовые тела), но и кормовых (грибница) продуктов путем обогащения малоценных грубых растительных отходов грибным белком и легкоусвояемыми углеводами. Если спрос на культивируемые съедобные грибы продолжает на международном рынке неуклонно расти, то для использования их в качестве белково-витаминного препарата для кормовых целей требуются дополнительные исследования, имеющие целью снижение затрат на их производство и обеспечение эффективности и рентабельности этой отрасли.

В последнее время наибольшее распространение по таким показателям, как скорость роста, обильное плодоношение, вкусовые и питательные качества, разнообразие

используемых растительных субстратов, получил гриб вешенка обыкновенная, занимающий по объему промышленного производства второе место в Европе.

Целлюлозосодержащее сырье даже самого высокого качества содержит массу покоящихся форм микроорганизмов, в частности плесневых грибов, характеризующихся более высокой скоростью роста и целлюлолитической активностью, конкурирующих с высшим грибом за источники питания, что снижает выход биомассы, а зачастую подавляет его развитие [1]. Даже их незначительное размножение чревато накоплением микотоксинов. Поэтому производство высших грибов осложняется необходимостью больших затрат энергии на подготовку субстрата для их выращивания, приобретения специального дорогостоящего оборудования, применения импортных дефицитных и экологически небезопасных препаратов пестицидов и агрохимикатов [2]. Спонтанная микрофлора не может обеспечить гарантии сохранения направленности про-

цесса в производстве. Для интенсивного нестерильного культивирования вешенки обыкновенной, в частности для предобработки субстрата и защиты ферментации от развития плесневых грибов, разработаны способы с использованием микроорганизмов из рода *Bacillus* [3–5].

**Целью** данной работы была разработка экономически эффективного способа получения белкового кормового продукта на основе мицелия гриба вешенка путем снижения затрат на энергию и специальное оборудование при подготовке субстрата для его выращивания за счет устранения стадии стерилизации (пастеризации).

### Материалы и методы исследования

Объектами исследования служили целлюлолитические бактерии *Bacillus coagulans* 177 [7], а также молочнокислые *Streptococcus lactis diastaticus* и пропионовокислые бактерии *Propionibacterium shermanii* (из коллекции живых культур ИМиВ КН МОН РК).

### Результаты исследования и их обсуждение

С целью обеспечения надежности и повышения эффективности процесса подготовки субстрата для выращивания мицелия гриба вешенка в нестерильных условиях нами предложен способ его твердофазной ферментации. Способ реализуется по типу силосования путем укладки целлюлозосодержащего сырья, измельченного до 3–5 см, в полиэтиленовые емкости, его тщательной утряски с предварительным внесением бактериальной закваски и доведением общей влажности до 65–70 °С. В качестве бактериальной закваски используется культура ацидо- и термотолерантных факультативно-анаэробных целлюлозоразлагающих бактерий *Bacillus coagulans* 177. Сырьем служила пшеничная солома, а также дикорастущий камыш. Твердофазная ферментация сырья осуществляется в анаэробных условиях в течение 25–30 суток, после чего емкости вскрывают и полученный субстрат инокулируют мицелием гриба вешенка.

Инокуляцию полученного субстрата, помещенного в полиэтиленовые пакеты, грибом, выращенным на зерне пшеницы, осуществляют в количестве 3–5 % от веса готового продукта, после чего плотно упакованные пакеты завязывают, оставляя отверстие, закрытое ватно-марлевой пробкой, и выдерживают при комнатной температуре (20–22 °С) до полного обрастания субстрата мицелием, то есть получения кормового продукта, обогащенного белком гриба.

Разработанный способ не предусматривает выращивания гриба до появления плодовых тел, поскольку это более длительный

и сложный процесс, а для получения белкового корма достаточно обрастания субстрата его мицелием.

Поскольку в процессе ферментации в субстрате накапливаются органические кислоты (молочная и уксусная), перед инокуляцией его грибом вешенка проводится их предварительная нейтрализация гипсом (1,5–2,0 % от общей массы). Используемый штамм целлюлолитических бактерий является продуцентом гидролитических ферментов и изначально был предназначен для получения из целлюлозосодержащего сырья путем его силосования кормового продукта, характеризующегося высокой степенью поедаемости и переваримости сельскохозяйственными животными по ранее разработанному нами способу [6]. Это обеспечивает также большую доступность субстрата, а следовательно, более интенсивное развитие гриба вешенка на предобработанном таким образом субстрате. Положительный эффект достигается главным образом тем, что *B. coagulans* шт.177, не оказывая ингибирующего воздействия на грибы вешенка, является продуцентом антагонистически активных веществ, предохраняющих полученный субстрат от развития в нем посторонней микрофлоры, в том числе и плесневых грибов, что исключает необходимость стерилизации субстрата.

В микроаэрофильных условиях созревания силоса за 25–30 суток штамм за счет своей способности к фиксации азота атмосферы обуславливает накопление определенного количества протеина. Полученный таким образом субстрат далее используется для выращивания гриба вешенка любым известным способом.

Результаты выращивания мицелия гриба вешенка на субстрате из ферментированной пшеничной соломы показали, что полученный продукт характеризуется хорошими органолептическими показателями – приятным слегка кисловатым запахом квашеных овощей, размягченной структурой, рН среды 4,7. Содержание молочной кислоты в нем составило 0,6 %, свободной уксусной – 0,3 %, масляная кислота отсутствовала. Через 3 суток экспозиции инокулированного грибом субстрата при комнатной температуре (20–22 °С) был отмечен рост мицелия вешенки, который через 14–18 суток занимал не менее 80 % субстрата, находящегося в пакете. То есть был получен белковый корм.

Опыт работы по силосованию отходов растениеводства показал, что целлюлолитические бактерии, используемые в монокультуре, дают хорошие результаты только при использовании сырья с полноценной

спонтанной молочнокислой микрофлорой. В противном случае, поскольку они не являются продуцентами молочной кислоты, направленность процесса может быть нарушена, в результате чего полученный продукт не будет обладать нужными показателями качества и в нем могут развиваться гнилостные бактерии. Для обеспечения стабильности процесса представлялось целесообразным использовать в составе закваски молочнокислые бактерии, что позволяет получать полноценный кормовой продукт независимо от состава нативной микрофлоры.

В этом варианте опыта выращивание мицелия гриба вешенка проводили на субстрате из пшеничной соломы, ферментированной с использованием в качестве закваски целлюлолитических бактерий в смешанной культуре с молочнокислыми бактериями *Streptococcus lactis diastaticus*. Через 30 суток ферментации получили продукт, характеризующийся высокими органолептическими показателями – запахом квашеных овощей, размягченной структурой, pH 4,5. Содержание молочной кислоты – 1,0%, свободной уксусной кислоты – 0,4%, масляная кислота отсутствовала. Рост мицелия гриба (по той же схеме выращивания) начинал появляться уже через 2 суток, а полное обрастание субстрата было отмечено через 12–14 суток, то есть процесс обрастания субстрата мицелием гриба был более эффективен (на 2–4 суток меньше), чем в варианте с целлюлолитическими бактериями в виде монокультуры.

С целью углубления процесса ферментации сырья в состав закваски далее были введены пропионовокислые бактерии, утилизирующие молочную кислоту с накоплением пропионовой, менее токсичной для целлюлолитических бактерий, но так же как и их метаболиты, обладающей антифунгальными свойствами. Через 30 суток ферментации полученный продукт характеризовался хорошими органолептическими качествами – запахом квашеных овощей, размягченной структурой, pH среды 4,5. Содержание молочной кислоты в нем составило 0,6%, свободной уксусной – 0,2%. Масляная кислота отсутствовала. В нейтрализованном субстрате, перенесенном в полиэтиленовые пакеты и инокулированном мицелием гриба вешенка, также выдержанном при температуре 20–22 °С, рост мицелия начинал проявляться уже через 2 суток. Через 10–12 суток экспозиции было отмечено 100%-ное обрастание субстрата. Таким образом, эффективность процесса обрастания субстрата мицелием гриба при

использовании полиштаммовой закваски была более высокой.

Эффективность процесса предобработки целлюлозосодержащих отходов повышается, в результате чего увеличивается доступность для вешенки источников углерода и энергии, а также сохранность полученного кормового продукта, использование которого в качестве субстрата для выращивания вешенки не требует стерилизации. Немаловажным обстоятельством при этом является тот факт, что пропионовокислые бактерии обогащают корм витамином B<sub>12</sub>. Поэтому в качестве оптимального следует считать вариант с использованием в качестве закваски кроме целлюлолитических, также молочнокислых и пропионовокислых бактерий, входящих в состав биопрепарата «Казбиосил».

При использовании для производства кормового протеина другого сырья, в частности камыша, силосованного с использованием в качестве закваски целлюлолитических бактерий как в моно-, так и в смешанной культуре целлюлолитических с молочнокислыми и пропионовокислыми бактериями, были получены аналогичные результаты. Обрастание субстрата мицелием начиналось уже на вторые сутки после инокуляции и к концу 10 суток достигало 100%. Так же как и при использовании в качестве сырья соломы, эффективность выращивания мицелия гриба на субстрате из ферментированного камыша, как по скорости, так и по степени обрастания субстрата была выше при использовании полиштаммовой закваски.

Все биопрепараты для твердофазной ферментации (силосования) целлюлозосодержащего сырья, используемые в разработанном нами способе предобработки субстрата, производятся на опытно-промышленной установке РГП «Института микробиологии и вирусологии» КН МОН РК. Способ защищен патентом Казахстана [7], а также принята заявка на получение патента РФ [8].

### Заключение

Таким образом, предложен общедоступный способ выращивания мицелия гриба вешенка на предобработанном микроорганизмами целлюлозосодержащем субстрате, отличающийся экономической эффективностью при минимальных затратах труда и времени, не требующий специального оборудования, легко доступный и воспроизводимый в любом фермерском хозяйстве, привычный и традиционный для работников, обеспечивающих подготовку кормов. Полученные данные убедительно свиде-

тельствуют о возможности эффективной реализации генетического потенциала высших грибов использованием ассоциативных микроорганизмов.

#### Список литературы

1. Алексеева К.Л. Научные основы культивирования и защиты съедобных грибов от вредителей и болезней // Дисс...докт. биол. наук 2002, Москва код спец. 06 01 06, 06 01 11. – Защита растений. – 320 с.
2. Бисько Н.А., Билай В.Т. Термофильные бактерии и элективность субстрата для выращивания съедобных грибов рода вешенка // Школа грибоводства. – 2006. – № 5. – С. 49–53.
3. Чеботарь В.К., Завалин А.А., Кипрушкина Е.Н. Эффективность применения биопрепарата экстрасол. – М.: Издательство ВНИИА, 2007. – 229 с.
4. Анненков Б., Азарова В. Использование *Vacillus cecgeus* в создании качественных избирательных субстратов

для интенсивного культивирования вешенки обыкновенной // Овощевод. тепличное х-во. – 2012. – № 5. – С. 39–48.

5. Инновационный патент РК 79878 Штамм факультативно-анаэробных ацидо- и термотолерантных целлюлолитических бактерий *Vacillus coagulans* 177 для биоконверсии целлюлозосодержащих отходов в кормовой продукт / Саданов А.К., Саубенова М.Г., Олейникова Е.А. 2012. – Оpubл. 13.12.2012.

6. Рекомендации. Технология уборки и микробиологической обработки соломы Мин. Сельхоз. и продовольствия РК. Главное управление науч.-техн. Прогресса. – Алма-Ата: изд-во Кайнар. – 1992.

7. Инновационный патент РК 28883. Способ подготовки субстрата для выращивания мицелия гриба вешенка / Саданов А.К., Саубенова М.Г., Кузнецова Т.В., Сулейменова Ж.Б. 2013. – Оpubл. 15.09.2014. – бюл. № 9.

8. Заявка № 201500005/28 Способ подготовки субстрата для выращивания мицелия гриба вешенка / Саданов А.К., Саубенова М.Г., Кузнецова Т.В., Сулейменова Ж.Б. 01 ноября 2016.