

РАЗРАБОТКА КОРМОВЫХ ДОБАВОК НА ОСНОВЕ ТРАНСФОРМАЦИИ ОРГАНИЧЕСКИХ ОТХОДОВ ГРИБАМИ-БАЗИДИОМИЦЕТАМИ

*А.В. Кураков¹, А.В. Барков², С.А. Кулачкова¹, А.В. Шнырева¹, Е.Ю. Кожеевникова²,
Е.Г. Кондратьева³, В.А. Терехова¹, В.С. Садыкова⁴*

¹ Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

² Российский государственный университет нефти и газа им. И.М. Губкина, Россия

³ ФИЦ Фундаментальные основы биотехнологии, Институт биохимии им. А.Н. Баха

⁴ Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков им. Г.Ф. Гаузе, Москва, Россия

Одним из путей использования органических отходов, представляющих недорогие органические субстраты в новые ценные продукты, является их биоконверсия в корма. Грибы-базидиомицеты являются перспективными организмами для решения этой задачи. Они способны к деструкции самых разнообразных органических соединений, включая труднодоступные. Это позволяет применять их для создания кормовых продуктов на субстратах, которые не могут использовать дрожжи и многие бактерии. Содержание нуклеиновых кислот в их биомассе значительно меньше, чем в прокариотах. Среди них есть виды, которые обладают ценными питательными и лечебными свойствами [1–3]. Вместе с тем, биотехнологий получения кормовых добавок на основе базидиомицетов, использующих в качестве субстрата органические отходы крайне мало.

Целью работы был поиск штаммов грибов-базидиомицетов для биоконверсии различных органических отходов в кормовые добавки.

Для разработки кормовых добавок в качестве исходных органических отходов и относительно дешевых субстратов были взяты пивная дробина, свекловичный жом, жмых подсолнечника, пшеничные отруби, древесные опилки и пшеничная солома. Для отбора нужных штаммов грибов создали рабочую коллекцию из разных таксонов базидиомицетов из коллекций кафедры микологии и альгологии Московского университета, Российского университета нефти и газа и Ботанического института РАН, а также провели сбор плодовых тел и выделение новых культур.

Для идентификации грибов использовали рекомендуемые ключи [4 и другие]. Большинство коллекционных штаммов и отобранные изоляты были определены также по молекулярно-генетическим признакам (секвенированием ITS1 и ITS2 рДНК) [5]. Нуклеотидные последовательности штаммов, прошедших первичный отбор, депонированы в Генбанке.

Первичный скрининг штаммов основывался на данных в литературе о питательных и лечебных свойствах представителей тех видов, которые были в созданной коллекции, оценке их скорости роста, целлюлазной и фенолоксидазной активностях при росте на агаровых средах, и интенсивности зарастания изучаемых субстратов.

Линейную скорость роста штаммов оценивали на сусло-агаре и картофельно-глюкозный агаре при 28 °С в течение 14-ти суток, измеряя диаметр растущей колонии один раз в сутки [6]. Качественную оценку целлюлазной проводили на среде с добавлением 2,0 г Na-карбоксиметилцеллюлозы в качестве единственного источника углерода [7]. Спустя 5 суток культивирования при 28 °С поверхность чашек заливали на 5 минут аптечным раствором Люголя («Московская фармфабрика», Россия), разведённым дистиллированной водой в соотношении 1:20, после чего раствор Люголя сливали. Целлюлазную активность оценивали по наличию зоны просветления вокруг колонии гриба, рассчитывая коэффициент целлюлазной активности по формуле [8]: $RA = \frac{S_{\text{зоны просветления}} - S_{\text{колонии}}}{S_{\text{колонии}}}$, где RA – коэффициент целлюлазной активности; $S_{\text{зоны просветления}}$ – площадь неокрашенного участка вокруг мицелия; $S_{\text{колонии}}$ – площадь, занимаемая мицелием гриба.

Оценку фенолоксидазной активности проводили по методу Бавендамма на чашках Петри с сусло-агаром с добавлением 3,5 г/л галловой кислоты («Диаэм», Россия) в качестве субстрата [6]. Спустя 5 суток культивирования при 28 °С оценивали интенсивность коричневой окраски субстрата вокруг растущего мицелия с обратной стороны чашки Петри по 4-х-балльной шкале: интенсивная, умеренная, слабая окраска реверса и отсутствие окраски.

Для предварительного тестирования роста грибов на разных субстратах применяли чашки Петри и большие пробирки, затем использовали в пластиковых стерильных плоских контейнерах и флаконах на 500 мл, что позволяло оценить активность разложения субстратов по эмиссии диоксида углерода.

Скорость зарастания органических отходов определяли по интенсивности распространения мицелия при 28° С в чашках Петри и вглубь пробирки, в которых они были помещены, предварительно простерилизованные и увлажненные.

Посевной материал для твердофазного выращивания штаммов на органических отходах получали путем их погруженного культивирования на стандартной глюкозо-соевой среде на ротационном шейкере при температуре 28 °С и скорости вращения 250 об/мин в течение 4–8 суток в зависимости от штамма. Затем получали 5-ти суточные посевные культуры 2-ой генерации.

Последующий отбор штаммов проводили на основе данных по антибиотической и ферментативной активностям посевных культур, эффективности переработки штаммами отходов (динамике выделения CO₂) и обогащению их протеинами, жирами, улучшению перевариваемости.

Антибиотическую активность штаммов определяли в культуральной жидкости методом лунок с тест-культурами *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* 209P, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Candida albicans* ATCC 2091. Активность КМЦ-азы (КМЦ, Sigma), глюкозидазы, ксиланазы (субстрат – ксилан буковый, Sigma), маннаназы (галактоманнан, Megazyme), полигалактуроназы (калиевая соль ПГК, Sigma) фитазы (фитат риса, Sigma), хитиназы (хитин коллоидный), ламинариназы (ламинарин, Sigma), амилазы (крахмал Экос-16 чда) и пептидаз (казеин) в культуральной жидкости штаммов измеряли согласно рекомендуемым стандартным методам [9–11 и др.]. Все штаммы, прошедшие первичный отбор, были проверены на токсичность к инфузориям *Paramecium caudatum* [12].

Динамику выделения диоксида углерода при твердофазной конверсии органических отходов грибами изучали при 28° С. Активность рассчитывали в мкг C-CO₂/г субстрата (в.с.) в час на 0, 3, 6, 9 и 12–13 сутки. Перед измерением флаконы, в которых были засеянные грибами субстраты, закрывали резиновыми пробками, сразу после этого и через 1 час отбирали пробы воздуха для определения концентрации диоксида углерода. Использовали газовый хроматограф Кристаллюкс 4000М с детектором по теплопроводности (температура детектора 60° С) на колонке с адсорбентом «Полисорб» длиной 3,2 м (температура колонок 50° С). В качестве газа-носителя служил гелий. В качестве контроля были флаконы, в которых внесена среда, не засеянная грибами.

Для твердофазного культивирования штаммов с целью получения кормовых добавок для химических анализов их состава использовали термостойкие пластиковые лотки (170x140x25 мм) с крышкой. В них помещали органические субстраты, стерилизовали автоклавированием, засевали погруженной культурой штаммов, тщательно перемешивали и инкубировали при 28 °С в течение 12 суток. Исходные образцы субстратов (0 сутки) и после твердофазного культивирования штаммов (на 3, 6, 9, 12 сутки) высушивали в конвекционной сушилке DDV-10 (Rawmid) при 40 °С в течение 9 часов. Сухие образцы измельчали на лабораторной ножевой мельнице и переносили в стерильные пластиковые пробирки с герметичной крышкой. В них определяли содержание общего азота [13], сырого жира [14], сырой клетчатки [15]. Трансформированные грибами органические отходы на 3 и 6 сутки (период максимальной активности роста штаммов) дополнительно анализировали на содержание растворимых сахаров [16], легкогидролизуемых углеводов (крахмал) [16], сырой золы [17], фосфора [18] и кальция [19]. Все анализы сделаны в государственной станции агрохимической службы по стандартным методикам.

Все эксперименты проводили в 3-х кратной повторности, и данные были статистически обработаны.

В результате проведенной работы создана коллекция из 163 штаммов, в которую вошли 95 свежесделанных и 68 коллекционных штаммов, преимущественно из коллекции кафедры микологии и альгологии МГУ. Новые штаммы были выделены из плодовых тел макромицетов, собранных в разных природно-климатических регионах. В целом эта рабочая коллекция включала 96 видов 55 родов представителей Agaricomycotina, главным образом афиллофороидных грибов – сапротрофных ксилотрофов. Для последующего скрининга из неё были отобраны 58 штаммов на основе данных в литературе об их питательной ценности, медицинских свойствах и способности к деструкции лигноцеллюлозных субстратов.

Оценка скорости роста, целлюлазной и фенолоксидазной активности на агаровых средах позволила отобрать 23 из 58 штаммов. Это были виды родов *Laetiporus*, *Ganoderma*, *Trametes*, *Flamulina*, *Pleurotus*, *Lentinus*, *Inonotus*, *Coprinus*, *Hypsizygus*. Сравнительный анализ 23 штаммов по интенсивности распространения и проникновения их мицелия внутрь органических отходов, проведенный в пробирках и чашках Петри, выявил 12 штаммов с максимальными значениями этих показателей. Все они не проявляют токсичных свойств согласно тесту, проведенному с инфузориями *Paramecium caudatum*.

Была отработана технология глубинного выращивания этих штаммов для получения посевного материала. Она позволяла иметь не менее 8–15 г. воздушно-сухой биомассы в 1 л среды на 5 сутки в зависимости от штамма. Максимальная продуктивность установлена у штаммов *Flammulina velutipes*, *Pleurotus ostreatus*, не менее 13 г./л. Дальнейшая оптимизация условий культивирования, как показывают предварительные опыты, может увеличить накопление биомассы до 15–18 г. в 1 л среды большинством штаммов.

Половина из 12 штаммов обладают слабой антибиотической активностью к *Candida albicans* ATCC 2091 и умеренной – к *Bacillus subtilis* ATCC 6633, что, возможно, придаст кормовой добавке свойства ингибировать патогенные микроорганизмы в пищеварительном тракте животных.

Установлено, что штаммы проявляют активность внеклеточных гидролаз, важных для усвоения кормов животными и птицей, но они нередко существенно у них различаются. Протеолитическую активность в диапазоне 23,5–68,6 мкмольТир/(мл мин) продемонстрировали только штаммы рода *Pleurotus*, *Flammulina* и *Ganoderma*. Все штаммы, за исключением одного представителя рода *Trametes*, проявили довольно высокую удельную активность КМЦ-азы и ксиланазы. Практически аналогичная ситуация была с активностью α -амилазы у изученных штаммов. Активности маннаназы, полигалактуроназы, ламинаризы, глюкозидазы проявляли, как правило, 5 или 6 штаммов из 12. Хитиназная и фитазная активности были обнаружены у всех штаммов. Расщепление хитина было более эффективным, чем фитина. Активность у отдельных штаммов достигала 10 ед./мл, и в среднем была на порядок выше, чем фитазная активность, которая лежала в интервале 0,28–0,60 ед./мл.

Интенсивность переработки органических отходов по скорости выделения диоксида углерода при твердофазном культивировании грибов убывала в ряду: пшеничные отруби, пивная дробина, свекловичный жом, пшеничная солома, древесные опилки. Наибольшая скорость эмиссии диоксида углерода была на 3–6 сутки. Она достигала у активно растущих штаммов на пшеничных отрубях 700–1300 мкг С-СО₂ /г субстрата в час, на пивной дробине – 600–1100 мкг СО₂ /(г·час), на свекловичном жоме – мкг 550–800 С-СО₂ /(г·час), на пшеничной соломе – мкг 200–300 С-СО₂ /(г·час) и на опилках 100–200 мкг С-СО₂ /(г·час). Максимальная интенсивность выделения диоксида углерода и быстрое (на 3 сутки в подавляющем большинстве случаев) зарастание субстратов мицелием, конверсия их кормовые добавки, происходит при внесении штаммов рода *Pleurotus* и *Trametes pubescens*, хорошо их заселяли также *Trametes hirsuta* и некоторые другие, пивной дробины – *Ganoderma lucidum*, затем следовали *Trametes hirsuta*, *Pleurotus*, свекловичного жома – *Trametes gibbosa*, *T. pubescens* и ряд других, пшеничной соломы – *Ganoderma lucidum*, *Trametes pubescens*, *T. hirsuta* и древесных опилок – *Ganoderma lucidum*, *Laetiporus sulphureus*.

Проведен анализ изменения концентрации азота (белка), сырого жира, сырой клетчатки, растворимых сахаров, легкогидролизуемых углеводов (крахмала), фосфора и минеральных солей при твердофазном культивировании штаммов на органических отходах. Установлено, что повышение содержания азота, жиров, растет, растворимых сахаров и легкогидролизуемых углеводов при грибной трансформации субстратах происходит, как правило, в период от 3 до 6 суток, затем изменения в них были не столь значимые. То есть для получения кормовых добавок вполне можно достигнуть путем непродолжительной по времени грибной твердофазной трансформации отходов. Это касается пшеничных отрубей, пивной дробины и свекловичного жома, обогащение которых (в среднем на 10–30 %) азотом / белком жирами и доступность к перевариванию достигается к 3 суткам. Трансформация в ценные кормовые добавки пшеничной соломы и опилок требует большего периода и дополнительной предобработки субстратов. Выявлены существенные различия между штаммами в переработке изучаемых органических отходов.

На основе имеющихся данных по отбору эффективных грибов-базидиомицетов для трансформации пшеничных отрубей и пивной дробины в кормовые добавки отобраны штаммы родов *Flammulina*, *Coprinus*, *Laetiporus*, менее эффективными были представители родов *Pleurotus*, *Trametes* и другие, для переработки свекловичного жома помимо вышеуказанных таксонов – штаммы *Lentinula edodes*, *Trametes hirsuta*, родов *Ganoderma* *Hypsizigus*.

Планируется дальнейшая работа по характеристике и улучшению разрабатываемых кормовых добавок и оценке их эффективности в опытах по кормлению животных и птицы.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 18–29–25073мк.

Литература

1. Ревин В.В., Н.А. Атыкян, Е.В. Лияськина, Д.А. Кадималнев, В.В. Шутова, Н. Желев, Р.Р. Биглов, Т.В. Овчинникова. Общая биотехнология: учебник. (ред. А.И. Мирошников) 3 изд. – Саранск: Изд-во Мордов. Ун-та. 2019. – 416 с.
2. Kavyani A., Zare Shahne A., PorReza, J., Jalil Haji-abadi S.M.A., Landy N. Evaluation of dried powder of mushroom (*Agaricus bisporus*) as an antibiotic growth promoter substitution on performance, carcass traits and humoral immune responses in broiler chickens // J. Med. Plant Res. – 2012. – Vol.6. – P.94–100.
3. Lee, S.B., Im, J., Kim, S.K., Kim, Y.C., Kim, M.J., Lee, J.S., Lee, H.G. Effects of dietary fermented *Flammulina velutipes* mycelium on performance and egg quality in laying hens // Int. J. Poult. Sci. 2012. – Vol.13. – P. 637–644.
4. Knudsen H., Vesterholt J. (eds.) Funga Nordica. Araricoid, boletoid and cyphelloid genera. Copenhagen. Nordsvamp. 2008. 965 P.
5. Izumitsu K., Hatoh K., Sumita T., Kitade Y., Morita A., Gafur A., Ohta A., Kawai M., Yamanaka T., Nieta Y., Oyta Y., Tanaka C. Rapid and simple preparation of mushroom DNA directly from colonies and fruiting bodies for PCR // Mycoscience. – 2012. – Vol. 53. – P.396–401.
6. Билай В.И. (ред). Методы экспериментальной микологии / Киев: Наукова думка. 1982. 550 с.
7. Kasana R.C., Salwan R., Dhar H., Dutt S., Gulati A. Rapid and easy method for detection of microbial cellulases on agar plates using Gram's iodine // Current Microbiology. -2008. – Vol. 57. – P. 503–507.
8. Bradner J.R., M. Gillings, Nevalainen K.M.H. Qualitative assessment of hydrolytic activities in Antarctic microfungi grown at different temperatures on solid media // World Journal of Microbiology & Biotechnology. – 1999. – Vol. 15. – P.131–132.
9. ГОСТ 31662–2012. Препараты ферментные. Методы определения ферментативной активности целлюлазы.
10. ГОСТ 55302–2012. Ферментные препараты для пищевой промышленности. Метод определения ксиланазной активности.
11. ГОСТ Р 53360–2009. Препараты ферментные. Методы определения ферментативной активности фитазы.
12. ГОСТ 31674–2012. Корма, комбикорма, комбикормовое сырье. Методы определения общей токсичности.
13. ГОСТ 13496.4. Корма, комбикорма, комбикормовое сырье. Методы определения содержания азота и сырого протеина.
14. ГОСТ 13496.15, п. 9.1 Корма, комбикорма, комбикормовое сырье. Методы определения массовой доли сырого жира.
15. ГОСТ 31675, раздел 6. Корма. Методы определения содержания сырой клетчатки с применением промежуточной фильтрации.
16. ГОСТ 26176–2019. Корма, комбикорма. Методы определения растворимых и легкогидролизуемых углеводов
17. ГОСТ 26226–95. Корма, комбикорма, кормовое сырье. Методы определения сырой золы
18. ГОСТ 26657–97. Корма, комбикорма, комбикормовое сырье. Методы определения содержания фосфора.
19. ГОСТ 26570–95. Корма, комбикорма, комбикормовое сырье. Методы определения кальция