

Украинская Академия аграрных наук
Институт винограда и вина "Магарач"

Викторов Александр Сергеевич

УДК: 663.26:636.087.24

РАЗРАБОТКА И ОСВОЕНИЕ БИОТЕХНОЛОГИИ
ПРОИЗВОДСТВА КОММЕРЧЕСКОГО МИЦЕЛИЯ
ВЕШЕНКИ ОБЫКНОВЕННОЙ НА ОСНОВЕ
ВИНОГРАДНЫХ ВЫЖИМОК И ЛОЗЫ

03.00.23 - Биотехнология

Автореферат

диссертация на соискание ученой степени
кандидата технических наук

Ялта 1994

AB 37.480

Диссер.ацционная работа является рукописью.

Работа выполнена в Институте винограда и вина "Магарач", в условиях опытно-производственной базы "Магарач", агропромышленных предприятий республики Крым.

Научные руководители: доктор технических наук, профессор,
чл.-корр. УААН Ежов В.Н.
кандидат технических наук,
старший научный сотрудник Баранова С.В.

Официальные оппоненты: доктор технических наук, профессор
Бурьян Н.И.
кандидат технических наук Осовик А.Н.

Ведущая организация: Институт ботаники им. Н.Г.Холодного
НАН Украины

Защита состоится "26" декабря 1994 г. в 13 часов
на заседании специализированного совета Д.020.58.02 при Институте
винограда и вина "Магарач" по адресу: 334200, Крым, г.Ялта,
ул.Кирова, 31.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ИВиВ "Магарач".
Автореферат разослан "25" ноября 1994 г.

Ученый секретарь специализированного
совета, к.т.н.

Буравлева Л.И.

ЛННБ України ім.В.Стефаніка



00777293 (Z) ЛННБ ім. В. Стефаніка
АН України

I. Общая характеристика работы

Актуальность работы. Исходя из современных тенденций развития высокоэффективных перерабатывающих технологий в агропромышленном секторе Украины, актуальной задачей виноделия является создание ресурсосберегающих технологий безотходной переработки винограда. Анализ существующих способов переработки вторичных ресурсов отрасли показал, что в последние годы осуществляется переход от традиционных подходов к утилизации (на примере виноградной выжимки по схеме "этанол - БКИ-кормовая мука") к микробиологической биотрансформации лигноцеллюлозного материала в направлении обогащения его белком кормового и пищевого назначения. Созданию биотехнологий производства обогащенных белком продуктов из лигноцеллюлозных отходов виноградарства и виноделия посвящены работы Микаладзе (1965), Ганбарова (1985), Касим-заде (1987), а также специалистов ИВиВ "Магарач" и Института ботаники АН Украины: Ежова, Данияляка, Дуд, Бисько, Гишвили, Барановой, Клечак и др. (1985-1995). Однако существенным фактором сдерживающим широкое освоение этих разработок, является необходимость обеспечения технологий качественным мицелием базидиальных грибов, предпочтительно адаптированным к субстрату для плодоношения.

Цель и задачи исследований. Целью исследований явилось обоснование способа и оптимизация режимов биотехнологии производства посевного мицелия культуры Вешенки на основе использования виноградной выжимки и лозы, разработка соответствующей нормативно-технической документации и освоение технологии в промышленных условиях.

Для достижения поставленной цели решались следующие задачи:

- обоснование принципиальной возможности получения посевного мицелия Вешенки обыкновенной на твердых отходах виноградарства и виноделия;

- оптимизация состава субстрата для получения посевного мицелия с позиций удельной скорости роста культуры, ее стабильности при

длительно применение и способности к репродуктивности на стадии получения плодовых тел;

- формирование коллекции штаммов рода *Pleurotus*, предназначенных для получения плодовых тел, использование комплексных культур, получение опытных партий посевного мицелия на их основе;

- разработка и аппаратурное оформление биотехнологии производства посевного мицелия Вешенки обыкновенной на основе комбинированного субстрата из выжимок и лозы винограда;

- разработка пакета нормативно-технической документации на производстве посевного мицелия Вешенки обыкновенной, осуществление промышленного освоения данной биотехнологии.

Научная новизна. В результате экспериментальных исследований и их промышленного освоения впервые установлена принципиальная возможность производства посевного мицелия Вешенки обыкновенной (*Pleurotus ostreatus*) на композиционном субстрате, включающем виноградную лозу и выжимку. Явлен эффект адаптации культуры к сложному лигноцеллюлозному субстрату, выражающийся в сокращении сроков ее проращивания и повышения выхода плодовых тел грибов в условиях их роста на адекватном посевному мицелию субстрате. Установлен эффект стабилизации продуктивных свойств культуры Вешенки при ее росте и хранении на субстрате из выжимки и лозы винограда, выражающийся в продлении гарантийного срока хранения мицелия от I-го (зерно) до 3-х месяцев. Экспериментально доказана эффективность клоновой селекции штаммов Вешенки, осуществляемой методом возврата культуры с плодовых тел в вегетативную форму.

Практическая значимость. Сформирована коллекция базидиомицетов Вешенки, в т.ч. штаммов клоновой селекции, адаптированных к выжимке и лозе винограда. Разработана биотехнология производства посевного мицелия Вешенки обыкновенной на основе использования выжимки и лозы винограда. По результатам разработки в промышленных условиях ОПБ

"Магарач" введен в эксплуатацию цех посевного мицелия Вешенки обыкновенной проектной мощностью 50 тыс.литров в год, выдано техническое задание на организацию аналогичных производств мощностью 30-60 тыс. литров в Киевской и Полтавской обл., а также в Узбекистане. Технологии производства посевного мицелия Вешенки обыкновенной сопровождается утвержденной документацией: технологической инструкцией, техническими условиями, действующими по Республике Крым. Качество получаемого посевного мицелия оценено в промышленных условиях, при производстве грибов в условиях государственных (с/зв "Заветное", "Нижегородский", Симферопольская ТЭЦ) и кооперативных предприятиях в городах Севастополе, Керчи, Симферополе, Ялте. Общее производство посевного мицелия Вешенки обыкновенной на основе выжимки и лозы винограда составило за 1991-1993 гг. около 50 тыс.литров. Фактический экономический эффект составляет в ценах на 01.10.1994 г. 40 тыс.крб. на 1 м производимого продукта.

Апробация работ. Основные положения работы рложены в заседаниях секции ученого совета ИВиВ "Магарач" по переработке винограда, III Всесоюзном совещании по проблемам культивирования съедобных грибов (Россия, Пушкино, 1991 г.), Республиканской конференции по вопросам разработки и внедрения высокоэффективных технологий в отраслях АПК (Киев, 1991), Всесоюзной конференции "Достижения биотехнологии - агропромышленному комплексу" (Черновцы, 1991), IV научно-практической конференции по промышленному культивированию съедобных грибов (Донецк, 1993).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 7 печатных работ. Выдан патент Украины на изобретение "Способ получения посевного мицелия базидиомицетов" № 3167 от 26.II.93 г.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 116 страницах машинописного текста, содержит 19 таблиц и 6 рисунков и состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной час-

ти, список литературы и приложений по материалам испытаний и внедрения.

На защиту выносятся следующие основные положения:

- экспериментальные данные о потреблении компонентов углеродного питания грибами Вешенка в условиях их культивирования на многокомпонентном субстрате, включающем виноградную лозу и выжимку;
- эффект адаптации вегетативной формы культуры Вешенка к субстрату на стадии её получения с использованием аналогичного производства грибов источника умеренного питания;
- эффект стабилизации репродуктивных свойств мицелия Вешенки в условиях его получения на лигноцеллюлозном субстрате с повышенным содержанием лигнина и лигниноподобных веществ;
- технология производства посевного мицелия Вешенки обогрившей на виноградной лозе и выжимке и ее аппаратурное оформление.

2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

2.1. Объекты и методы исследований

В процессе проведения экспериментальных исследований использовали: выжимку виноградную после прессования, сладкую и сброженную, высушенную; солому злаковых культур и подсолнечную лузгу (контроль); штаммы высших базидиальных грибов рода *Pleurotus* из коллекции Института ботаники НАН Украины, а также промышленные культуры.

Для введения в питательную среду промежуточного и основного культивируемых, лозу предварительно измельчали до частиц размером 1-3 см. Выжимку и лозу перед посевом культуры предварительно замачивали в воде (12-16⁰, гидромодуль 4-5, 12-16 час), избыток воды сливали, субстрат расфасовывали в стеклянную тару емкостью 1,0 (промежуточно) и 2,0-3,0 дм³ (основная культура), из расчета заполнения объема на 50-60 %; тару плотно закрывали ватной пробкой или пищевой фольгой. Стерилизацию субстрата осуществляли автоклавированием при

1,3...-1,5 атм в течение 2-3 часов. После охлаждения субстратов и их контрольной выдержки (3-5 суток) осуществляли стерильную инокуляцию маточной (с чашки Петри) и промежуточной (из сосудов емкостью 1,0 дм³) культурой, из расчета 1...-10 % объемных. Культивирование промежуточного и основного продукта осуществляли в стерильных условиях при температуре 24-26 °С в течение 12-20 суток; через 6-10 суток осуществляли интенсивное перетряхивание инокулята. Исходные компоненты субстрата, посевной мицелий, а также произведенные на их основе грибы, после высушивания и измельчения подвергали аналитическим исследованиям.

Массовую концентрацию полисахаридов и лигноподобных веществ определяли после двухступенчатого кислотного гидролиза фиксированных навесок исследуемых образцов с последующим определением редуцирующих углеводов в гидролизате фенол-серной реакцией (Ежов, 1988).

Определение массовой концентрации липидов осуществляли весовым методом, основанным на экстракции липидов из навески хлороформ-метанолом, с последующей очисткой экстракта от нелипидных примесей (Гасанов, 1990). Определение массовой концентрации жирных кислот выполняли газохроматографическим методом после перевода жирных кислот в метиловый эфир по прописи Беленко, Датунашвили, Циденцамбаева (1984).

Определение массовой концентрации общего белка (так называемого "сырого протеина") осуществляли в высушенных образцах с фиксированной влажностью, исходя из концентрации элементарного азота, анализируемого методом микрокельдыала (Гасанов, 1990). При пересчете массовой концентрации азота на содержание белка использовали коэффициент 4,28, принятый для исследования белков грибов (Дудка, Вассер и др., 1983). Анализ аминокислотного состава белка проводили после гидролиза фиксированной навески 6N соляной кислотой при помощи автоматического анализатора аминокислот ААА - 881.

Определение массовой концентрации витаминов В₁, В₂, В₆ осуществляли в соответствии с фармакопейной статьей ФС-4.2 (МЗ СССР, 1973).

Экспериментальные исследования в зависимости от прописи анализа и требований математического планирования осуществлялись в 3-6 повторностях, полученные данные обрабатывали с помощью пакета программы "Статистика".

В экспериментах по оптимизации условий культивирования базидиомицетов на выжимке, лозе и их композиции использовали матрицу факторного эксперимента (Менчер, Земшман, 1990); регрессионный и корреляционный анализ результатов осуществляли на "УЭМ" - совместимой ПЭМ класса "PC/AT-386".

2.2. Характеристика субстратов для производства мицелия

Экспериментальные данные, характеризующие химический состав перспективных субстратов для производства мицелия, приведены в табл. I.

Таблица I

Общий химический состав субстратов для посевного мицелия Вешенки

Наименование субстрата	Общий азот, %	Сырой протеин, %	Полисахариды			Дигидрат, %	Массовая доля золы, %
			Сумма	ЛГ	ТГ		
1. Виноградная лоза	0,44	2,78	40,09	21,43	18,67	33,20	3,75
2. Виноградная выжимка	0,42	2,64	28,95	15,89	13,05	48,5	6,32
3. Отходы переработки подсолнечника - лузга	0,59	3,68	50,29	25,22	25,07	40,70	5,30
4. Виноградная выжимка:							
лоза							
I:I	0,43	2,71	34,22	18,84	15,38	40,20	5,02
I:3	0,44	2,74	37,24	20,06	17,18	44,50	4,38

Анализ данных позволяет заключить, что отходы переработки винограда существенно уступают подсолнечной лузге по содержанию и точности

ков азотистого и углеродного питания; при этом наблюдается ошутимая разница в массовой концентрации полисахаридов и лигноподобных веществ между выжимкой и лозой. В композиционном субстрате выжимка - лоза (1:3) показатели содержания полисахаридов и лигнина несколько выравниваются.

Последующий анализ аминокислотного состава изучаемых субстратов позволил выявить, что виноградная лоза крайне обеднена свободными аминокислотами (34,8 мг/100 г), тогда как в выжимке и лозе их содержание сопоставимо (106,8 и 94,9 мг/100 г соответственно).

Проведенный анализ свидетельствует о принципиальной возможности использования виноградных выжимок и лозы в качестве источника углеродного питания при культивировании мицелия базидиальных грибов, обладающих высокой активностью целлюлаз и монофенол-монооксигеназы. Об этом же говорят экспериментальные данные по выращиванию плодовых тел Вешенки обыкновенной с использованием посевного мицелия на основе выжимки и лозы.

2.3. Получение опытных партий грибов и их характеристика

В табл.2 приведена характеристика плодовых тел Вешенки обыкновенной, выращенных с применением классического и экспериментального посевного мицелия на соломе, а также композиции из лозы и выжимки.

Как видно из табл.2, плодовые тела, выращенные с применением опытного посевного мицелия на разных субстратах, значительно превышают контрольный вариант по всем показателям. В целом все плодовые тела имеют высокий индекс питательной ценности и соответствуют существующим нормам относятся к ценным пищевым продуктам (Покровский, 1975). При этом показателен тот факт, что применение опытного композиционного субстрата как на стадии мицелия, так и в качестве субстрата для плодоношения резко повышает питательную ценность грибов и уровень таких составляющих, как белок, незаменимые аминокислоты, липиды.

Характеристика плодовых тел Вешенки обыкновенной

Показатели	: Солома пшеницы		: Виноградная выжимка и лоза (1:1)	
	: мицелий : зерновой : (контроль)	: мицелий : выжимочный	: мицелий : зерновой : (контроль)	: мицелий : выжимочный
Общий азот, %	1,2-4,3	5,1-7,5	4,7-6,1	6,3-8,8
Сырой протеин, %	7,5-26,9	31,9-46,9	29,4-38,8	39,4-55,0
Истинный белок, %	5,3-18,8	22,3-32,8	20,6-27,2	27,6-38,5
Содержание аминокислот в белке, г/100 г	3,4-12,3	17,7-21,2	12,3-15,2	15,6-22,3
В том числе незаменимые аминокислоты, г/100 г	0,8-5,0	8-10,5	5-7,0	8-13
Сырой жир, %	0,1-0,3	0,4-0,9	1,2-1,4	3,0-3,7
Индекс питательной ценности плодовых тел, И ^ж	2,1-15,6	19,7-28,9	16,3-28,9	27,3-37,7

* Формула для расчета:

$$И^{\#} = \frac{БАА \times \text{содержание истинного белка, \%}}{100} \quad (\text{Crisan, Sands, 1978})$$

$$БАА = \frac{\text{сумма незаменимых аминокислот}}{\text{незаменимые аминокислоты в белке ФАО}}$$

2.4. Обоснование состава композиционного субстрата для производства посевного мицелия

Предварительные опыты по установлению влияния степени измельчения лозы на скорость зарастания мицелия показали, что в пределах размеров частиц 7-0,5 см читаемость зарастания сокращается с 30 до 10 суток; исходя из этого в дальнейших экспериментах использовалась лоза с размерами частиц 0,5-1 см.

Последующие опыты позволили установить, что качество получаемого мицелия, выражающееся в удельном выходе плодовых тел, в значительной степени зависит от выбора штаммов; при этом коллекционные штаммы, хранящиеся в условиях музея чистых культур, уступают промышленным культурам на 20-30 %.

II

Что касается оптимального соотношения лозы и выжимки в комплексном субстрате, то полученные данные позволяют констатировать, что лучшие результаты достигаются при соотношении названных компонентов 3:1 (табл.3). В этом варианте длительность роста как промежуточной, так и основной культуры составляет 7 суток.

Таблица 3

Выбор оптимального состава субстрата для коммерческого мицелия

компонент субстрата, %		: Длительность роста, сутки	
выжимки	: лоза	: пределы	: средние
	: (0,5-1,0 см)		
50	50	7-9	8
25	75	6-8	7
75	25	10-14	12
100	-	14-18	16
-	100	10-12	11

В указанном варианте достигается также максимальный выход плодовых тел. Показательным является и тот факт, что предварительное экстрагирование виноградной выжимки ферментным препаратом с целью извлечения углеводов и виннокислых соединений (Садыхов, 1982) способствует повышению скорости роста мицелия.

2.5. Обоснование режимов подготовки субстрата перед его инокуляцией

Как показали наши исследования и анализ литературных данных, виноградная выжимка и лоза в значительной степени инфицированы микромицетами рода *Aspergillus*, *Penicillium*, *Aspergillus Mucor* и др. Очевидно, что исследуемые субстраты в сравнении с зерновыми культурами более инфицированы и требуют тщательной подготовки перед посевом как маточной, так и промежуточной культуры.

В таблице 4 представлены данные по оптимизации режимов подготовки субстрата перед инокуляцией, осуществленной в соответствии с планом эксперимента Хартли-Н⁵. При обработке полученных результатов

Выход грибов в зависимости от режимов подготовки субстрата для посевного мицелия (план эксперимента Хартли-Н⁵)

Номер опыта в матрице	Выход грибов, % : к абс.-сухой : биомассе	Номер опыта : в матрице :	Выход грибов, % : к абс.-сухой : биомассе
I	I5	I5	I3
2	I3	I6	I9
3	I2	I7	25
4	I3	I8	2I
5	I2	I9	20
6	I8	20	28
7	I6	2I	24
8	I4	22	24
9	I2	23	26
IO	I2	24	3I
II	I8	25	25
I2	I3	26	I2
I3	I6	27	35
I4	I2		

установлено, что выход грибов в зависимости от соотношения выжимки и лозы в субстрате (x_1), гидромодуля замачивания (x_2), длительности замачивания (x_3), температуры замачивания (x_4) и длительности автоклавирования при давлении I,7 атм (x_5) описывается уравнением:

$$\begin{aligned}
 Y = & 27,18 + 1,95 \cdot x_1 - 0,8 \cdot x_2 + 0,6 \cdot x_3 + 0,351 \cdot x_4 + \\
 & + 1,95 \cdot x_5 + 0,756 \cdot x_1 \cdot x_3 - 0,378 \cdot x_1 \cdot x_4 + \\
 & + 0,378 \cdot x_1 \cdot x_5 + 0,756 \cdot x_4 - 0,126 \cdot x_2 \cdot x_5 - \\
 & - 0,63 \cdot x_3 \cdot x_5 - 0,252 \cdot x_4 \cdot x_5 - 24,8 \cdot x_1^2 - 0,8 \cdot x_2^2 - \\
 & - 0,8 \cdot x_3^2 + 4,1 \cdot x_4^2 - 6,3 \cdot x_5^2 .
 \end{aligned}$$

Анализ уравнения подтвердил предпочтительность повышенной удельной доли лозы в составе субстрата, оптимальность гидромодуля в пределах 3,0-4,0, температуры замачивания в пределах 16-20 град.С и минимальную длительность автоклавирования при I,7 атм в течение 2,5 часов.

2.6. Обоснование режимов инокуляции и проращивания субстрата

Общепринятые стадии производства коммерческого мицелия предусматривают, помимо подготовки субстрата, инокуляцию и рост промежуточной культуры, последующий ее пересев и рост основной культуры. Важным фактором при этом является не только стерильность субстрата и непосредственно процесса проращивания, но и доза посевного материала. Как показали исследования, при пересеве культуры с чашки Петри оптимальная норма расхода составляет 1 чашку на четыре 1 дм³ бутылки (табл. 5, рис. 1). Что касается дозы промежуточной культуры, то она составляет одну бутылку вместимостью 1 дм³ на 3-5 баллонов вместимостью 2,0 дм³ или 3 баллона вместимостью 3,0 дм³.

Последующие исследования показали, что с позиций технологичности процесса (обеспечение условий нормального перемешивания культуры с субстратом, наличие необходимого воздухообмена через ватную пробку, присутствие проросшей культуры при выгрузке) уровень заполнения тары субстратом должен составлять 50-60 % от её объема.

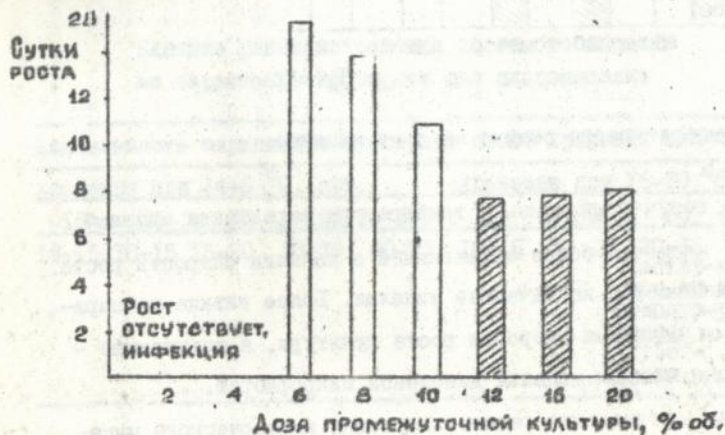


Рис. 1. Определение дозы промежуточной культуры

Рост культур базидиомицетов в зависимости от доз посевного мицелия

Расход культур при пересеве									
I чашка Петри на баллоны	: I баллон (1,0 дм ³) на баллоны, шт.								
	1,0 дм ³ , шт.			2,0 дм ³			3,0 дм ³		
	4	: 8	: 12	: 3	: 5	: 8	: 3	: 5	: 8
продолжительность, сут.	7-9	15-18	15-18, плесневая инфекция	8-10	8-10	12-20, инфекция	8-10	12-20	более 20, инфекция

На рис.2 приведены данные о росте промежуточной и основной культуры в зависимости от температуры процесса.



Рис.2. Влияние температурного режима на рост мицелия

Как видно из полученных данных, температура зарастания мицелия в пределах 20-24° является более эффективной с позиции скорости роста и положительно сказывается на качестве мицелия. Более низкие температуры сопровождаются падением скорости роста культуры, а повышенные - повсеместным инфицированием мицелия плесневой микрофлорой.

Таким образом, оптимальные режимы получения коммерческого мицелия предполагают: 1) использование композиционного субстрата выжимки

(после обработки пектолитическим ферментным препаратом) - лозы (измельчение до частиц 0,5-1 см), при соотношении 1:1 + 1:3; 2) замачивание субстрата водой при гидромодуле 3,0-4,0 и температуре 20 ± 4 °C в течение 12-24 час; 3) слив избыточной воды, корректировку (при необходимости) pH среды в пределах 5,0-6,0 ед.; 4) расфасовку субстрата в стеклянные баллоны вместимостью 1,0 и 2-3 дм³, из расчета 50-60% - ного заполнения; 5) автоклавирование субстрата при $1,3-1,7$ атм в течение 2-3,5 ч, охлаждение до 25-26 °C; 6) стерильный пересев чистой культуры Вешенки с шляпок Петри на объем 1,0 дм³ из расчета 1 чашка на 4 баллона; 7) рост промежуточной культуры при 20-24 °C в течение 8-10 сут., при одном-двух встряхиваниях; 8) стерильный пересев промежуточной культуры на основную среду из расчета один баллон вместимостью 1,0 дм³ на 3-5 баллонов емкостью 2,0 дм³ или 3 баллона емкостью 3,0 дм³; 9) рост основной культуры при 20-24 °C в течение 6-10 суток при 1-2 встряхиваниях; 10) хранение коммерческого мицелия при температуре $+4 \pm 6$ °C не менее 1 недели перед реализацией.

Что касается последнего показателя, то оптимальность избранного режима хранения подтверждается данными таблицы 6.

Таблица 6

Влияние режимов хранения посевного мицелия на застарание субстрата для плодоношения

Длительность застарания субстрата после хранения мицелия (суток)									
хранение при $+4 \pm 6$ °C, сут.					хранение при 15-20 °C, сут.				
15	25	60	120	180	15	30	60	120	180
10-15	10-15	15-20	20-25	20-25	10-15	12-18	20-25	28-30	Полное частич- сильное подав- ное ин-инфици- рование роста мицелия

2.7. Формирование и хранение коллекции культур грибов при ИВЯВ "Магарач"

Важным этапом технологии производства плодовых тел грибов на лигноцеллюлозных отходах виноградарства и виноделия является формирование и поддержание коллекции высокопродуктивных штаммов. Такая коллекция была сформирована в период освоения технологии получения грибов Вешенки в Крыму в течение 1990-1993 гг. Осуществлено первичное накопление музейных и производственных штаммов культур Вешенки, их выведение в чистую культуру и дальнейшая селекционная работа, которая предполагала отбор в условиях производства плодовых тел с повышенным размером или биомассой и возврат мицелия из споровой формы на чашки с агар-агаром (метод "клоновой селекции"). В результате проведенной работы в эксперименте находилось свыше 30 штаммов, 19 из которых после произведенной проверки введены в коллекцию музея грибов и активно используются в производстве в зависимости от времени года и конкретных условий заказчика. Следует отметить, что имеющиеся культуры базидномицетов рода Вешенки сильно различаются по скорости роста и общей длительности получения мицелия (табл.7).

Кроме того, если постоянно поддерживать культуру промежуточного и коммерческого мицелия из маточной (коллекционной), на 4-5 цикле такого воспроизводства продуктивность культуры и урожай грибов резко снижаются. Так, данные табл.7 свидетельствуют об относительно хорошем росте только одного из 3 первоначально введенных в коллекцию штаммов - под № 15. Штамм 4, характеризующийся ослабленным ростом, был возвращен в культуру с плодовых тел, отдельно - со шляпки и ножки, при этом улучшение показателей роста дали плодовое тело в целом и шляпка. При возврате клона в маточную культуру (пробирка) и следующем выведении на чашку, он дал очень хороший показатель скорости и интенсивности разрастания.

Скорость роста и длительность производства
промежуточного мицелия

Коллек- ционный номер штамма	:Продолжительность: получения проме- жуточной культуры сут.	:Размер зоны зараста- ния, мм	:Продолжи- тельность: получения основной культуры, сут.	Примечание
I5	I2	48	II	Рост с сильным опущением
I4	I5	36	I3	Рост неравномерный, раз- брос по чашкам
4	I6	32	I2	Рост неравномерный
4ж	II	48	8	Переведен на чашку с плодового тела
4ж	II	52	8	Переведен на чашку со шляпки гриба
4жж	9	60	8	Рост с сильным опущением
6ж	9	58	7	"--"
6ж	8	60	8	"--"

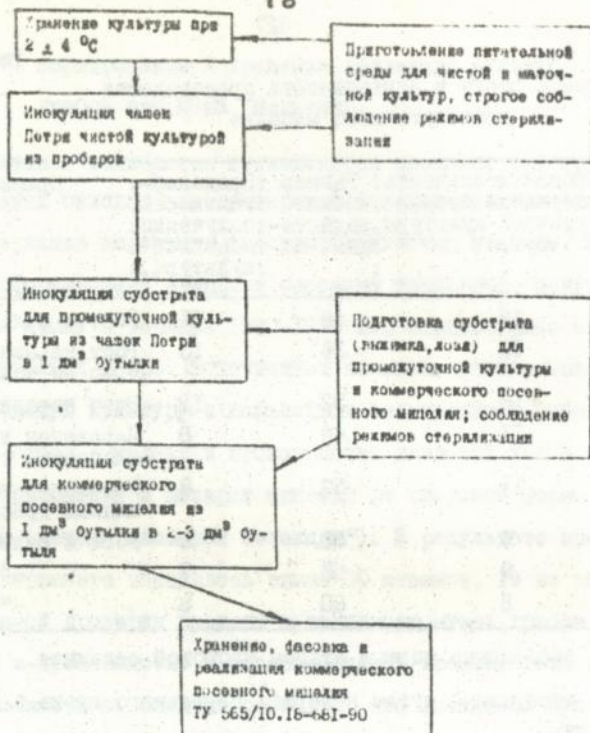
* Штаммы, отобранные первым этапом клоновой селекции.

жж Штамм, отобранный путем возврата первичного клона в маточную культуру.

Поддержание коллекции рода *Pleurotus* при ИВиВ "Магарац" осу-
ществляется путем ежегодного 2-х разового посева музейной культуры
на агар-агар. Дальнейшая работа с культурами предполагает их обнов-
ление после 6-7 циклов воспроизводства, путем отбора соответствующих
плодовых тел и пассирования проросшего мицелия до получения чистой
культуры.

2.8. Технология получения посевного коммерческого мицелия
Вешенки на выжимке и лозе винограда и ее освоение

По результатам многочисленных лабораторных исследований и их
производственной апробации разработана кооперационная блок-схема и
оптимизированы режимы подготовки субстрата и посевного мицелия Вешенки
на виноградной выжимке и лозе (рис.3, табл.8).



Производство коммерческого посевного мицелия включает в себя этапы подготовки питательных сред для маточной, промежуточной и коммерческой культур, стерильные посевы коллекционных штаммов по схеме "пробирка-чашка-литровик-2-3-литровик" и рост культур при 20-24 °С (на этапах промежуточной и конечной - с одним-двумя перетряхиваниями). Для осуществления режима: стерилизации среды и субстрата разработаны эскизные чертежи для проходного автоклава и осуществлено его изготовление в мастерских ОПБ ИВиВ "Магарач".

Как в случае промежуточной культуры, так и в случае коммерческого мицелия на первом этапе осуществляется замачивание субстрата в ваннах водопроводной водой (12-24 час), слив избытка воды и расфасовка в 1 дм³ (промежуточная культура) или 2-3 дм³ стеклянные баллоны (коммерческий мицелий), при насыпном объеме не более 60 % от объема посуды. Субстрат автоклавируется при 1,7 атм в 2,5 ч; после охлаждения стерильно засеивается (норма: 1 чашка на четыре 1 дм³ баллона

Основные режимы и этапы получения посевного мицелия
на различных субстратах

Наименование операций :	Зерно (контроль)	Отходы переработки винограда	
		: выжимка	: выжимка + лоза (1:3)
Замачивание в водопроводной воде при 16-24 °С	12 ч	12-24 ч	12-24 ч
Кипячение	20 мин	-	-
Слив воды	30 мин	30 мин	30 мин
Просушивание субстрата	40 мин	-	-
Расфасовка в тару 1,0 дм ³ (промежуточная культура)	550-650 см ³	500-600 см ³	500-600 см ³
Расфасовка в тару 3,0 дм ³	1650-1950 см ³	1500-1800 см ³	1500-1800 см ³
Автоклавирование, ч			
при 1,7 атм	-	2,5	2,5
I, I, 2 атм	2	-	-
Засев культуры и ее зарастание при 20-24 °С (в сутках)			
а) промежуточная культура	8-10	12-16	8-10
б) основная культура	8-10	12-16	8-10

промежуточной культуры или один 1 дм³ баллон на 3-5 баллонов коммерческого мицелия). Рост мицелия при 20-24 °С осуществляется в обоих случаях в течение 8-10 суток при одном-двух встряхиваниях. Полученный коммерческий мицелий хранят при температуре +4-6 °С до 6 месяцев.

Приведенные режимы и технологическая схема реализованы в условиях цеха коммерческого мицелия при ОПБ "Магарач", который производит в 1990-1993 гг. ежегодно 12-15 тыс. литров продукта.

По результатам выполненной работы разработана технологическая инструкция по производству посевного мицелия Вешенки обыкновенной на отходах переработки винограда, а также технические условия на коммерческий мицелий Вешенки обыкновенной. Качество мицелия положительно оценено в процессе производства мицелиев грибов в условиях совхоз/заводов "Заветное", "Нижегородский", кооператива "РТВ" (г. Севастополь).

кооператива "Сантус" (г. Керчь), арендного предприятия при д/о "Гурзуф", Симферопольской ТЭЦ.

На основании опыта эксплуатации цеха мицелия при ОИБ "Магарач" выдано техническое задание и разработана техдокументация на строительство аналогичного комплекса при в/о "Янгиаль" (Узбекистан) и агрофирме "Росток" (Полтавская обл.), мощностью соответственно 30 и 60 тыс. литров мицелия в год.

3. В Ы В О Д Ы

1. Экспериментально обоснована возможность получения коммерческого посевного мицелия Вешенки на композиционном субстрате из виноградной выжимки и лозы при их соотношении 1:3. Эффективность получения мицелия подтверждена в сравнении с классическим зерновым мицелием по показателям скорости роста, срока репродуктивности и выхода грибов из единицы растительного сырья.

2. На основе экспериментальных данных обоснованы режимы подготовки композиционного субстрата из выжимок и лозы в качестве среды для роста базидиальных культур.

3. Экспериментально обоснованы и апробированы в промышленных условиях выбор штаммов, а также основные режимы посева и выращивания промежуточной и коммерческой культур гриба Вешенки.

4. Экспериментально отобраны 4 штамма для получения плодовых тел грибов и 5 штаммов для производства кормового белкового продукта, научно обоснованы и апробированы условия их промышленного внедрения.

5. Создана коллекция базидиальных грибов при ИВИВ "Магарач" и отработаны способы улучшения их репродуктивных свойств на отходах переработки винограда после 5-7 циклов использования гриба в схеме "коллекция - посевной мицелий".

6. Разработаны и в промышленных условиях реализованы ТИ по производству коммерческого посевного мицелия Вешенки и ТУ на готовую продукцию.

7. Осуществлен ввод в эксплуатацию цеха коммерческого мицелия Вешенки, выращиваемого на нетрадиционном субстрате - композиция виноградно-градной выжимки и лозы.

Список работ, опубликованных по материалам диссертации

1. Ежов В.Н., Баранова С.В., Викторов А.С., Скорикова Т.К., Мартыненко Л.И., Ананченко Г.М., Черноокова Т.В. Способ получения посевного мицелия базидиомицетов // Патент Украины. № 3167 от 26.II.93 г.
2. Ежов В.Н., Баранова С.В., Викторов А.С., Скорикова Т.К., Кольцова И.Ф., Дарашанов М.Г. Технологический регламент производства грибов Вешенки обыкновенной (*Pleurotus ostreatus*) при интенсивном способе выращивания // Депонированная рукопись УкрНИИТИ, № 2517; 1992.
3. Баранова С.В., Викторов А.С., Скорикова Т.К., Черноокова Т.В., Мартыненко Л.И., Лукало А.С. Производство коммерческого мицелия вешенки съедобных грибов на виноградно-градной выжимке // III Всесоюзное совещание "Проблемы культивирования съедобных грибов в СССР", Пушкино, 1991.
4. Ежов В.Н., Баранова С.В., Викторов А.С., Скорикова Т.К., Руденко И.Н. Качество коммерческого посевного мицелия Вешенки обыкновенной // Республиканская научно-техническая конференция "Разработка и внедрение высокоэффективных ресурсосберегающих технологий, оборудования и новых видов пищевых продуктов в пищевую и перерабатывающие отрасли АПК", Киев, 1991.
5. Баранова С.В., Викторов А.С., Руденко И.Н. Содержание аминокислот субстрата и плодовых тел вешенки, выращенных на их основе // Республиканская научно-техническая конференция "Разработка и внедрение высокоэффективных ресурсосберегающих технологий, оборудования и новых видов пищевых продуктов в пищевую и перерабатывающие отрасли АПК", Киев, 1991.
6. Баранова С.В., Викторов А.С., Скорикова Т.К. Производство пищевых грибов на отходах переработки винограда // Всесоюзная конференция "Достижения биотехнологии - агропромышленному комплексу", Черновцы, 1991 г.

7. Ежов В. Н., Баранова С. В., Викторов А. С., Скорникова Т. К., Бойко В. А. Производство посевного мицелия вешенки обыкновенной на виноградной выжимке и лозе // IV совещание "Промышленное культивирование съедобных грибов", Донецк, 1993.

Annotation

Victorov A. S. The development and introduction of the biotechnology production commercial mycelium "Вешенка обыкновенная" with the use of the husks of grapes and vine.

The thesis presented for an academic degree of a candidate of technical sciences, speciality 03.00.23-A-biotechnology.

Institute for Vine and Wine "Magarach", Yalta, 1994.

The defense of the thesis is based on 7 publication, with the characteristics of the examination about principal possibility the production sowing mycelium "Вешенка" (*Pleurotus ostreatus*) on the complex raw material consists from the husks of grapes and vine. The effects for the adaptation of the culture on the complex lignocellulose substrate and the stabilization the capacity of the *Pleurotus ostreatus* with its growth and keep have been exposed. The collection the basidium of the fungus has been created. The department of the sowing mycelium with the output 5.000 dal in a year, technical work quota for the organization this production have been introduced in Kiev, in the Foltava area and Uzbekistan.

The industrial application of this technology allowed to product 5.000 dal of the sowing mycelium for 1991-1993 with the economic effect 40.000 ukraine roubles on the 0.1 dal producing mycelium (in the prices on 01.10.1994).

Аннотация

Викторов А. С. Разработка и освоение биотехнологии производства коммерческого мицелия Вешенки обыкновенной на основе виноградных выжимок и лозы.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата технических наук по специальности 03.00.23-Биотехнология.

Институт винограда и вина "Магарач", Ялта, 1994 г.

Защищается 7 научных работ, которые содержат исследования о

принципиальной возможности производства посевного мицелия Вешенки обыкновенной (*Pleurotus ostreatus*) на композиционном субстрате, включающем виноградную выжимку и лозу. Установлен эффект адаптации культуры к сложному лигноцеллюлозному субстрату. Выявлен эффект стабилизации продуктивных свойств культуры Вешенки при ее росте и хранении. Создана коллекция базидиальных грибов при отделе биотехнологии ИВВ "Магарач". Разработана биотехнология производства посевного мицелия Вешенки обыкновенной. Введен в эксплуатацию цех посевного мицелия продуктивной мощностью 50 тыс. литров в год, выдано техническое задание на организацию аналогичных производств в Киевской и Полтавской областях, а также в Узбекистане. Общее производство посевного мицелия Вешенки обыкновенной на основе выжимки и лозы винограда составило за 1991-1993 гг. около 50 тыс. литров. Экономический эффект составил 40 тыс. крб. на 1 литр производимого продукта (в ценах на 01.10.1994 г.).

Ключевые слова: виноградная выжимка, лоза, лигноцеллюлозный субстрат, посевной мицелий, коллекция, штамм, базидиальные грибы, середовище культивування, комерційний мицелій.

Подписано к печати 22.11.1994 г. Формат 60 x 84 /16
Объем 1 п. л. Заказ N 445 Тираж 100 экз.

Печатная группа ИВВ "Магарач", г. Ялта, ул. Кирова, 31

AB 31.480

AB 31.480