



УКРАЇНА

(19) UA (11) 36655 (13) A

(51) 6 A01G1/04

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ
НА ВИНАХІДвидається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ ЗЕРНОВОГО ПОСІВНОГО МІЦЕЛІЮ

(21) 2000010338

(22) 20.01.2000

(24) 16.04.2001

(33) UA

(46) 16.04.2001, Бюл. № 3, 2001 р.

(72) Осовик Анатолій Миколайович

(73) Український науково-дослідний інститут спирту і біотехнології продовольчих продуктів

(57) 1. Спосіб одержання зернового посівного міцелію при вирощуванні плодових тіл їстівного базидіального гриба *Pleurotus ostreatus* (Fr.) Kumm. в аеробних умовах шляхом інокуляції зернового субстрату маточним міцелієм, який відрізняється тим, що маточний міцелій гриба вирощують на

рідкому живильному середовищі методом глибинного культивування.

2. Спосіб за п. 1, який відрізняється тим, що використовують рідке живильне середовище такого складу, г/л: крохмаль кукурудзяний - 40, екстракт кукурудзяний - 30, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - 1, KH_2PO_4 - 0,6, K_2HPO_4 - 0,6, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,3, вода водопровідна - до 1 л.3. Спосіб за п. 1, який відрізняється тим, що використовують рідке живильне середовище такого складу, г/л: крохмаль кукурудзяний - 40, екстракт кукурудзяний - 15, екстракт ячмінно-солодовий - 15, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - 2, KH_2PO_4 - 0,6, K_2HPO_4 - 0,6, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,3, вода водопровідна - до 1 л.

Винахід відноситься до харчової та мікробіологічної промисловості і може бути використаний у біотехнології плодових тіл їстівного базидіального гриба *Pleurotus ostreatus* (Fr.) Kumm. інтенсивним методом.

Відомий спосіб вирощування міцелію базидіального гриба *Pleurotus ostreatus* глибинним методом на рідкому крохмалевмісному живильному середовищі (а. с. СССР № 1499736).

Найбільш близьким до даного способу є спосіб одержання зернового посівного міцелію при інокуляції стерильного зернового субстрату маточним міцелієм, який вирощують поверхневим методом на твердому агаризованому солодовому суслі в пробірках в чашках Петрі (прототип) (Высшие съедобные базидиомицеты в поверхностной и глубокой культуре / Биско Н.А., Бухло А.С., Вассер С.П. и др. Под общей редакцией Дудки И.А. - Киев: Наук. думка, 1983. - С. 67). Але, разом з тим, одержання зернового міцелію цим способом є малопродуктивним, потребує значної витрати часу.

В основу винаходу поставлено задачу удосконалення способу одержання зернового посівного міцелію шляхом використання рідкого живильного середовища і глибинного методу культивування.

Технічний результат, що виникає внаслідок реалізації винаходу, - інтенсифікація процесу одержання зернового міцелію за рахунок підвищення продуктивності одержання як маточного міцелію, так і посівного зернового міцелію.

Споживчі властивості, пов'язані з технічним результатом, полягають у збільшенні кількості зе-

рнового посівного міцелію при скороченні тривалості процесу.

Досягається технічний результат тим, що у відомому способі одержання посівного зернового міцелію при вирощуванні плодових тіл їстівного базидіального гриба *Pleurotus ostreatus* (Fr.) Kumm. в аеробних умовах шляхом інокуляції зернового субстрату маточним міцелієм, останній вирощують на рідкому живильному середовищу методом глибинного культивування.

Переважно використовують рідке живильне середовище такого складу, г/л: крохмаль кукурудзяний - 40, екстракт кукурудзяний - 30, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - 1, KH_2PO_4 - 0,6, K_2HPO_4 - 0,6, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,3, вода водопровідна - до 1 л або крохмаль кукурудзяний - 40, екстракт кукурудзяний - 15, концентрат екстракту ячмінно-солодового - 15, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - 2, KH_2PO_4 - 0,6, K_2HPO_4 - 0,6, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,3, вода водопровідна - до 1 л.

Саме використання рідкого живильного середовища і методу глибинного культивування для вирощування маточного міцелію забезпечує створення оптимальних умов для накопичення більшої кількості біомаси посівного зернового міцелію.

Запропонований спосіб одержання посівного зернового міцелію здійснюють таким чином.

Приготовляють стерильний субстрат із зерна пшениці. Для цього до зерна додають воду, суміш варять протягом 15-20 хв. при слабкому кипінні. Після варки воду зливають, зерно підсушують, рівномірно розгорнувши тонким шаром на рівній чистій поверхні, потім додають 12 г гіпсу і

(19) UA (11) 36655 (13) A

3 г крейди із розрахунку на 1 кг сухого зерна і перемішують. Ці добавки регулюють значення pH середовища та виконують роль буфера. Крім того, гіпс попереджує склеювання зерна, сприяє кращій аерації субстрату. Підсушене зерно насипають в літрові банки, заповнюючи їх на 2/3 місткості. При цьому в одній банці звичайно міститься 350-400 г зерна. Банки закривають алюмінієвою фольгою і автоклавуєть при температурі 127°C протягом 1,5 год. Субстрат охолоджують до температури інокуляції (24-26°C). Після автоклавування pH середовища становить 6,0-6,5.

В стерильних умовах розмножують маточний міцелій *Pleurotus ostreatus* (Fr.) Kumm. шт. 431 на рідкому живильному середовищі методом глибинного культивування в колбах на качалці.

Спочатку вирощують міцелій поверхневим методом на рідкому солодовому суслі (4% CP) в колбах місткістю 500 см³ при наповненні 100 см³ протягом 7-8 діб і температурі 24-26°C. Для цього сусло інокують міцелієм з пробірки з чистою культурою гриба.

Приготовляють рідке живильне середовище, яке містить, г/л: кукурудзяний крохмаль - 40, кукурудзяний екстракт - 30, (NH₄)₂SO₄ - 1, KH₂PO₄ - 0,6, K₂HPO₄ - 0,6, MgSO₄·7H₂O - 0,3, вода водопровідна до 1 л, або кукурудзяний крохмаль - 40, кукурудзяний екстракт - 15, екстракт ячмінно-солодовий - 15 та мінеральні солі і вода в кількості, як вказано вище. Доводять розчином NaOH значення pH до 6,3-6,5, розливають по 100 і 200 см³ в качалочні колби місткістю 750 см³, автоклавуєть при температурі 127°C протягом 1,5 год., охолоджують. Значення pH після стерилізації - 6,0-6,2.

Подрібнений струшуванням вирощений на рідкому солодовому суслі поверхневий міцелій гриба вносять по 50 см³ в колби зі 100 см³ крохмалевмісного живильного середовища і культивують на качалці при 200 об/хв, температурі 24-26°C протягом 3-4 діб.

Потім одержаним глибинним міцелієм інокують живильне крохмалевмісне середовище в качалочних колбах місткістю 750 см³ при наповненні 200 см³ в кількості 30-50 см³ на одну колбу і проводять культивування на качалці при 200 об/хв, температурі 24-26°C протягом 3-4 діб. Частину колб з одержаним маточним міцелієм використовують для інокуляції стерильного зернового субстрату. Іншу частину колб з вирощеним маточним міцелієм зберігають і використовують для інокуляції живильного середовища в качалочних колбах (30-50 см³ на 200 см³ середовища) при подальшому розмноженні (4-5 пасажів) глибинного маточного міцелію, який потім знову використовують для інокуляції зернового субстрату. Маточний міцелій зберігають до використання в холодильнику при температурі 2-4°C протягом 1-2 місяців.

Розмноженим глибинним маточним міцелієм інокують приготовлений стерильний зерновий субстрат в скляних літрових банках. Інокуляцію проводять з дотриманням правил мікробіологічних робіт. Міцелієм із однієї качалочної колби інокують 10-15 банок зі стерильним зерновим субстратом. Після інокуляції зернового субстрату міцелієм його інкубують в термостаті або на полицях в кімнаті, де підтримують температуру 24-26°C, відносну вологість повітря 60-70 %. Через 3-4 доби

після інокуляції зернового субстрату міцелієм його струшують в банці. Це запобігає склеюванню зерна і прискорює ріст міцелію. Через 6-8 діб після інокуляції зерновий субстрат повністю обростає міцелієм. Одержаний посівний зерновий міцелій готовий до використання. Його можна зберігати в холодильнику або холодильній кімнаті при температурі 2-4°C протягом одного місяця.

Приклад 1.

Посівний зерновий міцелій одержують при інокуляції субстрату із зерна пшениці глибинним маточним міцелієм, вирощеним на живильному середовищі, яке містить, г/л: кукурудзяний крохмаль - 40, кукурудзяний екстракт - 30, (NH₄)₂SO₄ - 1, KH₂PO₄ - 0,6, K₂HPO₄ - 0,6, MgSO₄·7H₂O - 0,3, вода водопровідна до 1 л, pH 6,0.

Для приготування зернового субстрату на 10 кг зерна пшениці додають 15 л води, суміш варять протягом 20 хв. на слабкому вогні. Після варки воду зливають через сито, зерно підсушують, рівномірно розгорнувши тонким шаром на рівній частині поверхні, додають 120 г гіпсу і 30 г крейди і перемішують. Приготовлене таким чином зерно насипають в літрові банки, заповнюючи їх на 2/3 місткості. При цьому в одній банці звичайно міститься 350-400 г зерна. Банки закривають алюмінієвою фольгою і автоклавуєть при температурі 126°C протягом 1,5 год. Після охолодження до температури 24°C стерильний зерновий субстрат готовий для інокуляції маточним глибинним міцелієм.

Для одержання маточного глибинного міцелію спочатку вирощують міцелій поверхневим методом на рідкому солодовому суслі (4% CP) в колбах місткістю 500 см³ при наповненні 100 см³ протягом 7 діб і температурі 26°C. Для цього сусло в колбах інокують міцелієм із пробірок з чистою культурою гриба *Pl.ostreatus* шт. 431.

Приготовляють крохмалевмісне живильне середовище, яке розливають по 100 і 200 см³ в колби місткістю 750 см³, автоклавуєть при температурі 126°C протягом 1,5 год., охолоджують до 28°C. Значення pH після стерилізації - 6,0.

Подрібнений струшуванням поверхневий міцелій гриба, вирощений на рідкому солодовому суслі, вносять по 50 см³ в колби зі 100 см³ живильного крохмалевмісного середовища і культивують на качалці при 200 об/хв., температурі 24°C протягом 4 діб. Вирощеним глибинним міцелієм інокують живильне крохмалевмісне середовище в качалочних колбах місткістю 750 см³ при наповненні 200 см³ по 30 см³ міцелію на одну колбу. Культивування проводять на качалці при 200 об/хв. при температурі 26°C протягом 4 діб. Накопичення сирової біомаси в культуральному середовищі становить 200 г/л або ≈20 г АСБ/л.

Частину колб з одержаним глибинним маточним міцелієм використовують для інокуляції стерильного зернового субстрату в скляних літрових банках, який приготовляють із зерна пшениці. Глибинний маточний міцелій в колбах, які залишилися, зберігають в холодильнику при температурі 2-4°C протягом 1-2 місяців, а потім використовують як посівний при вирощуванні наступної партії маточного міцелію.

Глибинним міцелієм із однієї качалочної колби (≈4-5 г АСБ) інокують десять літрових банок з

зерновим субстратом ($\approx 0,4-0,5$ АСБ на 1 банку), які розміщують потім на полицях в термостатній кімнаті при температурі 24°C . Вологість повітря підтримують на рівні 70%. Через 4 доби, коли міцелій проріс приблизно $1/3$ субстрату, колби струшують і залишають для подальшого обростання субстрату міцелієм. Через 8 діб субстрат повністю обростає міцелієм. Одержаний посівний зерновий міцелій готовий для використання. За необхідності його можна зберігати при температурі 2°C протягом 1-2 місяців.

Приклад 2.

Посівний зерновий міцелій одержують при інокуляції стерильного субстрату із зерна пшениці маточним глибинним міцелієм, вирощеним, як наведено в прикладі 1.

Але при цьому розмноження маточного глибинного міцелію проводять з використанням для інокуляції живильного крохмалевмісного середовища в колбах глибинним міцелієм, що зберігався при температурі 2°C протягом 2 місяців. В одну колбу місткістю 750 см^3 при наповненні 200 см^3 вносять 50 см^3 такого міцелію. Культивування міцелію на качалці проводять при температурі 26°C протягом 3 діб. Накопичення сирової біомаси в культуральному середовищі становить 200 г/л або $\approx 20\text{ г АСБ/л}$.

Приготування стерильного зернового субстрату, інокуляцію його маточним глибинним міцелієм і пророщення міцелієм проводять, як в прикладі 1.

Приклад 3.

Посівний зерновий міцелій одержують при інокуляції субстрату із зерна пшениці маточним міцелієм, вирощеним глибинним методом на живильному середовищі, яке містить, г/л: кукурудзяний крохмаль - 40, кукурудзяний екстракт - 15, екстракт ячмінно-солодовий - 15, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - 2, KH_2PO_4 - 0,6, K_2HPO_4 - 0,6, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,3, вода водопровідна до 1 л, рН 6,2.

Розмноження міцелію із пробірки поверхневим методом та розмноження глибинного міцелію в качалочних колбах при наповненні їх крохмалевмісним живильним середовищем 100 см^3 проводять, як в прикладі 1.

Для розмноження маточного міцелію в колбах при наповненні 200 см^3 використовують живильне середовище вказаного вище складу. Його засівають 30 см^3 вирощеного глибинного міцелію. Культивування в колбах на качалці проводять, як в прикладі 2, протягом 3 діб. Накопичення сирової біо-

маси становить 250 г/л культурального середовища або $\approx 25\text{ г АСБ/л}$.

Міцелієм із культурального середовища однієї качалочної колби інокують 15 літрових банок з зерновим субстратом. Пророщення субстрату міцелієм проводять, як в прикладі 1, протягом 6 діб.

Дані, що характеризують досягнення технічного результату запропонованим способом в порівнянні з прототипом, наведені в таблиці.

Таблиця

Найменування показника	Прототип	Даний спосіб
1	2	3
Тривалість розмноження чистої культури міцелію в пробірках, діб	6-8	6-8
Витрата маточного міцелію на 100-150 банок зернового субстрату	100-150 пробірок	10 колб качалочних
Тривалість вирощування маточного міцелію, діб	7-10	3-4
Тривалість обростання міцелієм зернового субстрату в банці, діб	20-22	6-8

* Примітка. Розмноження чистої культури міцелію в пробірках проводять один раз на 4-5 циклів розмноження глибинного міцелію.

Як видно з таблиці, запропонований спосіб одержання зернового посівного міцелію при інокуляції стерильного зернового субстрату глибинним маточним міцелієм забезпечує значну інтенсифікацію процесу. При цьому досягається також зменшення його трудомісткості.

В цілому, спосіб є важливим для розвитку грибоводства, оскільки дозволяє організувати централізоване забезпечення грибоводів маточним глибинним міцелієм для інокуляції зернового субстрату і значно спростити при цьому одержання плодових тіл їстівного гриба *Pleurotus ostreatus*.

ДП "Український інститут промислової власності" (Укрпатент)
Україна, 01133, Київ-133, бульв. Лесі Українки, 26
(044) 295-81-42, 295-61-97

Підписано до друку _____ 2001 р. Формат 60х84 1/8.
Обсяг _____ обл.-вид. арк. Тираж 50 прим. Зам. _____

УкрІНТЕІ, 03680, Київ-39 МСП, вул. Горького, 180.
(044) 268-25-22