

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) біотехнології та екологічного контролю
Кафедра біотехнології і мікробіології

«До захисту в ЕК»
Директор інституту (декан факультету)
_____ Грегірчак Н.М.
(підпис) (прізвище та ініціали)
« _____ » 2020 р.

«До захисту допущено»
Завідувач кафедри
Пирог Т.П.
(підпис) (прізвище та ініціали)

« » _____ 2020 р.

**КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА
НА ЗДОБУТТЯ ОСВІТНЬОГО СТУПЕНЯ БАКАЛАВРА**

зі спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія»
(код та назва спеціальності)

освітньо-професійної програми «Біотехнологія»

на тему: Одержання міцеліальної маси *Agaricus bisporus* для використання у промисловому вирощуванні грибів

Виконав: здобувач IV курсу, групи 1

Бондарук Світлана Володимирівна
(прізвище, ім'я, по батькові повністю)

Керівник Красінько Вікторія Олегівна _____
(прізвище, ім'я та по батькові) (підпис)

Консультанти Клименко О.М. _____
(прізвище та ініціали) (підпис)

Аль-Маалі Г.А. _____

(прізвище та ініціали) (підпис)

Рецензент Ломберг М.Л. _____
(прізвище та ініціали) (підпис)

Засвідчую, що в цій кваліфікаційній
роботі немає запозичень із праць
інших авторів без відповідних
посилань.

Здобувач _____
(підпис)

Київ – 2020 р.

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) біотехнології та екологічного контролю
Кафедра біотехнології і мікробіології
Освітній ступінь бакалавр
Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»
(код і назва)
Освітньо-професійна програма «Біотехнологія»
(назва)

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри біотехнології і мікробіології

Пирог Т.П.

«17» березня 2020 року

З А В Д А Н Н Я

НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧУ

Бондарук Світлані Володимирівні

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи Одержання міцеліальної маси *Agaricus bisporus* для використання у промисловому вирощуванні грибів

керівник роботи Красінько Вікторія Олегівна, к.т.н., доц.,
(прізвище, ім'я, по батькові, науковий ступінь, вчене звання)

затверджені наказом вищого навчального закладу від «16» березня 2020 року № 227-к

2. Строк подання здобувачем проекту (роботи) 01 червня 2020 року

3. Вихідні дані до проекту (роботи) біологічний агент: *Agaricus bisporus*, цільовий продукт: міцеліальна маса

4. Зміст розрахунково-пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити)
Розділ 1. Перспективи використання грибів роду *Agaricus*, Розділ 2. Характеристика збудників хвороб *Agaricus bisporus* та шляхи боротьби з ними, Розділ 3. Матеріали та методи, Розділ 4. Результати досліджень, Розділ 5. Ділянка доферментаційних процесів та виробничої ферментації, Розділ 6. Автоматизація ділянки доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу

5. Перелік графічного матеріалу (з точним зазначенням обов'язкових креслень)
Технологічна схема виробництва міцеліальної маси *Agaricus bisporus* – 1 креслення формату А2, апаратурна схема виробництва міцеліальної маси *Agaricus bisporus* – 1 креслення формату А2, схема автоматизації ділянки виробничого біосинтезу – 1 креслення формату А3

6. Консультанти розділів роботи

Розділ	Прізвище, ініціали та посада консультанта	Підпис, дата	
		завдання видав	завдання прийняв
6	Клименко Олег Миколайович доцент, к.т.н., кафедра автоматизації та комп'ютерних технологій систем управління	23.03.20	24.04.20
1,2,3,4,5	Аль-Маалі Г.А., к.б.н., н.с. відділу мікології Інституту ботаніки ім. М.Г.Холодного НАН України	20.03.20	19.05.20

7. Дата видачі завдання «17» березня 2020 року

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№ з/П	Назва етапів кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1.	Перспективи використання грибів роду <i>Agaricus</i>	20.03.20- 29.03.20	
2.	Характеристика збудників хвороб <i>Agaricus bisporus</i> та шляхи боротьби з ними	30.03.20- 15.04.20	
3.	Матеріали та методи	16.04.20- 20.04.20	
4.	Результати досліджень	21.04.20- 30.04.20	
5.	Ділянка доферментаційних процесів та виробничої ферментації	1.05.20- 25.05.20	
6.	Автоматизація ділянки доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу	17.05.20- 23.05.20	
7.	Графічна частина	20.05.20- 31.05.20	
8.	Оформлення пояснювальної записки	24.05.20- 30.05.20	

Здобувач

_____ (підпис)

_____ (прізвище та ініціали)

Керівник роботи

_____ (підпис)

_____ (прізвище та ініціали)

РЕФЕРАТ

Кваліфікаційна робота представлена у вигляді двох частин: науково-дослідної та інженерної.

У першій частині роботи було здійснено аналіз літератури для виявлення властивостей представників роду *Agaricus*, виділення можливих шляхів контамінації промислових культур та походження збудників найбільш поширених захворювань *Agaricus bisporus*. Було встановлено, що найбільші збитки грибним господарствам завдають мікофільні мікроміцети, зокрема роду *Cladobotryum*, тому метою експериментальної частини роботи було виявлення ефективних способів боротьби з виділеними на грибних фермах штамми *Cladobotryum mycophilum*. Проведено визначення стійкості *Cladobotryum spp.* до фунгіцидів, які використовуються на грибних підприємствах, та визначення взаємовідносин *A. bisporus* із певними мікроміцетами. Результати досліджень наведено у кваліфікаційній роботі.

У другій частині роботи наведено обґрунтування вибору поживного середовища для культивування *A. bisporus* та його характеристики, розраховано річну потужність виробництва міцеліальної маси *A. bisporus* для забезпечення потреб грибної ферми «Гелека – М». Технологічний процес складається із допоміжних робіт (санітарна підготовка виробництва, підготовка стерильного аераційного повітря, підготовка і стерилізація піногасника, підготовка та стерилізація титрувальних розчинів, підготовка та стерилізація поживних середовищ для вирощування посівного матеріалу і для виробничого культивування) та основних робіт (підтримання колекційної культури, отримання посівного матеріалу та виробничий біосинтез).

Кваліфікаційну роботу представлено на 136 сторінках друкованого тексту, містить 20 таблиць, 10 рисунків і складається із вступу, літературного огляду, експериментальної частини, технологічної частини, списку використаної літератури, додатків та графічної частини, яка представлена 3 кресленнями: одне креслення формату А3 та два креслення формату А2.

Ключові слова: *Agaricus bisporus*, базидіоміцети, *Cladobotryum mycophilum*, фунгіциди, культивування, посівний матеріал.

ЗМІСТ

РЕФЕРАТ	3
ВСТУП	6
ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД	8
РОЗДІЛ 1. Перспективи використання грибів роду <i>Agaricus</i>	8
РОЗДІЛ 2. Характеристика збудників хвороб <i>Agaricus bisporus</i> та шляхи боротьби з ними	16
2.1 Хвороби печериць та джерела контамінації	16
2.2. Вірусні захворювання <i>Agaricus bisporus</i>	20
2.3. Бактеріальні захворювання <i>Agaricus bisporus</i>	23
2.4. Грибні інфекції <i>Agaricus bisporus</i>	25
2.5. Боротьба із захворюваннями грибів	27
ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА	31
РОЗДІЛ 3. Матеріали та методи досліджень	31
3.1. Штами культур грибів використанні у дослідженні.	31
3.2. Поживні середовища	31
3.3. Визначення швидкості росту	32
3.4. Визначення чутливості штамів <i>Cladobotryum spp.</i> до впливу фунгіцидів	32
3.3. Визначення взаємодії <i>Agaricus bisporus</i> з мікроміцетами	34
РОЗДІЛ 4. Результати досліджень	35
4.1. Характеристика збудників павутинної цвілі ізольованих з грибних господарств України	35
4.2. Характеристика росту та морфології колоній <i>C. mycophilum</i> на стандартних живильних середовищах.	37
4.3. Стійкість до фунгіцидів	39
4.4. Взаємодія <i>Agaricus bisporus</i> з мікроміцетами	42
ТЕХНОЛОГІЧНА ЧАСТИНА	45
РОЗДІЛ 5. Ділянка доферментаційних процесів та виробничої ферментації .	45
5.1. Обґрунтування вибору біологічного агента та живильного середовища для його культивування	45
5.2. Розрахунок складу поживного середовища для отримання міцеліальної маси <i>Agaricus bisporus</i>	50
5.3. Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки <i>Agaricus bisporus</i>	52
5.4. Таксономічний статус <i>Agaricus bisporus</i>	53

5.5. Техніко-економічне обґрунтування	54
5.6. Обґрунтування вибору допоміжних стадій виробництва	61
5.7. Продуктовий розрахунок, матеріальний баланс на один цикл виробничого біосинтезу, розрахунок технологічного обладнання	76
5.8. Специфікація обладнання	86
5.9. Опис технологічної схеми процесу біосинтезу міцеліальної маси <i>Agaricus bisporus</i>	89
5.10. Контроль виробництва міцеліальної маси <i>Agaricus bisporus</i>	104
РОЗДІЛ 6. Автоматизація ділянки доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу	114
ВИСНОВКИ.....	120
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ:	121
ДОДАТКИ.....	136

ВСТУП

Виробництво їстівних грибів має ряд переваг. Їстівні гриби мають високу продуктивність та містять значну кількість протеїну. Для їх культивування використовують субстрати, виготовлені із широко поширених в Україні відходів сільськогосподарського та лісового господарств: солома злакових рослин, соняшникове лушпиння, тирса деревини, курячий послід, кінський гній та інші. Варто додати, що дана сировина є відходами виробництв, тому їх використання сприяє зменшенню вартості продукту. Для штучного культивування грибів можуть бути використані, крім спеціальних, різні приміщення, що не експлуатуються за прямим призначенням (склади, овочесховища, ферми, підвали, тощо). Технологія вирощування їстівних грибів є екологічно чистою та безвідходною, тому що субстрат після їх культивування можна використовувати як цінне добриво або кормові добавки до раціону сільськогосподарських тварин і птиці [1].

За оцінкою Інформаційного грибного агентства УМДІС в 2017 році обсяг вирощених в Україні печериць (*Agaricus bisporus*) склав близько 51,3 тисячі тон. Кількість шампінйонних ферм перевищує 300, при цьому велика їх частина дуже маленькі, що виробляють всього п'ять-десять тон гриба на місяць. Ринок печериці зростає на 8 % за останій рік [2].

Було встановлено, що на грибних фермах України досить поширеними є мікроміцети, які є конкурентами за поживний субстрат для *Agaricus bisporus* [3]. Зважаючи на тривалість використання засобів боротьби із збудниками хвороб печериць, викликаних представниками роду *Cladobotryum*, такі препарати поступово втрачають свою ефективність.

Актуальність теми. Сучасний розвиток промислового вирощування грибів *Agaricus bisporus* в Україні й у світі виявив потребу в інтенсифікації існуючих технологій, зокрема шляхом підвищення стійкості культивованих штамів до конкурентної мікробіоти та захисту грибних компостів від контамінації сторонньою мікрофлорою за допомогою дієвих фунгіцидів. Збільшення виробництва печериць (*Agaricus bisporus*), зокрема за останній рік на

8%, потребує збільшення виготовлення посівного матеріалу та нових пропозицій стосовно інтенсифікації технологій його отримання.

Мета досліджень полягає в науковому обґрунтуванні й покращенні окремих етапів промислового культивування *Agaricus bisporus*, для збільшення продуктивності виробництва і одержання міцелію та грибів належної якості.

Для досягнення мети були поставлені такі **завдання**:

1. Виділити та дослідити культури патогенних мікроміцетів з уражених плодових тіл *Agaricus bisporus*, зібраних на грибних господарствах України.
2. Дослідити стійкість промислових штамів *Agaricus bisporus* до конкурентної мікробіоти, зокрема мікофільних мікроміцетів та підібрати максимально дієві фунгіцидні препарати для запобігання їхнього розвитку в умовах виробництва печериці.
3. Розробити практичні рекомендації з культивування вегетативного міцелію для підготовки якісного посівного матеріалу для промислового виробництва *Agaricus bisporus* на грибівницькому комплексі «Гелека-М» м. Одеса, Україна

Новизна одержаних результатів. Результати експериментальних досліджень розширюють знання про антагоністичні взаємовідносини між базидієвим грибом *Agaricus bisporus* та мікофільними мікроміцетами *Cladobotryum spp.* Намічені шляхи модернізації технології вирощування печериці в промислових обсягах з метою запобігання втрат від розвитку контамінуючої мікробіоти шляхом використання підібраних дієвих фунгіцидів. Розроблені практичні рекомендації щодо застосування якісного посівного матеріалу, вирощеного глибинним способом.

Апробація результатів роботи. За результатами роботи було опубліковано статтю у фаховому науковому журналі «Український ботанічний журнал» та тезу у матеріалах 86 Міжнародної наукової конференції молодих учених, аспірантів і студентів "Наукові здобутки молоді – вирішенню проблем харчування людства у XXI столітті" (2-3 квітня 2020 р., м. Київ).

ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД

РОЗДІЛ 1. Перспективи використання грибів роду *Agaricus*

В наш час перспективними і надзвичайно важливими є розробка способів отримання екологічно чистих харчових продуктів і лікувально-профілактичних медичних препаратів на основі використання природних запасів лікарської сировини з імуностимулюючою, онкостатичною, радіопротекторною та загальнозміцнюючою дією, оскільки це є однією з найактуальніших проблем в Україні та світі. Біомаса грибів є джерелом багатьох корисних біологічно активних речовин. Компонентами міцелію грибів є білки, полісахариди, ліпіди, нуклеїнові кислоти, низькомолекулярні органічні речовини та мінеральні елементи. Найбільша частина вирощуваних у світі грибів є представниками класу *Agaricomycetes*.

Формування філогенетичного дерева агарикоміцетів дозволило з'ясувати, що *Agaricomycetes* – це клас відділу *Basidiomycota* що містить 21000 описаних видів, що є однією п'ятою з усіх відомих грибів. Крім того, більшість їстівних грибів - це агарикоміцети, включаючи культивовані сапротрофи, такі як *Agaricus bisporus*, *Pleurotus ostreatus*, *Lentinula edodes*, *Cantharellus cibarius*, *Tricholoma matsutake* [4]. Більшість представників даного класу є достатньо вивченими. Найбільша увага приділяється родині *Agaricaceae*, оскільки до даної родини належить найбільш культивований гриб у всьому світі *Agaricus bisporus*. Проте крім нього, до даної родини належить велика кількість грибів, які є перспективними джерелами біологічно активних речовин. Для наведення перспектив використання грибів, які забезпечують потреби людини, наведемо коротку характеристику найбільш вивчених грибів роду *Agaricus*.

Значна кількість публікацій присвячена *Agaricus blazei*, який є їстівним грибом з виявленими сприятливими наслідками для здоров'я, такими як профілактика діабету, гіперліпідемії, артеріосклерозу та хронічного гепатиту. У

					НУХТ БТЕК 04.01.04 КР ПЗ						
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата							
Розроб.		Бондурук С.В.			Розділ 1. Перспективи використання грибів роду <i>Agaricus</i>			Літ.	Арк.	Акрушів	
Перевір.		Красінько В.О.								8	8
Консульт.		Аль-Маалі Г.А.						Кафедра БТМ			
Н. Контр.											
Затверд.		Пирог Т.П.									

традиційній медицині широко використовується *A. blazei* у вигляді лікарського екстракту для профілактики та лікування раку, оскільки він проявляє сильні імуномодулюючі властивості. У дослідженні [5] було встановлено позитивний вплив водного екстракту лікарського гриба *A. blazei* на окислювальний стан та функціональність мітохондрій мозку старих щурів (21 місяць). Ця тема є актуальною через дисфункції мітохондріальних дихальних ланцюгів та підвищений окислювальний стрес, які є вражаючими явищами у мозку людей похилого віку. Даний базидіоміцет володіє антиоксидантними та антидіабетичними властивостями [6]. Крім того, у біомасі *A. blazei* міститься велика кількість вітамінів [7].

Екстракт *A. blazei* здатний забезпечити певний ступінь захисту від ураження парацетамолу в печінковій тканині та в тканині мозку. Було експериментально встановлено, що попередня обробка *A. blazei* значною мірою запобігла підвищенню рівня печінкових ферментів у плазмі крові. Крім того, попередня обробка препаратами *A. blazei* при травмуванні парацетамолом у щурів виявила здатність підвищувати рівень каталази [8].

Полісахарид виділений із *A. blazei*, β -глюкан має біологічні властивості, що стимулюють імунну систему та можуть запобігти хронічним патологіям, включаючи рак. Показано, що він запобігає пошкодженню ДНК, спричиненому хімічними та фізичними агентами, яким піддаються люди. Метою дослідження [7] було перевірити захисну дію β -глюкану на експресію генів ERCC5 (бере участь у відновленні пошкоджених ДНК), CASP9 (бере участь в апоптозі) та CYP1A1 (бере участь у метаболізмі ксенобіотиків) використовуючи ПЛР та проводячи вимірювання метаболічного профілю на лінії клітин HepG2. Цей результат демонструє, що лікування β -глюканом мало захисний ефект [9]. Також було встановлено цитотоксичний ефект *A. blazei* [10].

В дослідженні [11] вивчали вплив водних екстрактів *A. blazei* на міграцію нейтрофілів, рівень фагоцитозу та утворення реактивних видів кисню з використанням лінії клітин нейтрофілів морської свинки. Було також проаналізовано вплив вживання екстракту *A. blazei* на перебіг малярії [12]. Крім

того, у публікаціях [13, 14] було проведено клінічне дослідження на наявність імуномодуючих властивостей препарату, який на 82 % представлений екстрактом *A. blazei*.

Антимікробні властивості *A. blazei* були підтверджені у більшості експериментальних дослідженнях *in vitro* та *in vivo* на мишах, але варто зазначити, що в цій групі зразків грибний екстракт здійснював дію проти мікроорганізмів, що спричиняють смертельні інфекції, спричинені пневмококами та фекальним перитонітом. Результати досліджень підтвердили антимікробну активність екстрактів гриба *A. blazei*, які здебільшого виявили більшу чутливість грампозитивних бактерій до зазначеного екстракту (порівняно з грамнегативними бактеріями), а саме: *Salmonella typhi*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes* та колиформні бактерії. Дослідники виявили, що в грибах є кілька протимікробних речовин, представлених низькомолекулярними сполуками, які є переважно вторинними метаболітами, такими як терпени, сесквітерпени та інші стероїди, антрахінони, похідні бензойної кислоти та хінолін, а також первинні метаболіти, такі як щавлева кислота. Однак пептиди та білки вважаються основними антимікробними сполуками з високою молекулярною масою, що є в грибах [15].

Досить активно досліджується і такий представник роду *Agaricus* як *Agaricus brasiliensis*. У статті [16] досліджували антигенотоксичну та антикластогенну активність екстрактів *A. brasiliensis*, отриманих при різних температурах інфузій при 4 ° C та 25 ° C. Отримані результати показали, що вплив *in vitro* периферичних лімфоцитів на *A. brasiliensis* не спричинив ні генотоксичного, ні кластогенного ефекту, але виявляв антигенотоксичну активність. Екстракт *A. brasiliensis*, отриманий при різних температурах, був ефективним для зменшення пошкодження ДНК, у лімфоцитах периферичної крові, оброблених *in vitro*, і зниження хромосомної аберації було більш значним, коли клітинні культури оброблялися екстрактом, отриманим при 25 °C [16]. Було також досліджено ефективність застосування *A. brasiliensis* для лікування

цукрового діабету у щурів [17]. До складу *A. brasiliensis* належать біоактивні сполуки, які можуть діяти як антибіотики, бактеріостатичні, фунгістатичні та нематостатичні речовини. Тому було здійснено дослідження впливу міцеліальної суспензії *A. brasiliensis* на ооміцет, який є шкідником виноградників [18].

Пошук нових речовин з антимікробними властивостями є досить актуальним, тому дані дослідження досить часто проводяться і з представниками роду *Agaricus*. Антимікробну активність метанольного екстракту, отриманого з плодових тіл *Agaricus lanipes*, було протестовано вченими [19] проти трьох грампозитивних бактерій, трьох грамнегативних бактерій та одного виду дріжджів. Як викладено в статі, метанольний екстракт *A. lanipes* при тестовій концентрації виявляв антимікробну дію проти всіх досліджуваних штамів мікроорганізмів, утворюючи зони гальмування 11–22 мм. Значення зони інгібування, отримані в дослідженні, були найбільшими для бактерії *Micrococcus luteus* NCIBM (22 ± 1 мм, діаметр зони інгібування), яка виявила найбільшу чутливість до екстракту, і найменше для бактерії *Escherichia coli* ATCC 35218 (11 ± 0 мм, діаметр зони гальмування), який показав найнижчу чутливість. Поряд з бактеріальними видами було показано, що дріжджовий вид *Candida albicans* ATCC 10231 чутливий до екстракту *A. lanipes* (19 ± 1 мм, діаметр зони інгібування). Спостерігалось, що екстракт *A. lanipes* мав протимікробну дію проти всіх штамів мікроорганізмів даних тестів.

Вченими встановлено, що різні екстракти видів *Agaricus bisporus*, *Agaricus bitorquis*, *Agaricus essettei*, *Agaricus silvicola* та *A. brasiliensis* з родини *Agaricaceae* виявили протимікробну дію проти різних мікроорганізмів, таких як *M. luteus*, *S. aureus*, *B. subtilis*, *Proteus vulgaris*, *Yersinia enterocolitica* та *C. albicans*; однак, екстракт *A. lanipes* у даному дослідженні додатково виявив протимікробну дію, хоч і незначну, проти бактерії *E. coli* [19].

Дослідження [20] доводить, що неочищені екстракти *Agaricus spp.* не могли кількісно перешкоджати росту грамнегативних бактерій, в той час як це перешкоджало росту грампозитивних бактерій залежно від дози. Серед грампозитивних бактерій золотистий стафілокок значно інгібувався екстрактами

культивованих та диких штамів *A. bisporus* з MIC₅₀ 0,18 та 0,039 мг/мл відповідно, тоді як його менше 30% інгібували *Agaricus devoniensis* та *Agaricus gennadii* в 1,25 мг/мл *Enterococcus faecalis* та *B. cereus* в основному сприйнятливі до культивованого *A. bisporus*.

A. devoniensis та *A. gennadii* виявляли незначну гальмівну дію лише відносно золотистого стафілокока. У дослідженні шість різних фракцій елюювали з неочищеного екстракту культивованого *A. bisporus* шляхом ступінчастого градієнтного елюювання, з яких дві фракції здійснювали кількісно вимірювану антибактеріальну активність. На відміну від неочищеного екстракту, ці дві фракції значно інгібували як грампозитивні, так і грамнегативні бактерії, зокрема *E. coli* в дозі 8 мг/мл. Ці фракції можуть перспективно мати біоактивні сполуки і вимагати подальших досліджень для розробки нових антимікробних препаратів, отриманих з *A. bisporus* [20].

Значний потенціал проявляє *Agaricus campestris*, який проявляє досить значні цитотоксичні, антиоксидантні та антимікробні властивості [21]. Також у дослідженні [22] було встановлено імуномодулюючі властивості *Agaricus subrufescens*.

Потенціал *A. bisporus* як антимікробного/грибкового засобу є високим, але глибокі дослідження щодо видобутку, широкого тестування організмів на антимікробну чутливість, з'ясування біоактивних сполук та пов'язаного з ними механізму дії відсутні та повинні бути враховані.

Неочищені екстракти, отримані з *A. bisporus*, у різних експериментах показали антибактеріальну активність відносно грампозитивних (*S. aureus*, *B. cereus*, *Micrococcus flavus* та *L. monocytogenes*) та грамнегативних бактерій (*Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *E. coli* та *Enterobacter cloacae*). Однак зазначена ефективність значною мірою була пов'язана з методами екстрагування на основі розчинника, які демонстрували велику різницю в урожаєх та антибактеріальній та протигрибковій активності [23, 24, 25]. Екстракти *A. bisporus*, приготовані різними розчинниками, значно інгібують кишковою паличкою та золотистим стафілококом. Ці результати обіцяють

запропонувати подальше застосування екстрактів *A. bisporus* як функціональної харчової добавки [26].

Гриб володіє антиоксидантними властивостями та містить цінні грибні полісахариди (глюкани, хітин). Етанольні екстракти, приготовані з *A. bisporus*, є багаті ергостеролом, та володіють властивостями для застосування в базовому кремні для косметики, оскільки ергостерол, кислоти та інші поліфеноли виявляли хорошу стійкість після їх включення до базових продуктів. Крім того, рецептура з екстрактами *A. bisporus* підтримувала хорошу антиоксидантну та протизапальну активність шляхом інгібування продукції NO та меланіну за рахунок пригнічення активності тирозинази [23].

Екстракти *A. bisporus* багаті на вторинні метаболіти, такі як феноли, флавоноїди, аскорбінова кислота, β -каротин та лікопін. *A. bisporus* є потенційним природним джерелом фенолів, які, як відомо, є ефективними антиоксидантами [27]. Хімічне дослідження дихлорметанового екстракту *A. bisporus* призвело до виділення ергостеролу, брасікастеролу, трилінолеїну та лінолевої кислоти [28].

У публікації [29] етанольний екстракт *A. bisporus* та *A. brasiliensis* тестували на пригнічення росту *L. monocytogenes* в йогурті. Обидва види виявились хорошим джерелом біоактивних сполук. *A. brasiliensis* був багатшим на поліненасичені жирні кислоти та виявляв високу концентрацію фенольних кислот та токоферолів. *A. bisporus* показав більш високий вміст мононенасичених жирних кислот та ергостеролу. *A. brasiliensis* виявив найвищий антиоксидантний потенціал, а його етаноловий екстракт виявив найвищий антибактеріальний потенціал; метаноловий екстракт *A. bisporus* виявив найвищу протигрибкову активність. *A. brasiliensis* володів кращими консервуючими властивостями в йогурті.

У статті [30] було проведено визначення комерційного штаму *A. bisporus*, який проявляє найбільші антиоксидантні властивості та визначено мінеральний склад грибів. У дослідженні [31] здійснено визначення антиоксидантних властивостей та антибактеріальний скринінг хітозану з *A. bisporus in vitro* щодо вибраних клінічних ізолятів. Зона гальмування виділеного хітозану виявляє

найвищу активність у відношенні до *B. subtilis*, *P. aeruginosa*, *K. pneumonia* та *Acinetobacter baumannii*. Вчені припускають, що *A. bisporus* виступає потенційним джерелом для отримання екологічно чистих хітину та хітозану при розробці ліків, штучної кістки та сировини для харчової промисловості найближчим часом. Також із культуральної рідини *A. bisporus* було екстраговано екзополісахариди, які мають сприятливу антиоксидантну активність *in vitro*, протидіабетичну дію на мишей, діабетиків. Екзополісахарид з *A. bisporus* може бути новим ресурсом природних антиоксидантів та протидіабетичних засобів для використання у функціональній їжі чи ліках [32].

Крім хітину та хітозану активно досліджується і такі грибні білки як лектини. При проведенні досліджень на мишах [33] було встановлено, що лектини виділені із *A. bisporus* мають імуномодулюючий ефект *in vivo*, зменшуючи вроджені та адаптаційні реакції. Зазначений лектин демонструє потенційне терапевтичне застосування для контролю запальних аутоімунних патологій. Також, встановлено що при вирощуванні на целюлозному субстраті *A. bisporus* може бути потенційним джерелом такого ферменту як β -глюкозидаза [34].

Досить важливим є те що вживання *A. bisporus* позитивно впливає на стан мікробіоти кишечника [35].

Таким чином, проаналізувавши сучасну літературу можна зрозуміти, що в даний час визначення корисних властивостей грибів є досить перспективним. Такі дослідження дають можливість відкрити нові джерела біологічно активних речовин з імуностимулюючими, антиоксидантними, протидіабетичними та антимікробними властивостями. Надзвичайно велика увага приділяється саме вивченню антимікробних властивостей різних екстрактів грибів роду *Agaricus*, оскільки зараз стає все більш поширеним явище резистентності бактерій до антибіотиків.

Для кращого аналізу результати наведемо у вигляді табл. 1.1.

Властивості грибів роду *Agaricus*

Вид	Цінні властивості	Джерело інформації
<i>A. blazei</i>	Імуномодуючі, антиоксидантні, антидіабетичні, цитотоксичні, антимікробні, джерело вітамінів, полісахаридів	[5, 6, 7, 8, 9, 10, 15]
<i>A. brasiliensi</i>	Антигенотоксичні, антимікробні, антиоксидантні, джерело бактеріостатичних та фунгістатичних речовин	[16, 17, 18]
<i>A. bitorquis</i> , <i>A. essettei</i> , <i>A. silvicola</i> , <i>A. lanipes</i> , <i>Agaricus spp.</i> , <i>A. devoniensis</i> , <i>A. gennadii</i>	Антимікробні	[19, 20]
<i>A. campestris</i>	Цитотоксичні, антиоксидантні, антимікробні	[21]
<i>A. subrufescens</i>	Імуномодуючі	[22]
<i>A. bisporus</i>	Антимікробні, антиоксидантні, протизапальні, джерело фенолів, флавоноїдів, аскорбінової кислоти, β -глюкозидази, β -каротину, лікопіну, ергостеролу, лінолевої кислоти, хітину, хітозану, лектинів	[23, 24, 25, 26, 28, 31, 32, 34]

Зважаючи на усі наведені перспективи використання грибів роду *Agaricus*, досить вигідним стає їх вирощування. Проте представники даного роду є надзвичайно вимогливими до умов вирощування та чутливими до сторонніх мікроорганізмів. Тому для отримання якісних грибів необхідно визначити джерела забруднення та збудників захворювань. Крім того, надзвичайно актуальним питанням є пошук способів боротьби із шкідниками грибів. Більшість шкідників викликає захворювання цілої родини, тому доцільно розглянути джерела забруднення та збудників захворювання для найбільш культивованого гриба *A. bisporus*.

РОЗДІЛ 2. Характеристика збудників хвороб *Agaricus bisporus* та шляхи боротьби з ними

2.1 Хвороби печериць та джерела контамінації

В Україні значно поширеним є вирощування печериць як на грибних фермах так і у приватних господарствах. Проте, для того щоб виростити придатні для продажу гриби необхідно щоб вони були безпечними для споживання. Варто зазначити, що печериці є досить вразливими іншими організмами. Найпоширенішими хворобами печериць є: суха гнилизна або вертицильоз; мокра або біла гнилизна; павутинна цвіль; бактеріальна плямистість та муміфікація. Таким чином, збудниками є мікроміцети, бактерії та віруси.

Міри боротьби із грибними, вірусними й бактеріальними хворобами:

- строге дотримання санітарно-гігієнічних вимог у культивацийному приміщенні й чистоти довкола нього;
- дезінфекція покривного матеріалу;
- строге дотримання режиму вентиляції культивацийного приміщення;
- підтримування необхідної температури й вологості повітря в період вирощування печериць;
- негайний збір і знищення хворих плодових тіл разом з міцелієм;
- термічна обробка приміщення наприкінці вирощування культури;
- дезінфекція культивацийного приміщення;
- використання безвірусного посівного матеріалу.

З метою профілактики хвороб необхідно проводити заходи боротьби із патогенами: своєчасна діагностика збудників, вибраковка хворих плодових тіл, застосування антипатогенних біологічних препаратів, підбір стійких до захворювань видів та штамів грибів. Крім того, необхідно встановлювати, що є джерелом контамінації.

Існує велика імовірність використання посівного матеріалу вже враженого

					НУХТ БТЕК 04.01.04 КР ПЗ				
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата					
Розроб.		Бондарук С.В.			Розділ 2. Характеристика збудників хвороб <i>Agaricus bisporus</i> та шляхи боротьби з ними	Літ.		Арк.	Акрушіє
Перевір.		Красінько В.О.						166	445
Консульт.		Аль-Маалі Г.А.				Кафедра БТМ			
Н. Контр.									
Затверд.		Пирог Т.П.							

міцеліальної маси *Agaricus bisporus*. Найчастіше як посівний матеріал використовують зерновий міцелій. Для приготування посівного міцелію використовують зерно злакових культур: пшениці, проса, жита, вівса, ячменю, кукурудзи, рису та інших. У той же час, один грам рису, який також застосовується для вирощування посівного матеріалу, містить близько 50 000 – 100 000 клітин бактерій, більш ніж 200 000 актиноміцетів, 12 000 спор грибів і значну кількість клітин дріжджів. Таким чином, щоб стерилізувати 1 г зерна, слід знищити більш ніж 300 000 клітин-антагоністів. Для унеможливлення контамінації сторонньою мікробіотою основні вимоги такі: зерно не повинно мати будь-яких грибних та бактеріальних захворювань, а приготування посівного міцелію – відповідати технологічному регламенту. Перевагами зернового посівного матеріалу є те, що одна зернина – одна точка проростання й зручність використання. Ураження чистих культур грибною або бактеріальною інфекцією унеможливає його подальше використання для засіву компосту, а у разі невчасного виявлення спричиняє значне ураження субстратів інфекцією та призводить до захворювання плодових тіл печериці, що зменшує загальну урожайність. Чиста культура їстівного гриба це необхідна і обов'язкова передумова його успішного зберігання, відтворення і промислового культивування.

Зазвичай, шляхами ураження посівного міцелію є: зерно, забруднені ємності для пророщування зерна, забруднене приміщення, несправний фільтр ламінарного боксу або загальної вентиляції лабораторії, інструмент, одяг. При цьому джерелами забруднення можуть бути: працівник, повітря, середовища, інструменти, материнська культура, рухомі контамінаційні часточки.

У статті [36] наведено дані щодо досліджень зразків зерна пшениці та жита. Авторами було виявлено їх значну зараженість мікроміцетами, що становило відповідно 55,0 і 79,5% (табл. 2.1). Причиною високої заселеності зерна грибами можуть бути порушення технології вирощування рослин та зберігання його.

**Мікроорганізми, вилучені із зерна, що використовується для
приготування посівного міцелію [36]**

Мікроорганізми	Зерно пшениці	Зерно жита
Зараженість насіння хворобами,%	55,0	79,5
Бактеріоз,%	1,5	9,0
Альтернаріоз (<i>Alternaria</i> sp.),%	27,0	65,5
Фузаріоз (<i>Fusarium</i> sp.),%	1,5	0,5
Зелене пліснявіння (<i>Penicillium</i> sp.),%	25,0	4,5
Здорове насіння,%	45,0	20,5
<i>Absidia</i> sp.	0,5	Не виявлено
<i>Aspergillus</i> sp.	4,0	Не виявлено
<i>Cladosporium</i> sp.	4,0	Не виявлено
<i>Chaetomium</i> sp.	1,0	Не виявлено
<i>Nigrospora</i> sp.	Не виявлено	1,5
<i>Papularia</i> sp.	0,5	2,5
<i>Rhizopus</i> sp.	0,5	Не виявлено
<i>Trichoderma</i> sp.	1,0	0,5
Не визначені*,%	3,0	6,0

Примітка: * під час дослідження було відсутнє спороношення

Загалом із зерна пшениці і жита було вилучено мікроміцети 14 родів. Найбільш представленими виявились гриби родів *Alternaria* Nees і *Penicillium* Link. Серед ідентифікованих мікроміцетів були небезпечні конкуренти міцелію печериці, які за умов недостатньої стерилізації зерна, можуть розвиватись під час вирощування зернової грибниці, спричиняти появу хвороб посівного міцелію та впливати на його чистоту. Це представники родів *Alternaria*, *Penicillium* та *Trichoderma* Pers. Зерно жита порівнянно із зерном пшениці найбільше заражувалось бактеріозом та альтернаріозом, що спричиняє чорне пліснявіння міцелію відповідно 9,0 і 65,5%, а зерно пшениці - пеніцилами (25,0%), що є небезпечними збудниками зеленої плісняви посівного міцелію. Високий

відсоток зараження зерна цими мікроміцетами негативно впливав на розвиток посівного міцелію. Зерно обох культур було заражено триходермою, яка також є збудником небезпечної зеленої плісняви, що становив 1,0 і 0,5%.

Дослідження показали, що спори пеніцилів виживають після стерилізації зерна і впливають на його чистоту. Під час використання такого зерна, контамінація посівної грибниці мікроміцетами роду *Penicillium* коливалась в межах від 1,0 до 65%. Серед ідентифікованих мікроміцетів на зерні пшениці спостерігали також рід *Absidia* Tiegh., представники якого за літературними даними, належать до термотолерантних, що можуть виживати під дією високих температур стерилізації, і є забруднювачами лабораторій, у тому числі мікробіологічних. Надалі, *Absidia* sp. була виявлена під час обростання зернового субстрату міцелієм печериці двоспорової, що мало негативний вплив на його ріст [36].

Для вирощування грибів печериці двоспорової одним із джерел інфекції в технологічному процесі також є поливна вода, яка спонукає патогени різної природи циркулювати у виробничих приміщеннях. При цьому вода заносить до компосту плодових тіл та інших компонентів аллохтонні та автохтонні мікроорганізми і віруси. Наприклад, при аналізі забірної води із резервуарів для поливу виявлено: бактерії – *E.coli*, *B.cereus*, *P.aeruginosa*, мікроскопічні гриби – *A. flavus*, *P. funiculosum*; віруси та вірусоподібні частки – 25-30нм (не ідентифікуються щодо фітовірусів, ВТМ (*Tobamovirus*), Y-вірус (*Potyvirus*) [37].

Крім того, компост який використовується для вирощування печериць має досить високий рівень бактеріальної та грибної контамінації. Серед бактерій найбільш поширеними є представники родів *Solibacillus*, *Comamonas*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Sphingomonas*, *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Clostridia* and *Proteobacteria*, *Thermus thermophilus*. Серед актиноміцетів поширеними є *Corynebacterium* і *Streptomyces*. Серед грибів у компості виявляються *Lewia*, *Rhizomucor*, *Aspergillus*, *Talaromyces*, *Thermomyces*, *Thermus*, *Mycothermus thermophilus* та *Chaetomium thermophilum*. Дані організми є корисними для комерційного вирощування *A. bisporus*. Вони розщеплюють легкодоступні

сполуки і вивільняють аміак, а потім здійснюють перетворення целюлози та геміцелюлози в продукти, які є основним джерелом живлення для *A.bisporus*. Вважається, що бактеріальні таксони сприяють подовженню гіф *A.bisporus*, а бактеріальна активність необхідна для індукції вирощування плодоносних тіл грибів під час посіву. Спроби виділення бактерій, що сприяють зростанню грибів, для комерційного виробництва грибів ще не були успішними. Компостні бактерії та гриби також завдають економічно важливих втрат у процесі посіву, спричиняючи низку руйнівних захворювань гіф грибів та плодоношення. В компості крім «корисних» організмів можуть знаходитися і патогенні для *A.bisporus* [38, 39, 40].

Під час вирощування печериць можливе використання біодобрих. Одним із варіантів біодобрих для промислового вирощування печериць є бактеріальні інокулянти *A. faecalis* та *B. subtilis*, що додаються у ґрунтові ґрунти, підготовлені з різних базових матеріалів. Доведено їх стимулюючий вплив на ріст *A.bisporus* [41].

Таким чином, проаналізувавши джерела і шляхи контамінації *A.bisporus* під час промислового культивування, можна зробити висновок, що найбільший негативний ефект можуть мати гриби роду *Trichoderma*, які можуть потрапити на виробництво з неякісним посівним матеріалом. Крім того, велику увагу потрібно звертати на якість поливної води на виробництві. Значну роль у вирощуванні *A.bisporus* на компостній сировині відіграють мезофільні та термофільні мікроорганізми, які розщеплюючи целюлозу, роблять субстрат готовим до вирощування *A.bisporus*. Також варто відмітити позитивний вплив на ріст культури при використанні біодобрих, які представлені культурами *A. faecalis* та *B. subtilis*, які стимулюють ріст *A.bisporus*.

2.2. Вірусні захворювання *Agaricus bisporus*

Вірусні інфекції, як правило, безсимптомні та стійкі. Для культури *A. bisporus* описано понад десять патогенних вірусів, для ідентифікації яких практично відсутні високочутливі методи. На сьогодні в Україні практично не існує молекулярно-біологічних діагностиків для ідентифікації міковірусів, які

уражують печериці. Доведено, що за вірусного захворювання плодові тіла грибів змінюються морфологічно, втрачаючи при цьому свої смакові якості і нерідко стають небезпечними для вживання. Також вони не тільки знижують урожай печериць, а й призводять до повної загибелі міцелію. В результаті аналізу дЛРНК, які виділені з плодових тіл печериці, встановлено наявність вірусної інфекції. Для інтенсифікації промислового виробництва печериць на безвірусній основі і запобігання розповсюдження міковірусів – рекомендується на ранніх етапах проводити комплексну діагностику міцелію на вірусоносійство з використанням досліджень діагностичних тест-систем на основі ПЛР [42].

Множинні вірусні інфекції часто протікають безсимптомно, представляючи стійкі статичні способи життя, які здаються доброякісними, симбіотичними або, можливо, корисними для господаря. Для грибів вірусна інфекція передається переважно шляхом цитоплазматичного обміну після контакту між клітинами, а початкові інфекції від вільних неклітинних вірусів було важко продемонструвати лише одним прикладом, вірусом ДНК грибової інфекції. Множинні вірусні інфекції включають численні взаємодії між самими вірусами, господарем та навколишнім середовищем, внаслідок чого змінюються як на молекулярному, так і в популяційному рівнях, що може призвести до переходу способу життя від стійкого до гострого, що призводить до фенотипу захворювання.

A. bisporus може страждати від економічно згубних вірусних захворювань, таких як хвороба La France та грибний вірус X (MVX). Хвороба La France має симптоми затримки росту та спотворення плодових тіл і асоціюється з ідентифікованими частинками та вірусом 9 сегменту, AbV121. Хвороба MVX - це збірна назва суміші симптомів (пожовтіння плодових тіл, затримка росту плодів і їх спороутворення), пов'язаних з 30 дРНК. Передбачається, що ці РНК є некапсульованими вірусними геномами, оскільки вірусних частинок не спостерігалось, хоча виявили докази пакування вірусу РНК у мембранні везикули. Помітно різні рівні РНК з низькою молекулярною масою (> 103-кратна різниця) спостерігалися у сусідніх несимптоматичних та хворих плодів

A. bisporus, приєднаних до тієї ж міцеліальної мережі, що свідчить про просторово-відокремлений, вірусний перехід життєвого типу, стійкі до проникливого.

Було виділено 30 різних вірусних РНК із фруктових тіл грибів *A. bisporus*, охарактеризовано та класифіковано філогенетично. Три з тридцяти раніше були описані або секвеновані: вірус грибних бактеріоформ, MBV, *A. bisporus* Endornavirus 1, AbEV127 та сферичний вірус *A. bisporus*, AbSV. В результаті виявлення 18 вірусів РНК та 8 ВРЗ (відкритих рамок зчитування) шляхом глибокого секвенування було виявлено множинні вірусні інфекції у грибних плодових тілах *A. bisporus*.

Віруси є філогенетично виразними, більшість з низькою схожістю з будь-яким описаним раніше вірусом і не були ні супутниковими, ні дефектними РНК. Незважаючи на множинні вірусні інфекції, культура *A. bisporus* росте і розмножується, споживаючи поживні речовини зі складного субстрату і утворюючи тіла, що у літературі пояснюється ефективними стратегіями спільного існування та адаптаційними механізмами [43]. Деякі зразки виявляли лише слабкі ознаки виснаження симптоми буріння плодових тіл, спричинені утриманням 17–24 вірусних РНК (вірусів та частини РНК без подібності до відомих послідовностей). Аналогічно 10–17 вірусних РНК, виявлених у грибних тілах, вирощених із субкультур, та 8 вірусних РНК у комерційній культурі характерні для вірусів із стійким життєвим стилем та низькими впливом на хазяїна. Крім того, геном *A. bisporus* містить компоненти вірусних захисних механізмів.

Розміри множинних інфекцій, про які повідомляється, свідчать про різноманітну, динамічну та інтерактивну екосистему із зміною послідовностей, альтернативним сплайсингом, горизонтальним перенесенням генів та змінною числа фрагментів. Як правило, міковіруси не мають зараженості як позаклітинні вільні частинки, однак один звіт продемонстрував зараження очищеним ДНК-міковірусом [43]. Ця відсутність зараженості свідчить про те, що початкові

інфекції *A. bisporus* можуть бути давніми і поширеними в 17 столітті і, ймовірно, являють собою численні, окремі події зараження.

Вирощування *A. bisporus* – це міжнародний бізнес, який передбачає переміщення комерційних культур, колонізованого компосту та грибних плодових тіл на великі відстані, і все це, ймовірно, збільшить резервуари зараженого матеріалу та посилить розповсюдження вірусів, що призведе до спільного зараження вірусами, відокремленими раніше географічно. Передача вірусу від диких до культивованих культур *A. bisporus*, ймовірно, відбувалася через повітряні гіфи та спори. Довговічність базидіоміцетних грибів у дикій природі, їх схильність до вегетативного росту та природна витривалість сприяли б довготривалому виживанню міцелію, зараженого вірусом, у навколишньому середовищі [43].

Одним із шляхів запобігання вірусних інфекцій є власне її виявлення, яке рекомендується проводити методом хроматографічного очищення дЛРНК, що забезпечує якісне проведення діагностики й ідентифікації РНК-вмісних вірусів у мікроскопічних та їстівних грибах. Модифікована методика може широко застосовуватись для виявлення вірусних захворювань культур *A. bisporus* [44].

2.3. Бактеріальні захворювання *Agaricus bisporus*

Існує кілька флуоресцентних псевдомонад, здатних викликати захворювання *A. bisporus*. Серед них *Pseudomonas tolaasii* – найпоширеніший бактеріальний збудник, що викликає темно-коричневу пігментацію, ураження на шапках і стеблах, що призводить до зниження врожаю, якості та скорочення терміну зберігання. Крім того, симптоми темно-коричневої пігментації плямистості на *A. bisporus*, які проявляються світло-коричневим пігментаціями, можуть бути також спричинені *P. reactans*, *Pseudomonas* sp. штам NZ17, очевидно, пов'язаний з *P. syringae* та *P. costantinii* sp.nov. Збудниками інших видів плямистості *A. bisporus* є *P. gingeri* та *P. agarici*. Крім того, існують публікації, у яких повідомлено, що ряд різноманітних видів псевдомонад, окрім відомих збудників «плямистих хвороб» (*P. tolaasii*, *P. gingeri* та *P. reactans*),

також мають здатність викликати захворювання з плямами з різними знебарвленнями.

Після виділення із симптоматичних проб було отримано понад сто бактеріальних ізолятів. Для тестів на патогенність було відібрано сорок п'ять зелених флуоресцентних, грамнегативних ізолятів з різних джерел та місць. Бактеріальні ізоляти виявили різний ступінь знебарвлення і деградації тканин на кубиках грибів, змінюючи колір матеріалу від світло-темно-коричневого. Тридцять шість бактеріальних ізолятів викликали проникаючі коричневі ураження на блоках тканини шапки *A. bisporus* через 72 год, що відповідає явленому штаму *P. tolaasii*. Решта ізолятів спричиняли появу світло-коричневого поверхневого кольору як на тканинних блоках, так і на спорофорах, подібних до референтного штаму *P. agarici*.

Результати досліджень показали, що *P. tolaasii* була переважаючою бактерією, асоційованою з симптомами коричневого забарвлення на *A. bisporus*, що не є несподіваним, враховуючи, що *P. tolaasii* був визнаний найпоширенішим збудником хвороб грибів, які спричиняють значні втрати в процесі вирощування. Однак останні дослідження показали, що бура пляма *A. bisporus*, викликана *P. tolaasii*, є складним захворюванням, оскільки деякі інші види псевдомонад також мають здатність викликати симптоми плямистості при різних рівнях забарвлення. Крім того, тести на патогенність у дослідженні також показали відмінності в рівні забарвлення тканини прищепленої грибної шапки, маючи на увазі, що деякі інші флуоресцентні псевдомонади брали участь у вираженні симптомів захворювання [45].

Отже, згідно літературних даних, серед збудників бактеріального походження у більшості випадків захворювання для *A. bisporus* спричиняють бактерії роду *Pseudomonas*, шкода від цих мікроорганізмів у більшості випадків викликає пігментацію печериць, зниження врожаю та погіршення якості грибів. Але такі хвороби не становлять великої небезпеки, оскільки їх досить легко знешкодити.

2.4. Грибні інфекції *Agaricus bisporus*

У літературі відмічено, що печериця надзвичайно чутлива до інфекції, яку індукують *Verticillium fungicola*, *Mycogone perniciosa*, *Trichoderma viride*, *T. konidii*. Порівняно з бактеріальною та вірусною інфекціями ця ситуація ураження більш вивчена, адже мікроскопічні гриби різних таксономічних груп у більшості випадків викликають специфічні симптоми ураження на плодових тілах, які спостерігаються візуально [37].

Павутинна хвороба, спричинена *Cladobotryum* sp., вважається одним з найбільш руйнівних грибних захворювань, що впливають на вирощування грибів у всьому світі, внаслідок чого спостерігають значні втрати врожаю та якості. Часті епідемії павутинної хвороби в Ірландії та Британії спричинені різними видами грибів, включаючи *Cladobotryum mycophilum*, *C. varium*, *C. dendroides* та *C. protrusum*. Серед них, *C. mycophilum* може викликати сильні симптоми павутиння у вирощуваних грибах, включаючи *Pleurotus eryngii*, *A. bisporus* та *Ganoderma lingzhi*. Крім того, деякі види *Cladobotryum* стійкі до фунгіцидів [46].

Симптомами захворювання павутинної хвороби є пухнастий міцелій білого кольору, що росте над кожухом або карпофорами, які швидко загнивають і стають гнилими. Цей пухнастий міцелій стає щільнішим через рясне спороношення, зрідка набуваючи жовто-рожеві відтінки зі старінням. Коричневі або сірі плямистості також можуть впливати на шапки грибів. Перші види плям із нечітким обрисом з'являються над зараженими ковпаками, коли шкідливі спори, що потрапляють у повітря, потрапляють на *A. bisporus* і проростають на його поверхню, тоді як сірі плями викликані інфекцією патогенним міцелієм. По мірі прогресування хвороби пошкодження міцелію патогенними грибами швидко зростало і поступово розширювалось, охоплюючи ніжки, шапки і примордії хазяїна. Врешті-решт, усі плодоносні тіла починають гнити, а частота захворювання становить від 5% до 8%. Згідно з дослідженнями, втрати врожаю, спричинені хворобою павутиння у комерційних штамів *A. bisporus*, коливаються від 10–29% до 22–62%. Коливання показників спричинено різними умовами

навколишнього середовища під час експерименту та різними використовуваними штамами.

Для запобігання економічним збиткам потрібна ефективна програма моніторингу та відповідні методи боротьби із захворюваннями. *Cladobotryum muscophilum* утворює велику кількість спор, які легко розсіюються повітрям на заводах, що може призвести до швидкого розвитку епідемій павутинної хвороби. Таким чином, заходи профілактики та контролю в основному можуть зосереджуватися на усуненні шляху передачі збудника шляхом посиленої гігієни та захист від вторинної інфекції [46, 47].

Trichoderma є збудниками хвороби зеленої цвілі на фермах грибів, спираючись на морфо-фізіологічні особливості, молекулярні характеристики, а також вірулентність. Хвороба зеленої цвілі грибів *A. bisporus* характеризується густим білим міцелієм швидкозростаючих колоній на оболонці міцелію або компості, що змінює колір на зелений після великого спороношення. Плями на плодоносних тілах *A. bisporus* є ранніми та супутніми симптомами. При серйозних спалахах не утворюються плодоносні тіла. До 1980-х років види триходерми розглядалися як незначна проблема, яка періодично спричиняла втрати на грибних фермах. Проте, епідемії зеленої цвілі спричинили величезні втрати у Великобританії та Ірландії протягом 1985–1986 рр. Незабаром цвіль виявилася в Нідерландах у 1994 р., Іспанії та Франції у 1997–1998 рр. На початку 1990-х зелена цвіль з'явилася на грибних культурах у Північній Америці, США та Канаді, що також завдало величезної шкоди виробництву грибів. Протягом останнього десятиліття хвороба зеленої цвілі *A. bisporus* поширилася в Угорщині, Польщі, Мексиці, Австралії та Хорватії [48].

Хвороба мокрої гнилі, одне з найбільш руйнівних грибкових захворювань, що впливає на комерційне вирощування *A. bisporus* у всьому світі, викликається *Mycogone perniciosa*. Мікопатоген прикріплюється та проникає до *A. bisporus* під час будь-якої стадії розвитку плодоношення організму, викликаючи характерні недиференційовані грудки примордіїв або колір плодоносних тіл змінюється на

коричневий. Ці пухлинні тіла вкриті вологими бульбашками, білим і пухнастим міцелієм, бурштиновими крапельками.

При комерційному вирощуванні *M. perniciosus* зазвичай може спричинити втрати врожаю приблизно на 15% - 30%, при розвитку хвороби мокрого міхура. Однак при важкій інфекції хвороби мокрого міхура втрати можуть досягати 50% - 60% або навіть призводити до втрати врожаю цілих грибних ферм [49].

Основні збитки спричиненні зазначеними мікофільними грибами пов'язані зі скороченням врожайності та погіршення якості плодових тіл, в основному за рахунок утворення бурої плямистості, зменшення площі поверхні, яку можна використовувати для вирощування грибів, а також з необхідністю дострокового припинення циклу культивування, для запобігання поширення інфекції.

Отже, на сьогоднішній день грибні інфекції суттєво впливають на отримання прибутку від комерційної діяльності, пов'язаної з вирощуванням *A. bisporus*. Найбільшу загрозу при цьому становить павутинна хвороба, спричинена *Cladobotryum* spp. яка може призвести до 28-40% втрати врожаю, саме тому важливим є пошук способів для профілактики та боротьби із даними шкідниками.

2.5. Боротьба із захворюваннями грибів

Контроль мікопатогенів в процесі культивування грибів заснований на використанні дуже обмежених активних речовин та методах захисту культури, які пов'язані із санітарними запобіжними заходами. Брак зареєстрованих хімічних речовин є проблемою в практиці. Інтегрована боротьба з хворобами застосовується при вирощуванні грибів, але є необхідність у пошуку нових селективних фунгіцидів та дешевих надійних дезінфікуючих засобах.

Захворювання регулярно зустрічаються та спричиняють втрату доходу в процесі культивування печериць: павутинна хвороба (*Cladobotryum dendroides*), хвороба мокрого міхура (*Mycogone perniciosus*), хвороба сухого міхура (*Lecanicillium fungicola*) та пліснява компосту зеленого кольору (*Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum*). У кожному випадку перший крок захисту грибів – це профілактика. Деякі виробники застосовують хімічні речовини регулярно, а не

використовують їх лише тоді, коли шкідники та хвороботворні мікроорганізми справді присутні в культурі. Щоб забезпечити належні гігієнічні умови з початку та починати лікувати вже заражені грибні культури, важливим є пошук активних агентів, які мають вибірковий характер, які було б легко ліцензувати, недорогі і прості у використанні у виробництві грибів [50].

Серед фунгіцидів для боротьби із захворюванням, що викликає *Cladobotryum mycophilum*, було виділено декілька таких, що мають значну ефективність. В процесі дослідження хлороталонілу, метрафенону, прохлоразу, тіабендазолу та тіофанат-метилу, було встановлено, що найкращий результат на пригнічення росту мікопаразита дає метрафенон та прохлораз. Показники селективності випробуваних фунгіцидів як на *C. mycophilum*, так і на *A. bisporus* вказував, що метрафенон був також найбільш селективним фунгіцидом, тоді як хлороталоніл був найбільш токсичним фунгіцидом проти міцелію *A. bisporus*, тому застосування цього фунгіциду є небажаним в процесі культивування гриба [51].

З метою профілактики та лікування *A. bisporus* проти грибкових захворювань, був здійснений пошук ефективних засобів серед природних сполук, а саме ефірних олій. Було встановлено, що застосування олій м'яти, кориці та пеларгонії повністю інгібували ріст усіх чотирьох патогенів – *Cladobotryum dendroides*, *M. perniciosus*, *Lecanicillium fungicola* і *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum*. Однак варто зазначити, що використання ефірних олій зумовлювало також й затримку росту грибних гіфів печериці [50].

У сучасній літературі наявна інформація про використання грибних екстрактів, у тому числі й *A. bisporus*, як засобів, що мають протигрибкову активність. В процесі дослідження було перевірено екстракти *A. bisporus* против шести грибів, що належать до п'яти родів: *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*, *Penicillium chrysogenum*, *Sporotrichum carnis*, *Humicola grisea* і *Thermoascus aurantiacus*. Результати дослідження показують, що екстракт *A. bisporus* має максимальне пригнічення проти *H. grisea* і мінімальне проти тих же грибів *A. flavus* [52].

Французькі вчені пропонують ще один засіб для боротьби з *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum*, яка є збудником зеленої цвілі. На даний час проведено лабораторні дослідження, які доводять ефективність використання біоплівки утвореної *Bacillus velezensis* QST713, яка входить до складу біопрепарату на основі антагоністично активних бактерій. Даний мікроорганізм вже тривалий час використовувався для захисту рослин та близьких до грибів організмів від хвороби зеленої цвілі. Крім того, проведено генетичні дослідження, що дозволило встановити гени, які відповідають за ці властивості мікроорганізму. Це робить перспективним перенесення таких генів у інші мікроорганізми, для створення промислового препарату [53, 54, 55].

Отже, проаналізувавши сучасну літературу можна зрозуміти, що пошук ефективних засобів для боротьби із хворобами грибів є досить поширеним і цим питанням активно займаються дослідники. Це потребує значних зусиль, оскільки більшість збудників хвороб є мікроміцетами, тобто потрібно підібрати засоби активні лише проти шкідників і при цьому не відбуватиметься пригнічення культури *A. bisporus*. Досить цікавим є пошук штамів *A. bisporus* які будуть стійкими до збудників. Але при промисловому вирощуванні такі культури дають менший врожай.

Значна кількість досліджень присвячена пошукам альтернативних джерел речовин з антифунгальними властивостями, проте усі вони проведені лише у лабораторіях і не мають практичного підтвердження. На даний момент найбільш активно використовуються промислові фунгіциди, і все більше досліджень присвячені виявленню безпечних для *A. bisporus* фунгіцидів. Тому для боротьби з однією з найнебезпечніших хвороб – павутинною хворобою, необхідно підібрати дієві способи, які впливатимуть на збудників захворювань та не матимуть негативного впливу на ріст *A. bisporus*.

Отже, згідно попередньо проведеного аналізу сучасних літературних даних, найбільшу небезпеку для промислового культивування грибів роду *Agaricus* становлять контамінанти мікроміцетного походження, а саме: *Clabobotryum*, *Mycogone*, і *Trichoderma*. Тому підбір сучасних фунгіцидів та

визначення їх впливовості на контамінантів і безпечності для промислової культури *A. bisporus* є актуальним завданням, яке потребує вирішення.

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

РОЗДІЛ 3. Матеріали та методи досліджень

3.1. Штами культур грибів використанні у дослідженні.

В експериментальній роботі були використанні штами *Agaricus bisporus* № 15, 36, F57, Ш-1 культур грибів з Колекції культур шапинкових грибів (Bisko et al., 2016). Штами *Cladobotryum* spp. були виділені у чисту культуру науковим співробітником відділу мікології Інституту ботаніки ім. М.Г. Холодного, к.б.н. Аль-Маалі Г. А. та аспірантом відділу Д.Г. Медведєвим. Культури *Trichoderma harzianum*, *Mycogone perniciosa* були ізольовані Аль-Маалі Г. А. та студенткою 4 курсу Національного університету харчових технологій Бондарук С. В. Матеріалом для виділення чистих культур зазначених мікофільних грибів слугували уражені плодові тіла *Agaricus bisporus*, що були зібрані на грибних господарствах розташованих у різних областях України. Моніторинг господарств з спеціалізованих з вирощування печериць проводили впродовж 2016–2019 рр. З відібраних плодових тіл у стерильних умовах за допомогою скальпелю вирізали невеликі за розміром (до 5 мм) частини ураженої тканини, які одразу переносили на стерильне живильне середовище МЕА (малець екстракт агар) з антибіотиком. Чашки Петрі з частинами уражених плодових тіл переносили до термостату з температурою 18 ± 1 °C на термін 3–4 діб до появи колоній з ознаками притаманними для вищезазначених мікофільних грибів. Одержані чисті культури пересівали на середовище МЕА для подальшої ідентифікації за морфологічними та мікроскопічними ознаками. Світлову мікроскопію проводили на мікроскопі марки Zeiss (Німеччина). Препарати готували у дистилаті та в 3%-му розчині КОН.

3.2. Поживні середовища

У дослідженнях використовували наступні середовища:

1) глюкозо-пептон-дріжджовий агар (ГПДА), г/л: глюкоза – 25, пептон – 3,

					НУХТ БТЕК 04.01.04 КР ПЗ				
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата					
Розроб.		Бондарук С.В.			Розділ 3. Матеріали та методи	Літ.		Арк.	Акрушіє
Перевір.		Красінько В.О.						331	4
Консульт.		Аль-Маалі Г.А.				Кафедра БТМ			
Н. Контр.									
Затверд.		Пирог Т.П.							

дріжджовий екстракт – 3, KH_2PO_4 – 1, K_2HPO_4 – 1, $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,25, агар – 20;

2) Чапека (Biolife Italiana S.r.l., Італія);

3) MEA (Pronadisa, Іспанія);

4) компостний агар (КА), г/л: сухий подрібнений компост – 76, агар – 20.

3.3. Визначення швидкості росту

Культивування міцелію *Cladobotryum* spp. на середовищах ГПДА, Чапека та MEA проводили при 25 ± 1 °C. Вимірювання проводили кожен день починаючи з 2 доби культивування. Вимірювання швидкості росту здійснювали за формулою (Bisko et al., 2012):

$$V = (R_2 - R_1) / (t_2 - t_1),$$

де V – швидкість росту, мм/доба; R_1 – радіус колонії на час t_1 ; R_2 – радіус колонії на час t_2 .

3.4. Визначення чутливості штамів *Cladobotryum* spp. до впливу фунгіцидів

При проведенні дослідження було використано найбільш розповсюджені у українському грибовництві фунгіцидні препарати, характеристики яких представлені в табл. 3.1

Таблиця 3.1

Характеристики використаних у дослідженні фунгіцидних препаратів

Характеристики	Комерційна назва				
	Ширлан	Флексіті	Споргон	Дерозал	Фундазол
Активна речовина	флуазінам	метрафенон	про-хлораз	карбендазим	беномил
Виробник	Syngenta, Швейцарія	BASF, Німеччина	BASF, Німеччина	Bayer, Німеччина	Agro-Chemie Ltd, Угорщина
Форма препарату	суспензія	суспензія	порошок	суспензія	порошок
Клас діючої речовини	арілоамінопиретрин	бензофенон	імідазол	бензімідазол	

Концентрація діючої речовини	500 г/л	300 г/л	450 г/кг	500 г/л	500 г/кг
Рекомендована доза фунгіциду*	0,125 г/л	0,9 г/л	1,35 г/л	1,5 г/л	1,5 г/л

*Рекомендована виробником доза для застосування в грибівництві подана в перерахунку на діючі речовини.

Стійкість виділених штамів *C. musophilum* до фунгіцидів вивчали на середовищі ГПДА, це пов'язано з тим що всі використанні у експерименті штами зазначеного виду мали високу швидкість росту на даному живильному середовищі. У дослідженні використовували авторську модифікацію дифузійного методу. Шляхом агаризації стерильного розчину препарату було виготовлено блоки із фунгіцидами діаметром 5 мм і висотою 3 мм, з вмістом фунгіцидів рівним максимальній дозі, рекомендованій для виробництва печериць (табл. 2.1). На поверхні середовища ГПДА розміщували блоки із фунгіцидом на відстані 20–25 мм від інокулюма досліджуваного штаму з розрахунком не більше двох блоків з одним фунгіцидом на чашку. Інокуляцію здійснювали внесенням спорового матеріалу методом проколу на поверхню агаризованого середовища. Культивування чашок Петрі проводилося при 25 ± 1 °С. Вимірювання зони інгібування здійснювали на момент повного припинення росту міцелію, тобто на 7 добу культивування. Оскільки зона інгібування не у всіх випадках мала правильну округлу форму, то розміри зони інгібування обчислювали за площею (см²) за допомогою програми ImageJ. Якщо зона інгібування становить більше 2 см² (середній діаметр зони 16 мм) штам вважається чутливим до відповідного фунгіциду. За умови коли зона інгібування є більшою за 1,5 см² і меншою, ніж 2 см² (що відповідає діапазону діаметрів 14–16 мм) штам вважається помірно-стійким; коли розмір зони не перевищує 1,5 см² (діаметр менше 14 мм), штам вважається стійким до відповідного фунгіциду. Зона у якій були відсутні ознаки росту міцелію визначалася як зона інгібування. Зона пригнічення визначалася як така, яка містила змінену, по відношенню до контролю, морфологію колонії.

За наявності інгібуючої дії фунгіцидів на ріст *C. mycophilum*, здійснювали додаткові експерименти, щодо впливу препаратів на мікроморфологію міцелію. У зазначеному дослідженні у максимально рекомендованих дозах фунгіцидні препарати додавали до ГПДА-середовища через стерилізуючі фільтри з розміром пор 0,2 мкм (Filtres Fioroni, Китай). У рідке (50 °C) агаризоване середовище додавали досліджувані препарати та швидко розливали отримане середовище по охолоджених чашках Петрі, з метою зменшення температурного ушкодження фунгіцидів. Культивували досліджувані штами *C. mycophilum* при 25 ± 1 °C. Всі досліди проводили у 3–6 повторностях, статистичну обробку даних здійснювали у програмі *Statistica 10*.

3.3. Визначення взаємодії *Agaricus bisporus* з мікроміцетами

У дослідженні використовувалися чотири штами *A. bisporus*, 5 штамів *C. mycophilum*, 4 штами *Cladobotryum* spp., один штам *Trichoderma harzianum* та один штам *Mycogone pernicius*. Дослідження здійснювалися на чашки Петрі із середовищем КА та ГПДА. На край чашки Петрі вносили агаризовані блоки діаметром 5 мм з інокулюмом *A. bisporus*, з розрахунку 1 блок на чашку, та здійснювали попередню інкубацію протягом 5 діб за температури 25 ± 1 °C.

Після попередньої інкубації у чашки методом уколу вносили культури *Cladobotryum* spp., *Trichoderma harzianum*, *Mycogone pernicius* на протилежну до *A. bisporus* сторону. Здійснювали інкубацію протягом 5 діб за температури 25 ± 1 °C. Моніторинг культур проводили кожну добу, фіксуючи зміни у морфології колоній. Штам *A. bisporus* вважався резистентним за умови відсутності потрапляння повітряного міцелію культур мікроміцетів на повітряний міцелій *A. bisporus*.

РОЗДІЛ 4. Результати досліджень

4.1. Характеристика збудників павутинної цвілі ізольованих з грибних господарств України

У результаті досліджень було встановлено, що збудники павутинної цвілі належать до виду *C. muscophilum*. Усі виділені штами мали наступні характерні для *C. muscophilum* ознаки: колонії на МЕА середовищі швидко ростуть, мають рясний бавовняний міцелій, широко розпростерті колонії, рожевий та червоний реверзум. У виділених штамів наявні довгі нерозгалужені конідієносці, вертицилятно розгалужені або нерівномірно розгалужені; конідіогенні клітини мають довжину 30–37 мкм та ширину 3,5–5,3 мкм. Несептовані або з одною чи двома перетинками конідії циліндричної або еліпсоїдної форми розмірами 15–32 × 5–7 мкм. Наявність спор з широким базальним рубцем та ретрогресивний конідіогенез дозволяють відрізнити *C. muscophilum* від схожого *C. dendroides*.

Раніше про поширення *C. muscophilum* у господарствах України з вирощування печериць не повідомлялося, проте, цього слід було очікувати зважаючи на його поширення в грибних господарствах у світі. Упродовж усього року обстежувалися грибні господарства з вирощування печериці, але штами *C. muscophilum* на уражених ділянках *A. bisporus* були виявлені лише у травні-вересні. Це свідчить про залежність розвитку *C. muscophilum* від теплих місяців. У літературних даних зазначається про те, що стимулюючу дію на розвиток павутинної цвілі на грибних господарствах чинить тепла й волога погода.

Дослідження видового різноманіття та властивостей виділених штамів *Cladobotryum*, які представлені у колекції Інституту ботаніки ім. М.Г. Холодного були здійснені Д.Г. Медведєвим. Штами *C. muscophilum* були зібрані на грибних фермах України, які здійснюють промислове вирощування *A. bisporus*, з міцелію ураженого павутинною цвіллю (табл. 4.1).

					НУХТ БТЕК 04.01.04 КР ПЗ						
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	Розділ 4. Результати досліджень			Літ.	Арк.	Акрушів	
Розроб.		Бондарук С.В.									
Перевір.		Красінько В.О.								35	440
Консульт.		Аль-Маалі Г.А.						Кафедра БТМ			
Н. Контр.											
Затверд.		Пирог Т.П.									

**Місця та дати збору матеріалу для ізоляції чистих культур різних
штамів *Cladobotryum mycophilum*.**

Номер штаму	Місце збору матеріалу	Штам <i>A. bisporus</i> з якого виділено культуру	Дата збору матеріалу
1	с. Хорошево, Харківська обл.	Amycel Triplex	21.05.2016
2	с. Васищево, Харківська обл. (господарство №1)*	Amycel Triplex	23.05.2016
3	с. Васищево, Харківська обл. (господарство №2)*	Amycel Triplex	30.05.2016
4	м. Маріуполь, Донецька обл.	Sylvan A-15	23.06.2016
5	С. Марьянівка, Киевская обл.	Sylvan A-15	15.07.16
6	м. Суми, Сумська обл.	Amycel Triplex	03.05.2017
7	с. Долинське, Запорізька обл.	Italspawn F-57	23.05.2017
8	с. Олександро-Калинове, Донецька обл.	Amycel Triplex	17.07.2017
9**	м. Волноваха, Донецкая обл.	Sylvan A-15	22.08.2017
10	с. Сергіївка, Запорізька обл.	Sylvan A-15	15.09.2017

*Штами №2 та №3 виділені з різних грибних господарств в одному селищі, за умовами співробітництва з даними господарствами їх офіційні назви не указуються.

**** Штам №9 у чисту культуру введено не було, у зв'язку з наявністю супутної кліщової інфекції небезпечної для культур колекції**

4.2. Характеристика росту та морфології колоній *C. musophilum* на стандартних живильних середовищах.

На живильних середовищах різного складу було виявлено неоднакову швидкість росту усіх досліджених штамів *C. musophilum* (рис. 4.1). На середовищі ГПДА штами *C. musophilum* мали високу швидкість росту: від 14 мм на добу до 20 мм для штамів №7 та №10 відповідно. На середовищах ГПДА та МЕА штами № 6, 7 та 8 мали однакову (з урахуванням статистичної похибки) швидкість росту на середовищах. В цілому швидкість росту на середовищі МЕА штамів *C. musophilum* повністю відповідала значенням, які були отримані за аналогічних умов іншими дослідниками.

На середовищі Чапека швидкість росту більшості штамів була повільнішою, ніж на інших середовищах, але швидкість росту штаму № 7 на даному середовищі дорівнювала швидкості росту на МЕА.

Відмічена різниця у морфології колоній на різних середовищах. При культивуванні *C. musophilum* на ГПДА-середовищі спостерігався щільний міцелій на поверхні середовища та неоднорідний за структурою повітряний міцелій, сформований пучками високих розгалужених конідиєносців. На даному середовищі колонії усіх досліджуваних штамів мали жовто-солом'яний колір, тоді як краї колонії були білого кольору. Поява жовтого забарвлення спостерігалася на 4–5 добу культивування. На 3–4 добу реверзум колонії набував яскраво-жовтого забарвлення, яке поступово змінювалось на коричневе і на 6–7 добу культивування ставало яскраво-рожевим та червоним.

Міцелій досліджуваних штамів на середовищі МЕА білий або кольору слонової кістки з неоднорідною структурою з вираженою радіальною концентричністю. На 3–5 добу реверзум колонії ставав яскраво-жовтого кольору, а на 7–9 добу – рожевого та червоного. Зазначимо, що рожевий колір на МЕА-середовищі на відміну від ГПДА-середовища, був значно світлішим, забарвлення

реверзumu рожевим пігментом було нерівномірним, а проміжна стадія, на якій реверзум має коричневе забарвлення, була відсутня на MEA середовищі.

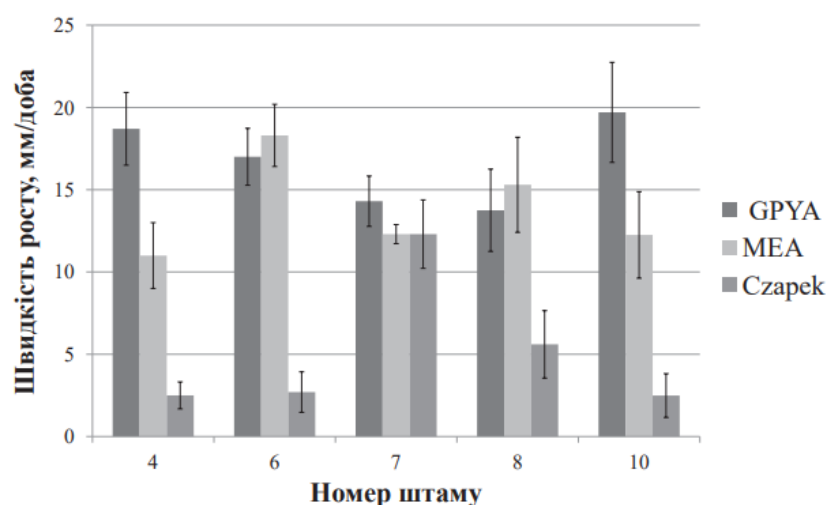


Рис. 4.1. Швидкість росту штамів *Cladobotryum musophilum* на різних живильних середовищах: GPYA (ГПДА – глюкозопептон-дріжджовий агар), MEA (мальц екстракт агар) та Czapek (середовище Чапека) ($\bar{x} \pm SE$)

Міцелій всіх штамів на середовищі Чапека був менш щільним, порівняно з міцелієм на середовищах ГПДА та MEA. Узагальнена характеристика зміни в процесі росту культуральних ознак наведена у табл. 4.2.

Таблиця 4.2.

Характеристика культуральних ознак *C. musophilum* під час вирощування на середовищі Чапека

Номер штаму	Колір міцелію	Пігментація реверзumu	Зміна забарвлення	Період зміни
№4	Солом'яний	Жовтий	Темно-зелений	П'ята доба
№6	Білий	Жовтий	-	П'ята доба
№7	Білий	Темно-зелений	Рожевий, жовтий, оливково-зелений	Третя доба, кінець культивування
№8	Білий	Жовтий	-	П'ята доба
№10	Білий	Жовтий	-	П'ята доба

Отже, можна зробити висновок, що для кожного штаму *C. musophilum* притаманні індивідуальні біологічні особливості, які проявляються у морфології колонії та швидкості росту на живильних середовищах з органічними та неорганічними джерелами азоту.

4.3. Стійкість до фунгіцидів.

Для визначення стійкості виділених штамів *C. musophilum* до фунгіцидів нами було використано фунгіциди бензимидазольного ряду (дерозал та фундазол) та фунгіциди іншої хімічної природи (ширлан, флексіті, споргон), що застосовуються у вітчизняній грибній індустрії. Дію всіх фунгіцидів вивчали при максимальній концентрації, яка була рекомендована виробниками. Це було обумовлено особливостями використання даних фунгіцидів у грибних господарствах. У більшості випадків виробники грибів застосовують фунгіцидні препарати у максимальних дозах для зменшення можливості утворення стійкості *C. musophilum* до менших концентрацій препарату. Якщо при використанні фунгіциду у максимально дозволений дозі відсутня ефективність, то визначення впливу більш високих доз є недоцільним, оскільки використання вищих за максимально допустиму дозу кількостей фунгіциду у грибному господарстві стає порушенням санітарно-гігієнічних норм.

Результати дослідження з вивчення стійкості різних штамів *C. musophilum*, до представлених фунгіцидів, представлені в рис 4.2.

Аналізуючи отримані результати, можна зробити висновок, що жоден з виділених штамів не мав чутливості до деразолу. Штами № 4 та № 6 виявляли чутливість до ширлану та флексіті та стійкість до інших фунгіцидів. Чутливість до ширлану та помірну стійкість до флексіті та фундазолу та стійкість до інших фунгіцидів проявив штам № 7. Штам №8 виявився чутливим до ширлану, флексіті, споргону та помірну стійкість до фундазолу. Чутливість до всіх фунгіцидів, крім деразолу, виявив штам №10.

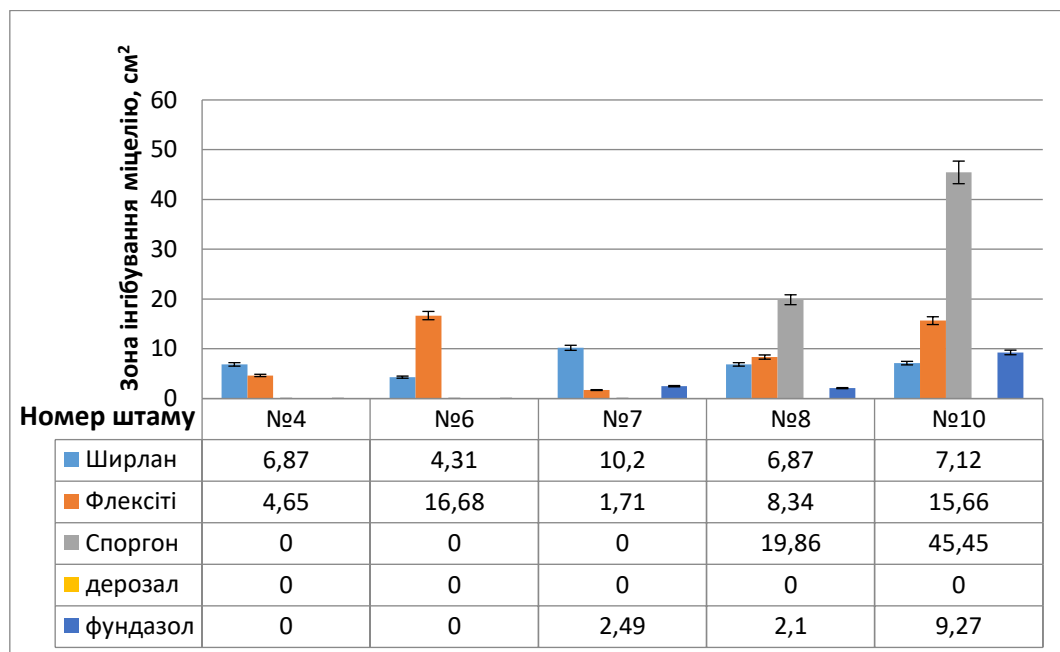


Рисунок 4.2. Вплив фунгіцидів на ріст штамів *Cladobotryum muscophilum* у дослідах *in vitro* на ГПДА-середовищі ($\bar{x} \pm SE$)

Найефективнішими фунгіцидами були флексіті та ширлан що добре видно на рис. 4.3.

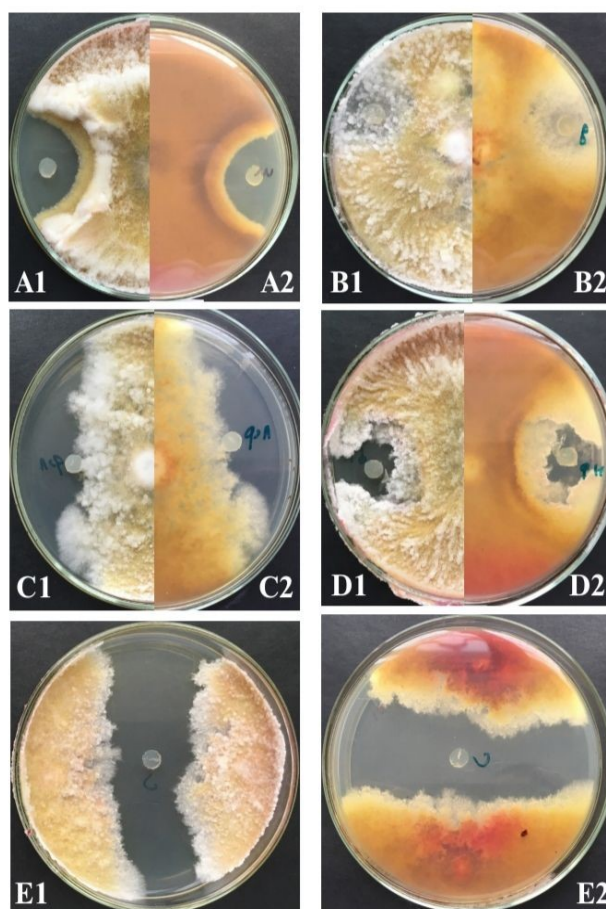


Рис. 4.3. Вплив різних фунгіцидів на ріст та морфологію колоній *Cladobotryum muscophilum*. А: ширлан, штаму № 6; тут і далі: 1 – загальний вид

колонії; 2 – реверзум колонії; В: деразол, штамп № 10; С: флексіті, штамп № 8; D: фундазол, штамп № 8; Е: споргон, штамп № 8

Найуразливішим до дії ширлану виявився штамп № 7, а найменш чутливим — штамп № 4. При використанні даного фунгіциду перед зоною інгібування була сформована зона пригнічення. Зона пригнічення розміром у середньому 5 мм, складається із щільного притиснутого до середовища міцелію жовтого кольору; реверзум зони пригнічення темно-коричневого кольору, наявний виразно світлий край на стику зони пригнічення з зоною інгібування.

Флексіті інгібував ріст 4 штамів. Штами № 6 та № 10 були особливо чутливими, штамп № 7 був помірно стійким до даного фунгіциду. На стику із зоною інгібування білий ватоподібний повітряний міцелій. Під час використання флексіті значних змін зазнає мікроморфологія *C. tuscophilum*. Зокрема відбулося зменшення загальної товщини гіф з $6,1 \pm 1,15$ мкм для контролю до 2,5–3,1 мкм для досліджуваного зразка, окремі гіфи містили численні гранули (рис. 4.4). Під впливом флексіті міцелій знебарвився, не спостерігалось утворення рожевого пігменту, а вегетативні гіфи за дії 3%-го розчину КОН не набували характерного рожевого забарвлення. Оскільки не утворювалися конідії та конідієносці, можна зробити висновок, що флексіті повністю пригнічує споруляцію.

Зміни мікроморфологічних ознак міцелію відбувалися і за використання ширлану. У досліджуваних штамів *C. tuscophilum* відбувалися деформація конідієносців, яка супроводжувалася гіпертрофією спороносних клітин, збільшення товщини гіф та утворення вакуолізованих ділянок. Ширлан пригнічував спороутворення усіх штамів *C. tuscophilum*.

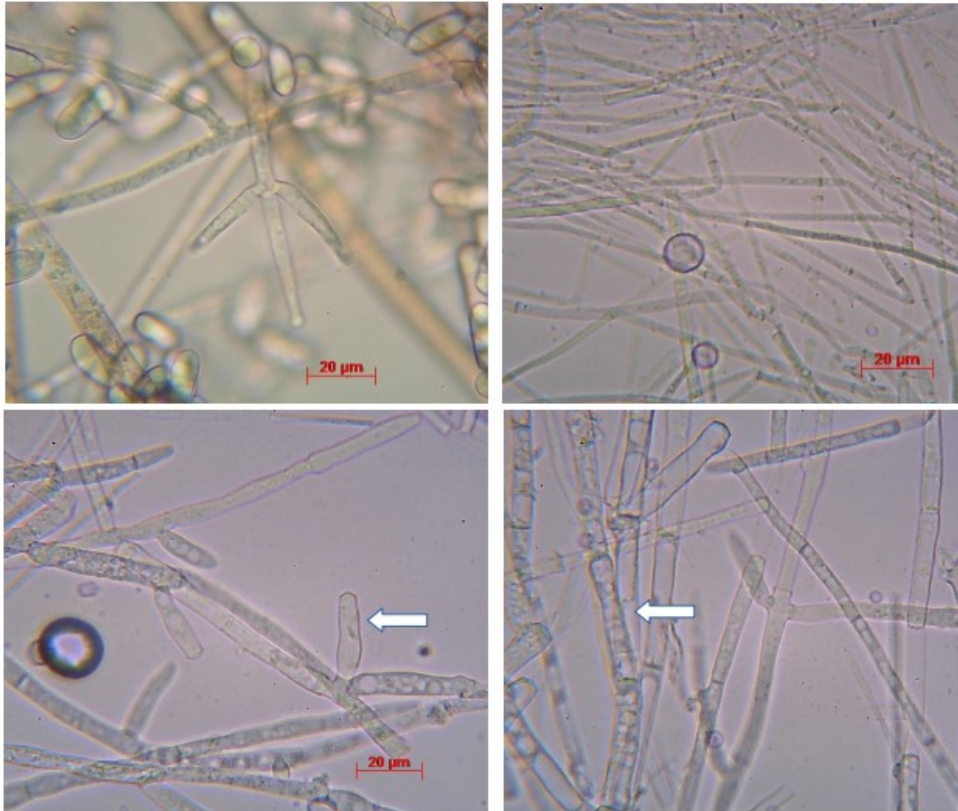


Рисунок 4.4. Зміни у мікоморфології *Cladobotryum mycophilum* (штам № 10) під впливом фунгіцидів:

а) контроль, без фунгіцидів; б) флексіті; с) та д) ширлан

Стрілками позначення деформовані вакуолізовані та конідіогені клітини ділянки (d)

4.4. Взаємодія *Agaricus bisporus* з мікроміцетами

Оскільки міцелій *A. bisporus* досить вразливий до мікроміцетів доцільним є перевірити відносини між наявними у колекції штамами *A. bisporus* та мікроміцетами родів *Cladobotryum* штами № 1 - 8, 10, *Trichoderma harzianum*. M20 та *Mycogone pernicius*. Досліджування здійснювали на двох видах поживних середовищ: ГПДА та КА. В ході дослідження було виявлено, що певні штами *A. bisporus* при вирощуванні на КА були невразливі до певних штамів *Cladobotryum* spp., що може свідчити про їх резистентність до даних штамів збудників, тоді як при вирощуванні даних культур на середовищі ГПДА усі штами були чутливими до мікроміцетів. Про можливу резистентність *A. bisporus* до різних штамів *Cladobotryum* spp. повідомлялося раніше, але у вже проведених дослідженнях резистентність проявляли лише дикі штами тоді як комерційні були вразливими. Результати проведеного дослідіу наведено у таб.4.3.

**Взаємодія різних штамів *Cladobotryum* spp. виділених з українських
грибних господарств з різними промисловими штамами *Agaricus bisporus*
на середовищі КА**

штами <i>Cladobotryum</i> spp.	штами <i>Agaricus bisporus</i>			
	A57	Ab15	Ab36	Ш1
1	+	-	-	-
2	-	-	-	-
3	-	-	-	-
4	-	-	-	-
5	+	-	-	-
6	+	-	-	-
7	+	-	-	-
8	-	-	-	-
10	-	+	-	-
<i>Trichoderma</i>	-	+	-	-
<i>Mycogone</i>	-	-	-	-

Примітка: «+» означає, що даний штам *A. bisporus* вразливий до даного конкурентного штаму, «-» означає, що даний штам *A. bisporus* є стійким до даного конкурентного штаму.

Аналізуючи результати дослідження можна зрозуміти, що такі штами *A. bisporus*, як 36 та Ш1 є стійкими до усіх використовуваних мікроміцетів і можуть бути рекомендовані до промислового вирощування в умовах України (рис. 4.5).

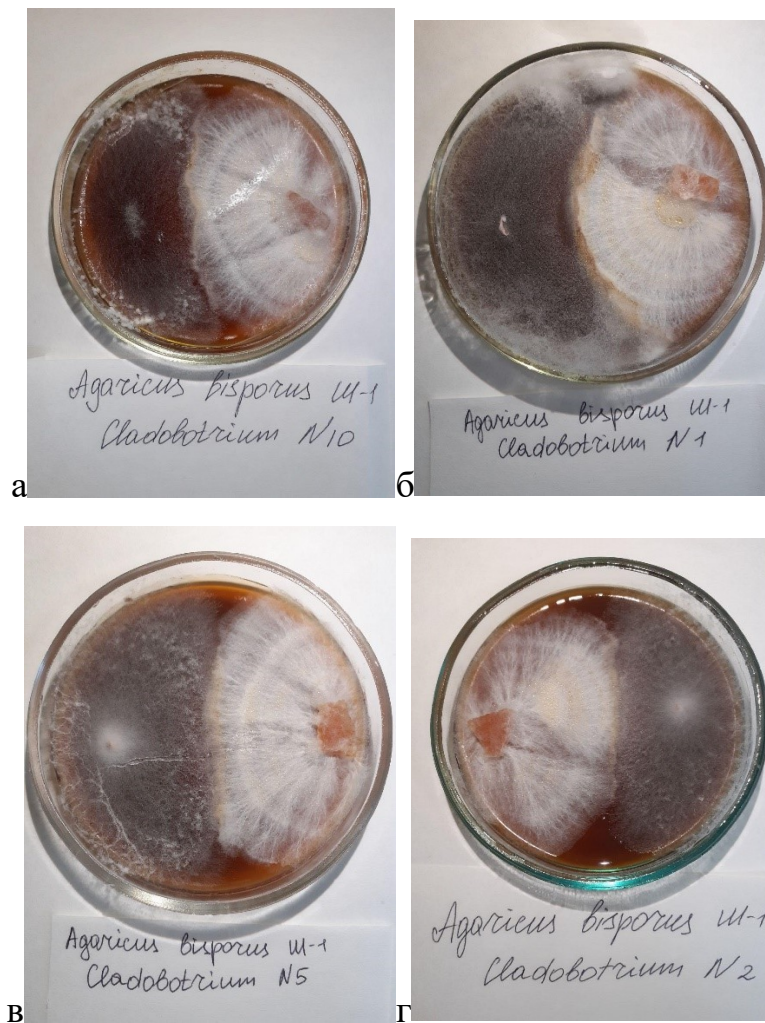


Рис. 4.5. Стійкість *Agaricus bisporus* III-1 до різних штамів *Cladobotryum* spp.

Штами *A. bisporus* F57 є вразливим до *C. mycophilum* №5, 6, 7, та *A. bisporus* 15 вразливий до *C. mycophilum* №10 та *Trichoderma* про що свідчать рис. 4.6.

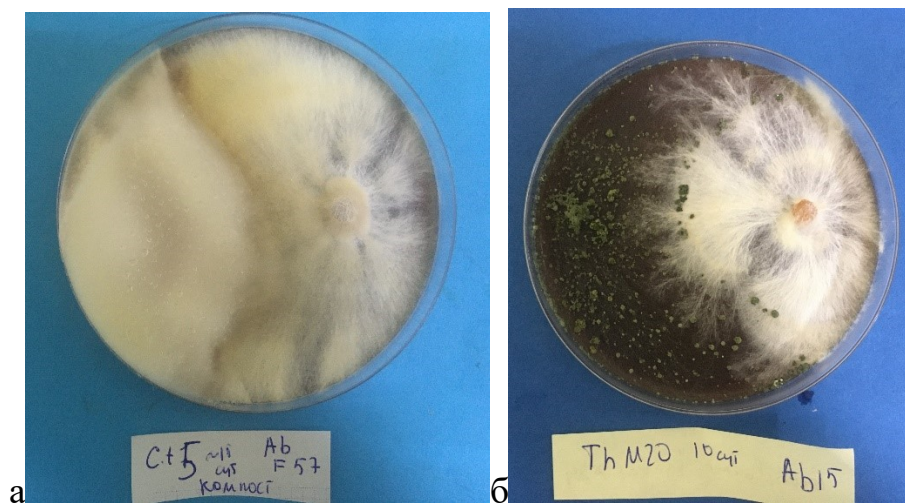


Рис. 4.6. Вразливість *Agaricus bisporus* F57 (а) та 15 (б) до *C. mycophilum* №5 та *Trichoderma* відповідно

ТЕХНОЛОГІЧНА ЧАСТИНА

РОЗДІЛ 5. Ділянка доферментаційних процесів та виробничої ферментації

5.1. Обґрунтування вибору біологічного агента та живильного середовища для його культивування

В численних експериментальних дослідженнях доведено, що гриби є корисними для профілактики і лікування захворювань людини, оскільки вони мають багато фармакологічних особливостей: здатність стимулювати обмін речовин, запобігати та контролювати процеси інтоксикації, збільшити опір організму до мікробних та вірусних інфекцій, нормалізувати гомеостаз, а також мають антиоксидантну, імуномодулюючу та енергетичну властивості. Біологічно активні сполуки грибів корисні як вихідні матеріали для розробки хіміотерапевтичних засобів при лікуванні раку та інших захворювань. Доведено, що полісахариди грибів підвищують імунну відповідь організму замість прямого цитотоксичного впливу на клітин [56].

Найбільш культивованим грибом у світі є *Agaricus bisporus*, який може використовуватися і як продукт харчування і як джерело біологічно активних речовин. Оскільки темою даної роботи є отримання міцеліальної маси *A. bisporus* для виготовлення посівного матеріалу для грибних ферм порівнювати різні біологічні агенти недоцільно. Це пов'язано із тим, що склад біомаси може відрізнятися у різних видів навіть одного роду за вмістом біологічно активних речовин та біологічними властивостями. Крім того, порівнювати промислові штами, які вирощуються на грибних фермах недоцільно, оскільки дані про їх продуктивність встановлено при вирощуванні плодових тіл, а дослідження стосуються отримання максимально можливої біомаси при вирощуванні на компості при мінімальних термінах тоді як міцеліальна маса отримується при культивування у біореакторі.

Оскільки біологічний агент недоцільно порівнювати із іншими базидіоміцетами за кількістю біомаси та зважаючи на комерційні таємниці про-

					НУХТ БТЕК 04.01.04 КР ПЗ							
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	Розділ 5. Ділянка доферментаційних процесів та виробничої ферментації			Літ.	Арк.	Акрушів		
Розроб.	Бондарук С.В.									45	76	
Перевір.	Красінько В.О.							Кафедра БТМ				
Консульт.	Аль-Маалі Г.А.											
Н. Контр.												
Затверд.	Пирог Т.П.											

мислових штамів печериць доцільним є розглянути варіанти поживних середовищ на яких можливе глибинне культивування *A. bisporus* з метою одержання міцеліальної маси. Серед сучасних літературних даних можна виділити чотири статті про культивування *A. bisporus* у більшості яких не вказано штамів використовуваних культур [57, 58, 59, 60].

Проаналізувавши дані наведені у таблиці 5.1 можна побачити, що найбільша кількість біомаси утворюється при культивуванні *A. bisporus* на мандариновому соці. Але даний спосіб має декілька недоліків. По-перше, дана концентрація біомаси спостерігається лише при суворому дотримання умов культивування. Розбіжності параметрів культивування призводять до зменшення кількості утвореної біомаси. По-друге, дані значення отриманні при культивуванні *A. bisporus* у колбах і не перевірено кількість утвореної біомаси при культивуванні у виробничому ферментері. По-третє, у статті вказаний термін культивування 8 діб, що є стаціонарною фазою росту культури. Оскільки цільовий продукт має бути у середині експоненційної фази росту, існує ризик того, що утвориться менша кількість біомаси [59].

Серед варіантів, які залишаються найбільш доцільним є вирощування на екстракті цукрової тростини. Хоча даний спосіб культивування потребує внесення підживлювального розчину, він має декілька переваг порівняно з рештою. По-перше, отримана міцеліальна маса знаходиться у середині експоненційної фази росту, що є однією із вимог до кінцевого продукту біосинтезу, на відміно від інших варіантів. По-друге, перевірено, як відбуватиметься культивування даним способом у ферментерах і ризик зміни результатів при масштабуванні виробництва у промислові масштаби неактуальний. Крім того, склад поживного середовища є більш доступним порівняно з іншими варіантами [57,58,60].

Таблиця 5.1

Обґрунтування вибору поживного середовища для культивування *Agaricus bisporus*

Біологічний агент	Склад поживного середовища, г/л	Тривалість культивування, діб	Концентрація біомаси, г/л	Особливості процесу біосинтезу	Використана література, рік
<i>Agaricus bisporus</i>	Екстракт цукрової тростини – 40; Нітрит натрію – 10; Дріжджовий екстракт – 5.	4	15	Внесення підживлювального розчину на 2 добу культивування, інгібування екстрактом цукрової тростини при концентрації 30 г/л і більше, pH= 6.5, t=28 °C	[57], 2011
<i>Agaricus bisporus</i> ATTC 10893	Гідролізат рогу барана – 20; Глюкоза – 20; KH ₂ PO ₄ – 1.	8	9,8	pH= 5, t=25 °C	[58], 2004
<i>Agaricus bisporus</i>	Мандариновий сік – 1 л.	8	47,06	pH= 6, t=28 °C	[59], 2017
<i>Agaricus bisporus</i> CBS 57166	Декстроза – 0,5; Картопляний екстракт – 2,5; Сечовина – 0,45;	7	14	pH= 5,6, t=28 °C	[60], 2018

Закінчення табл. 5.1.

	MgSO₄*7 H₂O -590 мг/л; CaCl₂*2 H₂O – 602 мг/л; борошно з оливкового листя – 20; Розчин солей 20 мл/л. Склад розчину солей (мг/л): FeSO₄*7 H₂O, 250, MnSO₄*H₂O, 80, ZnSO₄*7 H₂O, 70; CoCl₂*6 H₂O 100.				
--	---	--	--	--	--

Обґрунтовуючи економічну доцільність виробництва необхідно розрахувати вартість живильних середовищ, використовуваних для продуцентів міцеліальної маси *A. bisporus* для запропонованих варіантів (табл. 5.2).

Таблиця 5.2

**Вартість компонентів поживного середовища для
культивування *Agaricus bisporus***

Продуцент	Компонент поживного середовища, г/л	Ціна компонента, грн/кг	Вартість компонента (грн.) на 1 л середовища	Джерело інформації
<i>Agaricus bisporus</i>	Екстракт цукрової тростини, 40	133	5,32	1**
	Нітрит натрію, 10	52	0,52	1**
	Дріжджовий екстракт, 5	936	4,68	1**
	Вартість 1 л середовища 10,52 грн			
<i>Agaricus bisporus</i> <i>ATTC 10893</i>	Гідролізат рогу барана, 20	700	14	2**
	Глюкоза, 20	50	1	1**
	КН ₂ РO ₄ , 1	23,8	0,024	1**
	Вартість 1 л середовища 15,024 грн			
<i>Agaricus bisporus</i>	Мандариновий сік	104	104	3**
	Вартість 1 л середовища 104 грн			
<i>Agaricus bisporus</i> <i>CBS 57166</i>	Декстроза, 0,5	18	0,009	1**
	Картопляний екстракт, 2,5	1287,6	3,2	4**
	Сечовина, 0,45	9	0,004	1**
	MgSO ₄ *7 H ₂ O, 590 мг	55	0,033	1**
	CaCl ₂ *2 H ₂ O, 602 мг	45	0,027	1**
	Борошно оливкового листа, 20	450	9	1**
	Розчин солей 20 мл Склад розчину солей (мг/л): FeSO ₄ *7 H ₂ O, 250, MnSO ₄ *H ₂ O, 80, ZnSO ₄ *7 H ₂ O, 70; CoCl ₂ *6 H ₂ O 100	0,1174 20 25 120 1020	0,0023 0,005 0,002 0,0084 0,102	1**, 5**, 6**
	Вартість 1 л середовища 12,28 грн			

*Примітка: ціни наведено станом на 1 березня 2020 року. ** 1 - <https://prom.ua>, 2 - <https://www.olx.ua>, 3 - <https://asiafoods.com.ua>, 4 - <https://www.formedium.com>, 5 - <https://dnepropetrovsk.flagma.ua>, 6 - <https://www.systopt.com.ua>.

Для того, щоб детальніше зрозуміти економічно вигідний варіант поживного середовища знаходимо умовну вартість 1 г міцеліальної маси *A. bisporus* (табл. 5.3)

Таблиця 5.3

Умовна вартість 1 г міцеліальної маси *Agaricus bisporus*

Біологічний агент	Вартість 1 л середовища, грн	Концентрація біомаси г/л	Умовна вартість 1 г цільового продукту, грн/г	Тривалість культивування, діб	Кількість утвореної біомаси за добу, г/л
<i>Agaricus bisporus</i>	10,52	15	0,7	4	3,75
<i>Agaricus bisporus</i> ATTC 10893	15,024	9,8	1,53	8	1,225
<i>Agaricus bisporus</i>	104	47,06	2,21	8	5,8825
<i>Agaricus bisporus</i> CBS 57166	12,28	14	0,87	7	2

Аналізуючи проведені розрахунки зрозумілим є те, що найкращим варіантом культивування є використання для отримання міцеліальної маси *A. bisporus* середовища, до складу якого входить екстракт цукрової тростини, дріжджовий екстракт та нітрит натрію. Головними перевагами даного способу, крім економічної доцільності, є підтвердження його ефективності при промисловому культивуванні та отримання продукту біосинтезу в експоненційній фазі росту.

5.2. Розрахунок складу поживного середовища для отримання міцеліальної маси *Agaricus bisporus*

Тривалість культивування становить 4 доби, концентрація біомаси 15 г/л, джерелом Карбону є екстракт цукрової тростини концентрацією 20 г/л, азоту – нітрит натрію концентрацією 10 г/л [57].

Оскільки вміст Карбону у біомасі грибів становить 50 %, то для одержання 15 г/л біомаси необхідно, щоб у складі поживного середовища було:

$$15 * 0,5 = 7,5 \text{ г/л Карбону.}$$

Оскільки з 20 г/л екстракту цукрової тростини близько половини потрапляє на «холосте окислення», то в 10 г/л екстракту цукрової тростини, яка розщеплюється до сахарози $C_{12}H_{22}O_{11}$, міститься : в 342 г сахарози – 144 г Карбону, в 10 г – 4,2 г Карбону. Даної кількості не достатньо для отримання вказаної концентрації біомаси.

Для отримання 15 г/л біомаси необхідно: якщо в 342 г сахарози – 144 г карбону, то 7,5 г Карбону міститься в 18 г сахарози.

Тому рекомендована загальна концентрація екстракту цукрової тростини становить близько 40 г/л, враховуючи що понад 50% речовини витрачається на «холосте окислення». Кількість Карбону становитиме: з 342 г – 144 г Карбону, з 20 г – 8,4 г Карбону.

Оскільки при внесенні у середовище екстракту цукрової тростини у концентрації більше 30 г/л виникає інгібування росту, то частину субстрату подають у вигляді підживлювального розчину. Оскільки тривалість культивування становить 4 доби, то підживлювальний розчин вводиться через 2 доби, коли концентрація глюкози, до якої розщеплюється екстракт цукрової тростини через сахарозу, становить 5 г/л.

Початкова концентрація екстракту цукрової тростини становить 20 г/л, тому дробним підживленням необхідно внести ще 20 г/л екстракту цукрової тростини.

Біомаса грибів на 8 % складається з Нітрогену. Отже, вміст Нітрогену у 15 г біомаси становить

$$15 * 0,08 = 1,2 \text{ г Нітрогену}$$

Джерелом Нітрогену нітрит натрію. Молекулярна маса NaNO_3 становить 85. Отже, у 85 г нітриту натрію міститься 14 г Нітрогену (N), тоді 1,2 г Нітрогену буде міститись у $(85 \times 1,2) / 14 = 7,29$ г солі.

Зважаючи на те, що концентрація нітриту натрію у поживному середовищі становить 10 г/л, то Нітроген не є лімітуючим фактором у даному випадку і його кількості є достатньо для утворення 15 г/л міцеліальної маси *A. bisporus*.

Отже, для отримання вказаної концентрації біомаси необхідно збільшити концентрацію екстракту цукрової тростини удвічі [57, 61].

5.3. Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки *Agaricus bisporus*

Agaricus bisporus – це найбільш поширений їстівний гриб базидіоміцет, який належить до родини *Agaricaceae*. Як правило, даний гриб вирощується на компості протягом 36-40 діб до утворення плодових тіл, які відправляються на продаж. Міцеліальна маса *A. bisporus* представлена однорідним повітряним міцелієм білого кольору, який є хаотичним розгалуженням гіф (рис. 5.1), при рості на твердих поживних середовищах до 10 діб. При тривалішому культивуванні відбуватиметься формування плодових тіл. Розмноження відбувається за участі спор. Мікроскопічні ознаки: спори 6–8 x 5–6 мкм еліпсоїдної форми; гладкі, товстостінні гіфи, які при додаванні КОН набувають коричневого забарвлення (рис. 5.1) [62, 63].

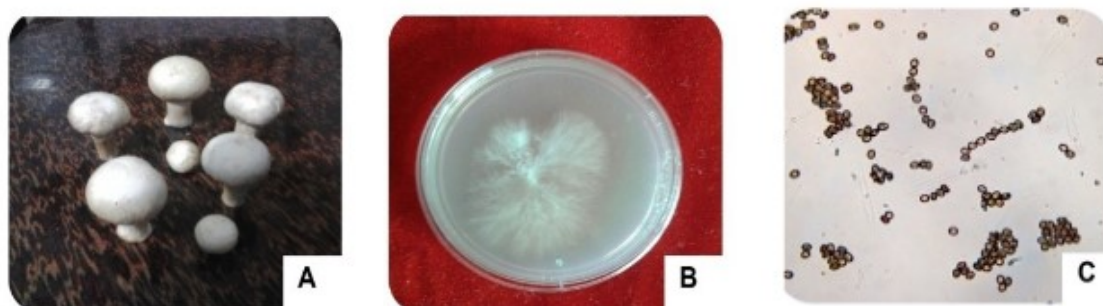


Рис. 5.1. А – плодові тіла *Agaricus bisporus*, В – чиста культура *Agaricus bisporus*, С- базидіоспори [64].

При культивуванні *A. bisporus* на аграризованому середовищі ГПДА (глюкозо-пептон-дріжджове середовище) протягом 5 діб за температури 25 ° С

спостерігається білий однотонний міцелій з рівними краями, без опуклостей, реверзум колоній незабарвлений. Також можливе культивування на наступних середовищах: картопляно-декстрозний агар, середовище Сабуро, середовище Чапека, сусло-агар, компостний агар, агар вівсяного борошна, пшеничний агар, картопляно-декстрозно-дріжджовий агар [65, 66].

Оптимальною для росту міцелію є температура інкубації від 24 до 26 ° C та рН 6-7. *A. bisporus* належить до гетеротрофних живих організмів та потребує доступу кисню для активного росту та розмноження. Колекційну культуру можна зберігати у замороженому стані за використання сухого льоду або рідкого азоту до температури -70 ° C [66, 67].

У ролі вуглецевих субстратів для культивування *A. bisporus* використовуються: глюкоза, сахароза, фруктоза, ксилоза, маноза, галактоза, мальтоза, лактоза, декстрин та інші. Варто зазначити, що найбільша концентрація міцеліальної маси *A. bisporus* спостерігається при використанні глюкози та сахарози як джерел Карбону. У ролі джерел Нітрогену до складу поживних середовищ використовуваних для культивування *A. bisporus* додаються: екстракт яловичини, дріжджовий екстракт, пептон, хлорид амонію, калієва селітра, фосфат амонію, нітрит натрію, гліцин, аргінін. Не рекомендується використовувати гістидин, аланін та сечовину [65, 66, 67].

5.4. Таксономічний статус *Agaricus bisporus*

Оскільки існує два види класифікацій живих організмів: фенотипова та філогенетична; варто порівняти наскільки змінився таксономічний статус *Agaricus bisporus* після дослідження його генетичного матеріалу.

Однією із фенотипових класифікацій була систематика Т. Кавалір-Сміта 1998 р. Згідно неї *A. bisporus* мав наступний таксономічний статус:

Надцарство: *Eukaryota* (Еукаріоти)

Царство: *Fungi* (Гриби)

Відділ: *Basidiomycota* (Базидіоміцети)

Підвідділ: *Orthomycotina* (Ортомікоти)

Надклас: *Hymenomycetia* (Гіменоміцетія)

Клас: *Homobasidiomycete* (Гомобазидіоміцети)

Підклас: *Pileomycetidae* (Пілеоміцетові)

Порядок: *Agaricales* (Агарикові)

Родина: *Agaricaceae* (Агарикальні)

Рід: *Agaricus* (Печериці)

Вид: *Agaricus bisporus* (Печериця двоспорова) [68].

Фенотипова класифікація була створена 2007 року. Вона була заснована на генетичному аналізі 18S рРНК, що невраховано у систематиці Т. Кавалір-Сміта. Згідно фенотиповою класифікації *A. bisporus* має наступний таксономічний статус:

Надцарство: *Eukaryota* (Еукаріоти)

Царство: *Fungi* (Гриби)

Підцарство: *Dikarya* (Вищі гриби)

Відділ: *Basidiomycota* (Базидіоміцети)

Підвідділ: *Agaricomycotina* (Агарикомікоти)

Клас: *Agaricomycetes* (Агарикоміцети)

Підклас: *Agaricomycetidae* (Агарикоміцетові)

Порядок: *Agaricales* (Агарикові)

Родина: *Agaricaceae* (Агарикальні)

Рід: *Agaricus* (Печериці)

Вид: *Agaricus bisporus* (Печериця двоспорова) [69].

Аналізуючи наведені класифікації стає зрозуміло, що відмінності у фенотиповій та філогенетичній систематиці мінімальні, зокрема різні назви таких рангів як підвідділ, клас, підклас. Незначні відмінності систематики грибів можуть бути пов'язані із досить малим часовим проміжком між їх створенням.

5.5. Техніко-економічне обґрунтування

5.5.1. Потреба у цільовому продукті

Цільовим продуктом культивування *A. bisporus* є його міцеліальна маса, яка необхідна для промислового грибівництва. Потреба у цільовому продукті диктується тим, що гриби є досить поширеними на території України і тривалий

час використовуються як продукти харчування. Базидіоміцети містять у своєму складі вуглеводи, незамінні амінокислоти, ліпіди, вітаміни та інші біологічно активні речовини. Перевагами штучного вирощування грибів є: можливість використання як субстрати відходи сільського господарства, незалежність від пори року та умов навколишнього середовища, відсутність контамінантів, керованість процесу, можливість часткової автоматизації.

За останні 10 років виробництво грибів у світі збільшилося в 2 рази і досягло 12 млн. т. З них біля 9 млн. т, що становить 75% світового обсягу культивованих грибів, вирощують у Китаї. В країнах Європи щорічно вирощують близько 1 млн. т грибів (рис. 5.5.1), з яких третина становить експортно-імпортні обсяги. У багатьох розвинених країнах світу створено грибну індустрію.

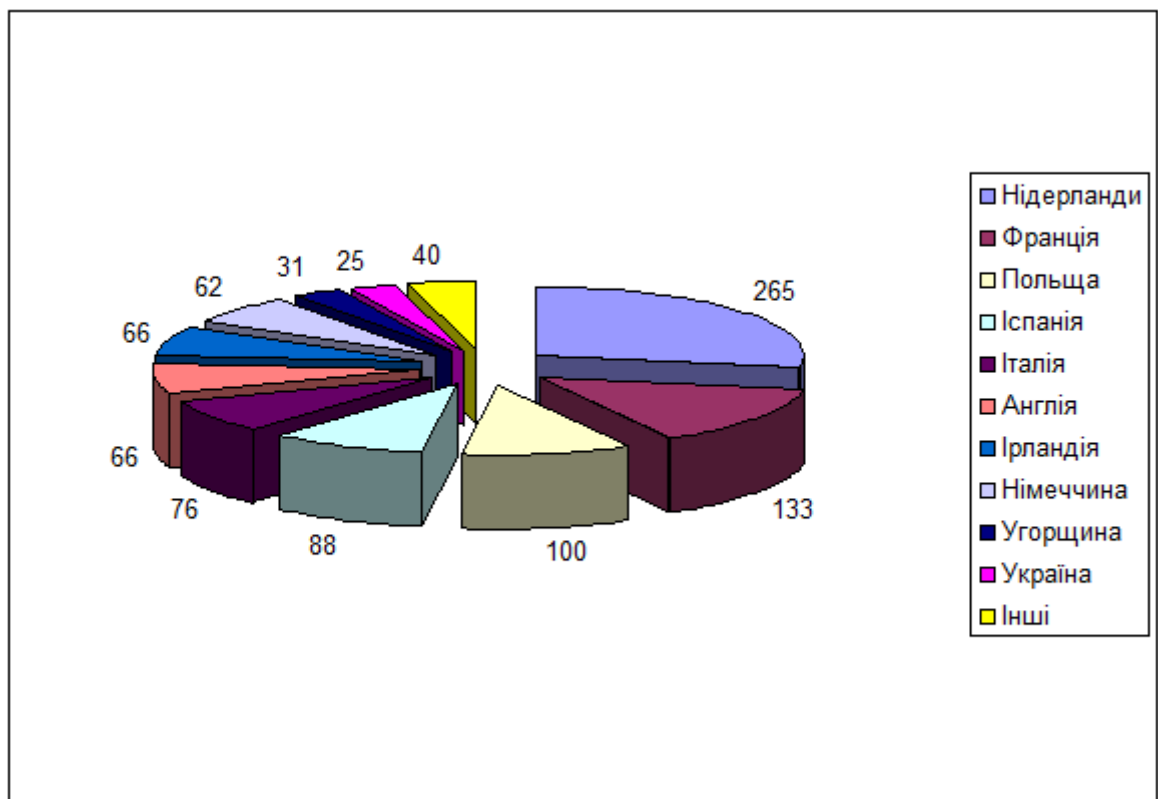


Рис. 5.5.1. Виробництво їстівних грибів у країнах Європи, тис. т на рік [1].

Найбільш вирощуваними грибами є: печериці, білі гриби, глива, шіїтаке та ін. Проте перевага надається вирощування печериць. Україна посідає 11-те місце у світі за обсягами виробництва печериць. За інформацією Національного грибного агентства (НГА), у країні діють близько 300 ферм з вирощування

печериць. Минулого року загальне виробництво грибів становило майже 57 000 т, з яких ледь частка припадає саме на печериці — 51 300 т. Середня врожайність господарств — 22 кг з кожного квадратного метра на рік, а деякі господарства збирали і по 28 кг печериць з метра.

Значний потенціал для розвитку сектора залишається у експорті грибів. Незаперечною перевагою вітчизняної продукції є її низька вартість — ціни на гриби українських фермерів щонайменше вдвічі нижче за гуртові ціни на польському або російському ринках. У 2017-му експорт українських печериць у порівнянні з попереднім роком зріс у 13 разів — до 528 т (за іншими даними — 533 т). Та це становить всього близько 1% від українського виробництва грибів [70].

Оскільки промислове вирощування печериць є досить масштабним, для вирощування безпечних для вживання грибів необхідно дотримуватися певних умов. Головною вимогою для промислового виробництва печериць є використання якісного посівного матеріалу, тобто зернової міцеліальної маси *A. bisporus*.

5.5.2 Розрахунок потужності виробництва

Виготовлення посівного матеріалу для вирощування печериць здійснюється на таких підприємствах як: «Євро-міцелій», ВАТ «Мікоген-Україна», «Фурат», «Мікос», «Насіння країни», «УкрМіцелій» та інші. Крім вітчизняних виробників, поширеним є імпортований міцелій. Його привозять із Росії, Франції, Нідерландів, Італії та інших країн [71, 72].

Не зважаючи на те, що можливий імпорт посівного матеріалу, перевага у більшості випадків має надаватися вітчизняним виробникам. Це пояснюється тим, що тривалість зберігання продукту становить 4-6 місяців. Транспортування з інших країн є довготривалим і дорогим процесом. Якість посівного матеріалу вітчизняних виробників є досить високою, а транспортування у межах нашої країни є набагато зручнішим.

Оскільки ферм з вирощування печериць є досить багато, попит на посівний матеріал печериць — великий. З огляду на важкість транспортування посівного

матеріалу у різні регіони України, нового виробника та конкуренцію на ринку припускаємо, що посівним матеріалом забезпечується грибна ферма «Гелека-М» Одеської області, яка є однією з найбільших в Україні.

Для промислового вирощування печериць фірма використовує імпортований посівний матеріал, що є економічно недоцільним через витрати на транспортування. Тому пропонується зробити виробництво посівного міцелію *A. bisporus* розташованим на території грибної ферми «Гелека-М» для забезпечення потреб даного виробництва у посівному матеріалі.

Загальна посівна площа грибної ферми «Гелека-М» становить 8100 м². На фермі розміщено шість камер по 200 м², шість по 300 м² і 12 по 400 м². Проте крім печериць, там також вирощують гливу та шиїтаке. Для вирощування печериць використовуються до 6000 м² посівних площ [73].

Упаковка міцелію масою 130 г використовується для засівання 2,75 м² площі. Міцелій від загальної маси упаковки становить 1 %. Тобто, на посівну площу 2,75 м² необхідно 1,3 г міцелію. Відповідно, на посівну площу 6000 м² необхідно 2836,36 г міцелію *A. bisporus*. Гриби вирощуються в середньому 36-40 діб, проте після вирощування потрібно проводити прибирання та дезінфекцію для того, щоб можна було знову вирощувати гриби. Таким чином, на рік гриби сіють 9 разів. Отже, для забезпечення річних потреб підприємства «Гелека-М» необхідно 25530 г міцелію *A. bisporus* [74,75].

Оскільки отримана при глибинному культивуванні міцеліальна маса використовується для інокуляції простерилізованого зерна для отримання зернового посівного матеріалу культивування припиняється при досягненні експоненційної фази росту. Згідно літературних даних у середині експоненційної фази росту максимальна кількість біомаси при культивуванні *A. bisporus* становить 15 г/л. Кількість культуральної рідини необхідна для отримання 25530 г біомаси [57].

$$15 \text{ г} - 1 \text{ л культуральної рідини}$$

$$25530 \text{ г} - x;$$

$$X = 1702 \text{ л}$$

У зв'язку із втратами міцеліальної маси під час виділення кількість культуральної рідини, яку необхідно отримати у процесі культивування становить:

$$V_{кр.} = 1702/(1-0,3)=2431,4 \text{ л}$$

5.5.3 Розрахунок кількості виробничих циклів та геометричного об'єму ферментера

Для забезпечення потреб «Гелека-М» у зерновому посівному матеріалі печериць враховуючи втрати необхідно одержати 2431,4 л культуральної рідини ($V_{кр.}$).

З метою визначення кількості стадій отримання посівного матеріалу здійснено розрахунок кількості культуральної рідини, яку потрібно отримати за один цикл виробничого біосинтезу.

Зважаючи на тривалість зберігання продукту (4-6 місяців) приймаємо кількість робочих трудоднів ($T_{рд}$) 81, тоді кількість кінцевого продукту отриманого за добу (V_d) становитиме:

$$V_d = V_{кр.}/T_d = 2431,4/81=30 \text{ л}$$

Відповідно кількість продукту за цикл ($V_{цк}$) становитиме:

$$V_{цк} = (K_1 \cdot V_d \cdot T_{цф})/24 = (1,3 \cdot 30 \cdot 104)/24 = 169 \text{ л /цикл,}$$

де $T_{цф}$ – це цикл роботи ферментера, який є сумою часу витраченого на підготовку ферментера до роботи (8 год) та тривалості виробничого біосинтезу (96 год). K_1 – це коефіцієнт запасу, який враховує можливість нестерильних операцій ($K_1 = 1,1 - 1,5$).

Під час підготовки ферментера здійснюються наступні технологічні операції: 1,5 год триває миття за участі СІР-мийки та огляд, 1 год – перевірка обладнання на герметичність, по 1 год – стерилізація та охолодження, 2 год – завантаження живильного середовища, 1,5 год – внесення посівного матеріалу та заключним етапом є вивантаження культуральної рідини тривалістю 1 год.

Для одержання 169 л ($V_{цк}$) культуральної рідини з міцеліальною масою *A. bisporus* використовується біореактор з геометричним об'ємом:

$$V_{г} = V_{цк} / K_{зап} = 169/0,6 = 281,7 \text{ л,}$$

де $K_{\text{зап}} = 0,6$ – коефіцієнт заповнення ферментера.

За геометричним об'ємом найближчим є ферментер $V_{\text{ф}} = 300$ л.

Уточнюємо коефіцієнт заповнення

$$K_{\text{зф}} = V_{\text{цк}}/V_{\text{ф}} = 169/300 = 0,56.$$

Оскільки одержане значення коефіцієнта заповнення близьке до вибраних меж, отже геометричний об'єм ферментера вибрано вірно.

5.5.4 Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу

При культивуванні *A. bisporus* протягом одного виробничого циклу утворюється отримують $V_{\text{кр}} = 169$ л культуральної рідини.

Крім того, при одержанні культуральної рідини, потрібно що при краплевиносі через колектор відпрацьованого повітря відбуваються втрати від 10 до 15 %.

Кількість поживного середовища та посівного матеріалу, зважаючи на втрати під час біосинтезу, перед виробничим біосинтезом становитиме:

$$V_{\text{роб.1}} = V_{\text{кр}}/(1-E_{\text{ф}}) = 169/(1-0,13) = 194 \text{ л},$$

де $E_{\text{ф}}$ – втрати культуральної рідини, які відбуваються під час біосинтезу.

Таким чином, виробничий біосинтез буде здійснюватися у ферментері з робочим об'ємом $V_{\text{роб.1}} = 194$ л.

Ферментер має коефіцієнт заповнення $K_{\text{зап}} = 0,5 - 0,65$, тому можливий геометричний об'єм ферментера ($V_{\text{ф}}$) становить:

$$V_{\text{ф}} = V_{\text{роб.1}}/K_{\text{зап}} = 194/0,6 = 323 \text{ л}.$$

За об'ємом найближчим варіантом є стандартний ферментер $V_{\text{сф}} = 300$ л. Коефіцієнт заповнення для ферментера об'ємом 300 л становитиме:

$$K_{\text{зап1}} = V_{\text{роб.1}}/V_{\text{сф}} = 194/300 = 0,646.$$

Отриманий у результаті розрахунків коефіцієнт заповнення відрізняється від вибраних меж на допустимому рівні, тобто геометричний об'єм ферментера вибрано вірно.

До 10 % від об'єму поживного середовища представлено дозою посівного матеріалу.

Враховуючи вміст посівного матеріалу кількість поживного середовища для виробничого біосинтезу становить:

$$V_{\text{пс1}} = V_{\text{роб.1}} / (1 + X_{\text{пм}}) = 194 / (1 + 0,1) = 176,4 \text{ л},$$

де $X_{\text{пм}} = 0,1$ – доза посівного матеріалу для ферментера.

Відповідно кількість посівного матеріалу, яка вноситься у ферментер, становить:

$$V_{\text{пм1}} = V_{\text{роб.1}} - V_{\text{пс1}} = 194 - 176,4 = 17,6 \text{ л.}$$

Під час отримання інокуляту також можливі втрати у результаті крапливиносy ($E_{\text{кр}}$) від 10 до 15 %. Враховуючи втрати кількість поживного середовища та посівного матеріалу, яка міститься у посівному апараті становитиме:

$$V_{\text{роб.2}} = V_{\text{пм1}} / (1 - E_{\text{кр}}) = 18 / (1 - 0,1) = 19,6 \text{ л.}$$

До 10 % вмісту апарату становить посівний матеріал, тому кількість поживного середовища в посівному апараті:

$$V_{\text{пс2}} = V_{\text{роб.2}} / (1 + X_{\text{фа}}) = 19,6 / (1 + 0,1) = 17,8 \text{ л},$$

де $X_{\text{фа}} = 0,1$ – доза інокуляту для посівного апарату.

Відповідно у посівному апараті знаходиться наступна кількість посівного матеріалу:

$$V_{\text{пм2}} = V_{\text{роб.2}} - V_{\text{пс2}} = 19,6 - 17,8 = 1,8 \text{ л.}$$

Враховуючи необхідний об'єм інокуляту $V_{\text{пм1}} = 19,6$ л, його можна одержати при культивування *A. bisporus* у посівному апараті геометричним об'ємом:

$$V_{\text{па2}} = V_{\text{роб.2}} / K_{\text{зап}} = 19,6 / 0,6 = 32,7 \text{ л.}$$

Найближчим до розрахованого значення є стандартний ферментер $V_{\text{сф}} = 30$ л. Для перевірки здійснюємо перевірочний розрахунок:

$$K_{\text{з1}} = V_{\text{роб.2}} / V_{\text{сф}} = 19,6 / 30 = 0,65.$$

Посівний матеріал кількістю $V_{\text{пм2}} = 1800$ мл доцільно отримати культивуванням грибів *A. bisporus* у колбах на качалці об'ємом $V_{\text{колб}} = 750$ мл та із коефіцієнтом заповнення $K_{\text{зап}} = 0,2$. Для отримання заданої кількості інокуляту необхідно використати:

$$N_{\text{колб}} = V_{\text{пм2}} / (V_{\text{колб}} \cdot K_{\text{зап}}) = 1800 / (750 \cdot 0,2) = 12 \text{ колб.}$$

Аналізуючи проведені розрахунки стає зрозумілим про двохетапне отримання посівного матеріалу для виробничого біосинтезу. Таким чином, за результатами розрахунків для біосинтезу міцеліальної маси *A. bisporus* для потреб грибної ферми «Гелека-М» рекомендовано до встановлення один ферментер об'ємом 300 л і один інокулятор об'ємом 30 л. Кількість трудоднів рівномірно розподіляється 3 рази на рік, що є досить зручним варіантом. Оскільки кількість трудоднів становить лише 81 днів на рік, у інший час на підприємстві можна вирощувати посівний матеріал для інших грибів або запускати інше виробництво.

5.6. Обґрунтування вибору допоміжних стадій виробництва

5.6.1. Обґрунтування типу культивування та ферментера

Зважаючи на той факт, що під час культивування *Agaricus bisporus* культура є досить вразливою до контамінантів (див. Розділ 2) виробниче культивування для отримання міцеліальної маси *A. bisporus* повинне виконуватися у асептичних умовах. Для уникнення потрапляння контамінантів необхідно здійснювати стерилізацію виробничого обладнання, поживних середовищ, піногасника, титрувальних розчинів, аераційного повітря.

Оскільки не існує достатньої кількості достовірних публікацій щодо практичної реалізації безперервного культивування вищих базидіоміцетів дане виробниче культивування здійснюється періодичним способом. Оскільки згідно розрахунку вмісту джерела Карбону у середовищі його кількість становить 40 г/л, то відбувається дробне живлення. На початок культивування у середовище вноситься екстракт цукрової тростини у концентрації 20 г/л, оскільки зменшення та збільшення не дозволяє отримати максимум біомаси. Згідно літературних даних дробне внесення джерела Карбону відбувається після 2 доби культивування [57].

Культура *A. bisporus* вирощується глибинним способом на рідкому поживному середовищі. Таким чином, на відміну від мало контрольованих умов при твердофазному культивуванні на природних субстратів можна уникнути наявності важких металів у кінцевому продукті. Метод глибинного

культивування міцелію макроміцетів дозволяє скоротити час вирощування біомаси та дає змогу контролювати її хімічний склад, що вкрай важливо для продуктів харчування. Крім того, при глибинному культивуванні здійснюється точний контроль за показниками рН, аерації, вологості, температури [76].

Зважаючи на те, що *A. bisporus* є аеробом у процесі культивування відбувається аерація та перемішування. Згідно літературних даних при глибинному культивуванні *A. bisporus* швидкість обертів мішалки становить об/хв при аерації 0,25 л повітря/л*год [57].

В процесі культивування *A. bisporus* наявним є піноутворення, оскільки до складу поживного середовища входять речовини здатні до піноутворення, тому у процесі культивування *A. bisporus* необхідним є піногасіння.

Процес виробничого біосинтезу *A. bisporus* відбувається у промисловому ферментері об'ємом 300л з робочим об'ємом 210 л. Обладнання виготовлено із нержавіючої сталі марок 316L та 304L, які використовуються для частин контактуючих та не контактуючих з продуктом відповідно. Для забезпечення доступу поживних речовин та кисню до усіх клітин міцелію ферментер оснащений лопатевою мішалкою та барботером. Крім того, ферментер оснащений привареними відбивними перегородками, які починаються біля дна апарата. Для підтримання температури під час стерилізації та культивування *A. bisporus* апарат обладнаний сорочкою. Важливою перевагою даного ферментера є відсутність «мертвих зон». Також апарат обладнаний фільтром для індивідуальної стерилізації повітря.

Аерація має вплив на ріст, морфологію клітин, споживання поживних речовин та біосинтез. В апараті встановлений кільцевий барботер. Швидкість подачі повітря становить 0,25 л повітря/л*год. Даний ферментер обладнаний різноманітними датчиками: рН, температури, піни, pO_2 , тиску. Також наявним є механічний піногасник та порт для хімічного піногасника.

Вихід повітря відбувається через верхню кришку ферментера. Також у верхній частині встановлено посівний люк з швидкозйомною кришкою та

форсунка для СІР-мийки. Коефіцієнт заповнення ферментера при культивуванні міцеліальних грибів становить 0,55-0,65 [57, 77, 78].

5.6.2. Обґрунтування стадії підготовки виробничих приміщень, вибору мийних та дезінфікувальних засобів

Виробництво посівного матеріалу *Agaricus bisporus* триває 81 днів і відбувається три рази на рік, через низьку тривалість зберігання 4-6 місяців. Оскільки співвідношення висоти до діаметру виробничого ферментера становить 3:1, а об'єм циліндра розраховується за формулою

$$V = \pi R^2 h$$

де V – об'єм циліндра,

R - радіус циліндра,

h - висота циліндра,

$\pi = 3.141592$.

Відповідно ширина виробничого ферментера становить 0,5 м, а висота відповідно – 1,5 м. Співвідношення висоти до діаметру інокулятора об'ємом 30 л становить 3:1, ширина інокулятора становить – 0,025 м, а висота – 0,75 м. Відстань між обладнанням становить 1 м, та між обладнанням та стіною 1 м. Оптимальна площа виробничого приміщення в якому розміщується ферментер об'ємом 300 л, запасний ферментер об'ємом 300 л, реактор-змішувач об'ємом 63 л, реактор об'ємом 15 л для приготування підживлювального розчину, інокулятор об'ємом 30 л, запасний інокулятор на 30 л та СІР-мийка становить 42 м² (7*6 м). Оскільки висота ферментера становить 2,1 і в нього подається самотоком підживлювальний розчин з реактора-змішувача на висоті 2,5 м, висота стін – 3 м, проте висота миття становить 2,5 м. Загальна площа стін становить $((7*2,5)+(6*2,5))*2= 65$ м². Площа підлоги 42 м² [78, 79].

Оптимальна площа лабораторії в якій розміщуються технічні ваги, автоклав, качалки для колб, термостат, шафа з реактивами, холодильник, сухожарова шафа, мийка та бокс становить 20 м² (4*5 м). Висота стін – 3 м, висота миття – 2,5 м. Загальна площа стін становить $((4*2,5)+(5*2,5))*2= 45$ м².

Площа підлоги 20 м². Загальна площа, яка підлягає миттю та дезінфекції наведена у табл. 5.6.1.

З метою вибору оптимального миючого й дезінфікуючого засобу встановлюється їх вартість та розраховуються витрати при використанні. Приблизно на 1 м² поверхні затрачається 100 мл робочого розчину мийного чи дезінфікувального засобу (згідно з методичними рекомендаціями щодо підготовки виробничих приміщень, наказ МОЗ України від 14.12.2001 № 502) [80].

Вартість концентратів мийних та дезінфікувальних засобів та їх витрати при виробництві наведено в табл. 5.6.2.

Таблиця 5.6.1

Розрахунок загальної площі миття та/або дезінфекції оброблюваного об'єкту за весь період виробництва посівного матеріалу *A. bisporus*

Об'єкт миття та/або дезінфекції	Площа оброблюваного об'єкту, м ² (л)	Кількість процесів миття та/або дезінфекцій за весь період виробництва	Загальна площа миття та/або дезінфекцій об'єкту за весь період виробництва, м ² (л)
Обладнання, інвентар, комунікації	78,6	12	918
Стіни, стеля, вікна, підлога	172	11	1892

Варто зазначити, що дезінфікуючий засіб «Бланідас 300» випускається у вигляді таблеток. 100 таблеток достатньо для приготування 3000 л розчину.

Таблиця 5.6.2

**Узагальнена характеристика витрат мийних та дезінфікуючих засобів для виробництва
посівного матеріалу *A. bisporus***

Назва мийного/ дезінфікуючого засобу	Об'єкт миття та/або дезінфекції	Концентрація робочого розчину, %	Загальна площа миття та/або дезінфекції об'єкту за весь період виробництва, м ² (л)	Кількість робочого розчину за весь період виробництва, л	Вартість 1 л/кг мийного або дезінфікуючого засобу, грн	Загальна вартість миття та/або дезінфекції за весь період виробництва, грн
Каустична сода ¹	Обладнання, інвентар, комунікації	2,0	918	183,6	21,9	80,5
Кальцинована сода ¹	Обладнання, інвентар, комунікації	2,0	918	183,6	9,5	34,90
Аеродезин ¹ (1-пропанол, етанол, четвертинні амонійні з'єднання)	Стіни, двері, вікна, інвентар	100	1892	189,2	195	36894
Бланідас 300 ² (натрієва сіль дихлорізоціанурової кислоти, адипінова кислота)	Стіни, двері, вікна, обладнання	0,06	1892	189,2	56,25	136,2
Санокварт ¹ (гуанідинові основи)	Стіни, двері, вікна	1,0	1892	189,2	259	490
Бацилол АФ ¹ (1-пропанон, 2- пропанон, етанол, 2- бутанон)	Стіни, двері, вікна	100	1892	189,2	250	47300

Примітка: 1 – <https://prom.ua>, 2 – <https://blanidas.com.ua>.

Концентрація робочого розчину для дезінфекції стін, стелі, підлоги, вікон та обладнання становить 0,06 %, для його приготування необхідно всього 4 таблетки на 10 л води. Оскільки за весь період виробництва необхідно 172 л для миття стін, стелі та підлоги, то необхідно використати всього 76 таблеток.

Проаналізувавши дані, наведені у табл. 5.6.2, можна зробити наступні висновки:

- для миття обладнання, комунікацій, інвентарю і тари доцільно використовувати наступні мийні засоби: кальцинована сода або каустична сода [81];
- для миття та дезінфекції стін, вікон, підлоги, та дверей – «Бланідас 300» та «Санокварт». Оскільки виробництво триває довше місяця та можливе вирощування іншого посівного матеріалу грибів після припинення данного виробництва обираємо препарати різної хімічної природи [82,83].

Миття ферментера (300 л), інокулятора (30 л), збірника для приготування композицій для виробничого культивування (загалом 130 л) відбуватиметься циркуляційним способом. Об'єм мийного засобу складатиме близько 20 % кожного з відповідних об'ємів обладнання. Всього для одного циклу необхідно витратити приблизно 61,2 л робочого розчину мийного засобу, а для всього періоду виробництва – 183,6 л.

Підлогу необхідно мити кожного дня (всього 81 разів), але враховуючи незначні забруднення для цього використовується вода, стіни, вікна, двері та підлога - під час генерального прибирання (1 раз на тиждень), тобто близько 10 разів.

Перевагами використання дезінфікуючого засобу «Бланідас 300» є:

- низькі втрати при використанні;
- можливість одночасного використання для дезінфекції стін, підлоги, дверей та інвентарю;
- тривалість зберігання (більше 3 років);
- широкий спектр протимікробних та фунгіцидних властивостей;
- високоефективний;

- добре змивається.

Переваги використання дезінфікуючого засобу «Санокварт»:

- пролонгований знезаражуючий ефект при використанні;
- широкий спектр антимікробної та фунгіцидної дії;
- економічність;
- низько токсична для персоналу [82,83].

Для підтримання чистоти повітря використовуються бактерицидні лампи. Тривалість їх роботи після генеральних прибирань становить 1 год, а кожного дня – 0,5 год.

5.6.3. Обґрунтування стадії підготовки обладнання і комунікацій

Миття. Розрізняють внутрішнє і зовнішнє миття. Для внутрішнього миття використовується СІР-мийка. Процеси мийки складаються з виконуваних послідовно операцій або їх циклів:

- видалення залишків продукту;
- попереднє ополіскування;
- рециркуляція миючого розчину;
- проміжне ополіскування;
- повторна рециркуляція миючого розчину (при необхідності);
- проміжне ополіскування;
- остаточне ополіскування.

Перевагами її використання є:

- можливість багаторазового використання миючих розчинів;
- підтримання заданої концентрації, температури миючих розчинів, часу обробки в автоматичному режимі;
- можливість збору ополіскуючої води;
- можливість автоматичного і ручного режиму роботи;
- вбудована функція підтримання концентрації миючих розчинів;

- індивідуальні програми мийки для різних об'єктів;
- можливість модернізації – додавання додаткових контурів мийки і опцій;
- функція зворотнього зв'язку з об'єктами мийки;
- можливість нейтралізації миючих розчинів;
- мінімальний вплив людського фактору;
- економна витрата пари за рахунок системи рекуперації тепла;
- економна витрата миючих засобів, за рахунок контролю провідності при витісненні миючих розчинів і води з контурів мийки;
- надійність і простота у використанні;
- економічність (низька витрата води, електроенергії, пари при високій якості мийки);
- повна автоматизація і комп'ютерне керування параметрами [84].

Режим роботи СІР-мийки складається із наступних стадій:

1. Підготовка миючих розчинів;
2. Подача миючих розчинів і повернення;
3. Ополіскування обладнання.

Для зовнішньої мийки використовуються миючі та дезінфікуючі засоби. Миття здійснюється вручну.

Стадія технічного огляду (ТО). Після закінчення процесів миття та ополіскування ємнісного обладнання проводиться його технічний огляд для виявлення можливих неущільнень та руйнувань в комунікаціях та запірній арматурі на обладнанні. У разі виявлення відхилень проводиться підтягування різьбових з'єднань або заміна прокладок.

Перевірка на герметичність. Для того, щоб простерилізувати апарат, необхідно перевірити його герметичність. Для цього закривається уся запірна арматура і відбувається подача аераційного повітря до встановлення надлишкового тиску $P = 0,1 - 0,2$ МПа. Перекриваються вентиль подачі повітря і автоматично

фіксуються показники манометра на кришці апарату і час витримки (30–60 хв) в операційному журналі. Апарат герметичний, якщо тиск змінюється не більше ніж на 0,01 МПа. Якщо зміна тиску більша відбувається пошук неущільнень на апараті і в місцях з'єднання запірної арматури із комунікаціями.

Для пошуку неущільностей використовують методи «омилювання» і використання течієшукачів. Найпростішим у реалізації є спосіб «омилювання» місць з'єднань. Для цього готується мильний розчин і резиновою грушою оприскуються всі місця з'єднань апаратури. У разі появи у місцях оприскування дрібних мильних бульбашок це місце фіксують і здійснюється підтягування різьбового з'єднання. Якщо дана операція не дала позитивного результату, змінюють прокладку і повторюють «омилювання». Процес здійснюється до ліквідації усіх виявлених неущільнень обладнання.

Способу омилення притаманні наступні недоліки:

- трудомісткість;
- неможливість контролю за підвищених температур поверхностей вузлів та апарта;
- необхідність створення високого тиску в апаратах;
- неможливість перевірки важкодоступних вузлів.

Інший метод перевірки на герметичність ґрунтується на використанні галогенових течієшукачів. Прилад, що використовується, укомплектований тонким щупом і вимірювачем вмісту галогену. Перед створенням тиску в апарат подається невелика кількість леткої галогенвмісної речовини, як правило це чотирихлористий карбон (CCl_4), фреон-12 або шестифтористий сульфур (SF_6), закривається уся запірна арматура, відбувається нагрівання апарату до температури 80°C і збільшується тиск в апараті до 0,2 МПа. Пари галогенвмісної речовини мають можливість проникати через неущільнення і їх виявляють при наближенні щупа течієпошукача до даних місць. Тривалість перевірки одного апарату даним

способом становить від 1,5 до 2 год. При виявленні неущільностей здійснюється операції з їх ліквідація як описано вище.

Стадія стерилізації обладнання та комунікацій. Для цього використовують, як правило, термічну стерилізацію водяною насиченою парою з тиском $P = 0,28\text{--}0,3$ МПа. Процес умовно поділяють на три етапи: нагрів апарата, витримування за температури стерилізації (стерилізація) та охолодження.

Нагрів апарата. Під час стерилізації апарата попередньо в сорочку подають глуху пару і прогрівають апарат до температури $80\text{--}90\text{ }^{\circ}\text{C}$, для того, щоб уникнути резонансу температур при подачі гострої пари.

Стерилізація. Під час стерилізації відкривається уся запірна арматура на відкритих трубних закінченнях і підведених до апарата комунікаціях і відбувається подача гострої пари безпосередньо в апарат через бнижній спуск або барботер, попередньо відкривши вентиль виходу відпрацьованого повітря для видалення повітря з апарату. При досягненні в апараті температури стерилізації $t_{\text{ст}} = 130\text{--}135\text{ }^{\circ}\text{C}$ закривають усю запірну арматуру на апараті, крім парової, і витримують заданий час стерилізації. Під час стерилізації апарата паралельно стерилізуються індивідуальні фільтри стерильного та відпрацьованого повітря.

Охолодження. Закривається уся запірна арматура подачі пари в апарат. У сорочку подається холодна вода. Для компенсації падіння тиску (утворення вакууму при конденсації пари в апараті) в апарат подають стерильне повітря. Процес охолодження здійснюють до досягнення температури до $30\text{--}40\text{ }^{\circ}\text{C}$ і надлишкового тиску $P = 0,003\text{--}0,005$ МПа.

5.6.4. Обґрунтування стадії підготовки аераційного повітря

A. bisporus є аеробним організмом. Рівень аерації становить $0,25$ л повітря/л*год. Тому підготовка стерильного аераційного повітря є досить важливим етапом.

Для стерилізації повітря у боксі та лабораторії, де працюють із посівною культурою та інокулятом, використовують УФ-лампи (опромінення ультрафіолетовими променями).

Підготовка аераційного повітря на виробництві складається із таких стадій:

- забір атмосферного повітря за допомогою вертикальної труби з повітрязабірником на висоті $H \sim 3$ м від даху будівлі, де розміщене обладнання для стиснення та очищення повітря.

- очищення повітря від пилу ($\delta > 50$ мкм) фільтрах грубого очищення. З цією метою найкраще використовувати високоефективні пиловловлювачі, принцип роботи яких заснований на роботі циклону з деякими конструктивними відмінностями. Повітря потрапляє у пристрій через вертикальне сопло, далі за рахунок спеціального рельєфу всередині корпусу створені зони розрядження, де затримуються частинки пилу. В результаті частинки осідають на дно бункера, а очищене повітря потрапляє на подальше очищення [85].

- стиснення повітря в компресорах або турбоповітродувках. Робота, яка здійснюється у компресорі відбувається для збільшення тиску повітря, для збільшення температури повітря та на тепло, яке виводиться із компресора. Найкращим варіантом є використання безмаслянистих компресорів серії EnviroAire T/TVS, які характеризуються конструктивним дизайном, інноваційним функціональним принципом та високою якістю виготовлення. Надійна якість та висока ефективність компресора гарантують безпечне та малозатратне стиснене безмасляне повітря. Використання двоступінчастого компресорного блоку забезпечує низьке питоме споживання енергії [86].

- охолодження стисненого повітря до температури «точки роси», за якої волога повітря конденсується. Для цього використовуються водяні теплообмінники різного типу або осушувачі холодильного типу. Осушувачі призначені для осушки стисненого повітря з необхідною точкою роси. Відносна вологість стисненого повітря після будь-якого компресора становить 100%, і знижується осушувачами

холодильного типу до 21% (тобто $0,75 \text{ г/м}^3 \text{ H}_2\text{O}$), що відповідає точці роси $+3^\circ \text{C}$. Температура стисненого повітря, що виходить зі стискаючого елементу компресора, найчастіше буває в межах $70\text{--}200^\circ \text{C}$. Для зниження цієї температури в компресорі використовується вбудований кінцевий охолоджувач, який також сприяє зменшенню вмісту води. Він представляє з себе теплообмінник, що охолоджує гаряче повітря до температури, яка не перевищує $+10^\circ \text{C}$ від температури навколишнього середовища. Кінцевий охолоджувач може мати або повітряне, або водяне охолодження, і зазвичай оснащується вологовідокремлювачем з автоматичним зливом конденсату, що дозволяє вилучити сконденсовану вологу, яка б в іншому випадку потрапила в пневмосистему. Але слід враховувати, що відносна вологість стислого повітря після кінцевого охолоджувача і вологовідокремлювача завжди становить 100% [87].

- видалення конденсованої води та парів мастила, що потрапили з компресора, у ресивері (ємність великого об'єму);

- стабілізація показників (тиск, температура) підігріванням до температури $45\text{--}50^\circ \text{C}$ парою у відповідних теплообмінниках, наприклад кожухотрубних або типу «труба в трубі»;

- очищення у головних ємнісних набивних фільтрах до ступеня очищення $E=95\%$. Головні фільтри, зазвичай, встановлюють поблизу ферментаційних відділень;

- очищення в індивідуальних фільтрах. Повітря від головних фільтрів через трубопроводи (колектори) подається безпосередньо до індивідуальних фільтрів, встановлених на ферментері. При цьому повітря очищають до ступеня очищення $E=99,99\%$. Специфічною вимогою, пропонованою до фільтруючих матеріалів, застосовуваних на даній стадії очищення, є необхідність їхньої періодичної стерилізації парою разом з усім устаткуванням технологічної лінії. Фільтруючі матеріали, використовувані на стадії тонкого очищення, поділяються на кілька груп: тонковолокнисті матеріали у вигляді матів, картону й паперу, зернисті тверді фільтруючі перегородки (керамічні, металокерамічні, з полімерних

матеріалів) і мембранні фільтри. Для волокнистих фільтрів використовують базальтове супертонке волокно (БСТВ), хлопоасбест, скло, сополімер вінілхлориду і акрилонітрилу. Картон і папір використовуються для ущільнення матів при упакуванні їх у фільтри. Волокнисті матеріали дешеві, вони мають малий гідравлічний опір (0,01-0,03 МПа) і велику пилоємність, тому вони вважаються досить перспективними для мікробіологічної промисловості. Для підвищення стійкості до впливу гострої пари використовують латексні просочення. Додатково проводять просочення волокон бактерицидними з'єднаннями, наприклад, антибіотиками, гексахлорофеном і іншими речовинами [88].

Таким чином, для підготовки повітря для вирощування посівного матеріалу та виробничого культивування використовуються фільтри грубої очистки та індивідуальні фільтри. Індивідуальні фільтри встановлюються безпосередньо перед кожним ферментером. Головні фільтри заповнюються набивним волокном і встановлюються в цеху ферментації на головному повітряному колекторі стиснутого аераційного повітря. На цих фільтрах видаляється близько 98 % мікроорганізмів-контамінантів. Використання ж індивідуальних фільтрів, які заповнюються надтонкими мембранами чи волокнами, дає змогу отримати повітря зі ступенем очистки 99,9999%

Відпрацьоване повітря через колектори подається на аналогічні головні фільтри для очищення та знешкодження. У разі невеликих витрат повітря такі фільтри встановлюють безпосередньо на ферментері.

5.6.5. Обґрунтування способу підготовки та стерилізації поживного середовища

Для одержання посівного матеріалу *A. bisporus* та виробничого біосинтезу використовуються різні за складом поживні середовища. Для одержання посівного матеріалу *A. bisporus* використовують поживне середовище наступного складу (г/л):

Середовище картопляної декстрази – 20;

Дріжджовий екстракт – 10;

Солодовий екстракт – 5;

Соевий пептон – 5.

Для виробничого біосинтезу для отримання міцеліальної маси *A. bisporus* використовується поживне середовище наступного складу (г/л):

Екстракт цукрової тростини – 40;

Нітрит натрію – 10;

Дріжджовий екстракт – 5 [57].

Підготовка підживлювального розчину

Оскільки при внесенні у середовище екстракту цукрової тростини у концентрації більше 30 г/л виникає інгібування росту, то частину субстрату подають у вигляді підживлювального розчину. Оскільки тривалість культивування становить 4 доби, то підживлювальний розчин вводиться кожні 2 доби, коли концентрація глюкози, до якої розщеплюється екстракт цукрової тростини через сахарозу, становить 5 г/л.

Початкова концентрація екстракту цукрової тростини становить 20 г/л, то дробним підживленням необхідно внести 20 г/л екстракту цукрової тростини. Оскільки підживлюють кожні дві доби, то підживлення відбувається лише 1 раз [57].

Підготовка піногасника. Оскільки обидва середовища для культивування *A. bisporus* мають у своєму складі піноутворюючі речовини (солодовий екстракт, дріжджовий екстракт) та зважаючи на те, що в процесі культивування *A. bisporus* утворює піноутворюючі білки, в конструкціях ферментера та інокулятора має бути передбачений механічний піногасник. Крім використання механічного піногасника, необхідне використання і хімічного піногасника. На сьогоднішній час недостатньо вивчений вплив синтетичних піногасників на ріст вищих базидіоміцетів, тому для піногасіння використовуємо рослинну олію. Найбільш оптимальним варіантом є використання оливкової олії, що було доведено у чисельних дослідженнях. Перевагами її використання є те що вона не пригнічує ріст культури при

глибинному культивуванні і майже вдвічі збільшує ріст біомаси, за рахунок впливу олеатів та пальмітатів. Зважаючи на можливість присутності спор мікроорганізмів та незначний об'єм, перед використанням олія стерилізується у автоклаві за температури 112 °C протягом 30 хв.[89,90].

Підготовка титрувальних розчинів. Оскільки культивування відбувається при рН 6-6,5 необхідно використовувати титрувальні розчини. Для титрування поживних середовищ при культивуванні *A. bisporus* можливе використання розчинів фосфорної та соляної кислот та гідроксиду натрію. Варто зазначити, що, як правило, соляна кислота у якості титрувального агента використовується при використанні декстрази або глюкози у якості джерела Карбону, оскільки у поживному середовищі використовуваному у даній роботі екстракт цукрової тростини можна припустити що у такому випадку для титрування краще використовувати розчин фосфорної кислоти. Титрувальні розчини додають із розрахунку 1 мл на 1 л середовища. Проте зважаючи на те що загальна кількість титрувальних розчинів становить по 200 мл, використовувати для їх приготування збірник є недоцільним [57, 64, 65.].

Підготовка поживних середовищ. На першому етапі для вирощування посівного матеріалу *A. bisporus* в колбах потрібно 1,8 л поживного середовища (див. розділ 1). Тому обираємо автоклав на 10 л з вертикальним завантаженням. Оскільки усі речовини стерилізуються за однакових умов, середовище на композиції не ділиться. Стерилізація відбувається протягом 30 хвилин при температурі 112 °C.

На другому етапі готують 17,8 л поживного середовища. Оскільки режим стерилізації для усіх компонентів однаковий, поживне середовище стерилізується у інокуляторі протягом 30 хвилин за температури 112 °C.

Для виробничого ферментера об'єм середовища становить 176,4 л. Оскільки для нітрату натрію режим стерилізації становить 131 °C протягом 40 хвилин, його стерилізація проводиться безпосередньо у виробничому ферментері. Відповідно

екстракт цукрової тростини та дріжджовий екстракт стерилізуються у збірнику протягом 30 хвилин за температури 112°C у вигляді 40 % розчину.

5.7. Продуктовий розрахунок, матеріальний баланс на один цикл виробничого біосинтезу, розрахунок технологічного обладнання

Згідно техніко-економічного обґрунтування потреба в міцеліальній масі *Agaricus bisporus* складає $G_{\text{нд}} = 25,53$ кг. За умовами замовника цю кількість посівного матеріалу потрібно виробити за $T_{\text{рд}} = 81$ днів. За літературними даними максимальний синтез біомаси ($P_{\text{кр}} = 15$ г/л за 96 год) досягається за умов росту *A. bisporus* на середовищі такого складу (г/л):

екстракт цукрової тростини – $C_1 = 20,0$;

натрію нітрит – $C_2 = 10,0$;

дріжджовий екстракт – $C_3 = 5,0$.

Всього – $C_{\Sigma\phi} = 35,0$ г/л.

Крім поживного середовища необхідно використовувати також підживлювальний розчин, який представлений 40% розчином екстракту цукрової з розрахунку 20 г/л.

Посівний матеріал *A. bisporus* вирощують на поживному середовищі такого складу (г/л):

картопляно-декстрозне середовище – $C_1 = 20,0$;

дріжджовий екстракт – $C_2 = 10,0$;

солодовий екстракт – $C_3 = 5,0$;

соєвий пептон – $C_4 = 5,0$.

Всього – $C_{\Sigma\pi} = 40$ г/л.

Оскільки цільовим продуктом є волога біомаса, вологість продукту становить 95 % ($W = 95\%$). Для подальших розрахунків приймаємо наступні початкові дані: час циклу роботи ферментера $T_{\text{цф}} = T_{\text{ф}} + T_{\text{по}} = 96 + 8 = 104$ год, де $T_{\text{по}}$ – час підготовчих операцій (див. розділ 1); коефіцієнт запасу (втрати культуральної рідини або посівного матеріалу від нестерильних операцій 1,1-1,5) $K_1 = 1,3$ для ферментеру та

$K_2=0,1$ для інокулятора; коефіцієнт заповнення ферментера, частка, $(0,5 - 0,65)$; приймаємо $K_{зф}=0,6$; коефіцієнт заповнення посівного апарата, частка $K_{па} =0,6$; коефіцієнт заповнення колб, частка $K_{кол} =0,2$; коефіцієнт заповнення збірника, частка $(0,7-0,8)$ $K_{зб} =0,7$.

Сумарні втрати при виділенні готового продукту (сума всіх втрат на стадіях виділення готового продукту), частка $E_{св} =0,3$; кількість посівного матеріалу для виробничих ферментерів, частка $(0,05-0,1)$ $X_{ф} = 0,1$; кількість посівного матеріалу для посівних апаратів, частка $(0,02-0,1)$ $X_{па} = 0,1$; кількість посівного матеріалу для качалочних колб, частка $(0,02-0,1)$ $X_{кол}=0,1$; втрати культуральної рідини при біосинтезі, частка $(0,1- 0,2)$ $E_{ф} = 0,1$; втрати посівного матеріалу у процесі його культивування в посівних апаратах, частка $(0,1- 0,2)$ $E_{па} =0,1$; втрати посівного матеріалу у процесі його культивування в колбах, частка $(0,01- 0,02)$ $E_{кол} =0,01$.

5.7.1. Розрахунок виробничих циклів

I. Розрахунок кількості продукту утвореного за добу культивування:

$$G_{нтд} = G_{нт}/T_{рд} = 25,53/81 = 0,32 \text{ кг /добу}$$

II. Кількість продукту за цикл:

$$G_{цк} = G_{пд} \cdot T_{цф}/24 = 0,32 \cdot 104/24 = 1,37 \text{ кг/цикл}$$

III. Розрахунок об'єму КР, який зливається за один цикл при врахуванні втрат за виробничий цикл ($E_{св}$):

$$V_{кр} = K_1 \cdot G_{цк} \cdot W / P_{кр}(1-E_{св}) = 1,3 \cdot 1,37 \cdot 0,95/15 (1-0,3) = 0,16 \text{ м}^3$$

IV. Кількість ферментацій (циклів) на рік:

$$N_{цк} = G_{нт}/ G_{цк} = 25,53/1,37 = 18,69.$$

Округлюємо кількість циклів до цілого $N_{цк} = 19$.

5.7.2. Розрахунок об'ємів поживного середовища та посівного матеріалу для виробничого біосинтезу

1.1. Об'єм готового поживного середовища з врахуванням внесення підживлювального розчину у кількості необхідній для досягнення 40 %

концентрації при концентрації 20 г/л та посівного матеріалу у виробничому ферментері при врахуванні втрат при біосинтезі (частка $E_{\phi} = 0,13$) складе:

$$V_{\phi} = V_{\text{кр}} / (1 - E_{\phi}) = 160 / (1 - 0,1) = 184 \text{ л.}$$

1.2. У виробничому ферментері об'єм поживного середовища становитиме:

$$V_{\text{псф}} = V_{\phi} / (1 + X_{\phi}) = 184 / (1 + 0,1) = 167,3 \text{ л.}$$

1.3. Витрати посівного матеріалу на інокуляцію виробничого ферментера:

$$V_{\text{пмф}} = V_{\phi} - V_{\text{псф}} = 184 - 167,3 = 16,7 \text{ л}$$

1.4. Розрахунок кількості компонентів поживного середовища та підживлювального розчину виробничого ферментера.

1.4.1. Дробним внесенням необхідно внести екстракт цукрової тростини у концентрації 20 г/л. На визначений об'єм середовища необхідно внести:

$$G_e = V_{\text{псф}} \cdot C_{\Sigma\phi} = 167,3 \cdot 0,02 = 3,3 \text{ кг}$$

Для приготування 40 % розчину необхідно 8 л води. Об'єм підживлювального розчину 11,3 л. Кількість конденсату утворена під час стерилізації становитиме:

$$V_{\text{фк}} = V_{\text{псф}} \cdot K_{\text{кон}} = 11 \cdot 0,1 = 1,1 \text{ л.}$$

Сумарний об'єм підживлювального розчину становить 12,4 л.

1.4.2. Відповідно до складу поживного середовища для виробничого культивування та враховуючи внесення підживлювального розчину, загальні витрати компонентів для приготування визначеного об'єму поживного середовища $V_{\text{псф}}$ складуть:

$$G_{\phi} = V_{\text{псф}} \cdot C_{\Sigma\phi} = (167,3 - 12,4) \cdot 35 = 5,4 \text{ кг, в тому числі:}$$

Екстракт цукрової тростини $G_1 = G_{\phi} \cdot C_1 / C_{\Sigma\phi} = 5,4 \cdot 20 / 35 = 3,1$

Нітрит натрію $G_2 = G_{\phi} \cdot C_2 / C_{\Sigma\phi} = 5,4 \cdot 10 / 35 = 1,5$

Дріжджовий екстракт $G_3 = G_{\phi} \cdot C_3 / C_{\Sigma\phi} = 5,4 \cdot 5 / 35 = 0,8.$

1.4.3. Для приготування поживного середовища необхідного для виробничого культивування необхідно встановити кількість води для розчинення компонентів.

Кількість необхідної води визначають за наступним чином:

$$V_{\text{вф}} = V_{\text{псф}} - G_{\phi} - V_{\text{фк}},$$

де $V_{\text{фк}} = V_{\text{псф}} \cdot K_{\text{кон}}$ - розбавлення виробничого поживного середовища конденсатом пари при його стерилізації, $K_{\text{кон}}$ – частка конденсату у загальній кількості води, що йде на приготування поживного середовища.

При об'ємі поживного середовища у ферментері $V_{\text{псф}} = 153,6$ л, доцільним є проведення стерилізації композицій А й Б у реакторі-змішувачі та ферментері відповідно. Тоді кількість конденсату становитиме:

$$V_{\text{фк}} = V_{\text{псф}} \cdot K_{\text{кон}} = 154,9 \cdot 0,1 = 15,4 \text{ л.}$$

Для розчинення до необхідної концентрації використовується наступна кількість води:

$$V_{\text{вф}} = V_{\text{псф}} - G_{\text{ф}} - V_{\text{фк}} = 154,9 - 5,4 - 15,4 = 134,1 \text{ л}$$

Для спрощення розрахунків приймаємо, що густина компонентів приблизно рівна густині води, тобто $1 \text{ л} = 1 \text{ кг}$.

Для формування композицій проводимо розрахунок кількості води для розчинення компонентів. Екстракт цукрової тростини необхідно готувати у вигляді 40 % розчину, щоб уникнути потрапляння сторонньої мікробіоти. Тому для розчинення 3,1 кг екстракту цукрової тростини необхідно 8,1 л води. На 5 г дріжджового екстракту необхідно 100 мл води зважаючи на погану розчинність даного компонента. Оскільки для приготування поживного середовища, яке використовується при виробничому біосинтезі необхідно 800 г дріжджового екстракту, для його розчинення необхідно 17 л води. Відповідно решта води, тобто 109 л, використовуються для розчинення нітриту натрію.

Розрахунок конденсату покомпонентно:

$$\text{Екстракт цукрової тростини } V_{1\text{к}} = V_{\text{фк}} (C_1 / C_{\Sigma\text{ф}}) = 15,4(20/35) = 8,8$$

$$\text{Нітрит натрію } V_{2\text{к}} = V_{\text{фк}} (C_2 / C_{\Sigma\text{ф}}) = 15,4(10/35) = 4,4$$

$$\text{Дріжджовий екстракт } V_{3\text{к}} = V_{\text{фк}} (C_3 / C_{\Sigma\text{ф}}) = 15,4(5/35) = 2,2$$

1.4.3.1 Формування композицій А, Б

Відповідно до режимів стерилізації компонентів поживне середовище для виробничого культивування ділиться на композиції наведені у табл. 5.7.2.

Таблиця 5.7.2

Композиції для стерилізації поживного середовища

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 153,6 л середовища, кг (л)	Композиція	Об'єм композиції, V, л
Екстракт цукрової тростини	20	3,1	А	40,7
Дріжджовий екстракт	5	0,8		
Вода		25,1		
Конденсат		11		
Нітрит натрію	10	1,5	Б	112,9
Вода		109		
Конденсат		4,4		
Разом:		154,9		154,9

2.1. З врахуванням втрат при біосинтезі (частка, $E_{\phi} = 0,1$) кількість поживного середовища та інокуляту в інокуляторі становить:

$$V_{\phi} = V_{\text{кр}} / (1 - E_{\phi}) = 16,7 / (1 - 0,1) = 18,6 \text{ л.}$$

2.2. Об'єм готового поживного середовища для інокулятора становить, л:

$$V_{\text{псф}} = V_{\phi} / (1 + X_{\phi}) = 18,6 / (1 + 0,1) = 16,9 \text{ л,}$$

2.3. Витрати посівного матеріалу на інокуляцію інокулятора:

$$V_{\text{пмф}} = V_{\phi} - V_{\text{псф}} = 18,6 - 16,9 = 1,7 \text{ л}$$

2.4. Розрахунок кількості компонентів поживного середовища інокулятора

2.4.1. Згідно зі складом поживного середовища загальні витрати компонентів на приготування 16,9 л поживного середовища $V_{\text{псф}}$ складуть:

$$G_{\phi} = V_{\text{псф}} \cdot C_{\Sigma\phi} = 16,9 \cdot 40 = 676 \text{ г, в тому числі:}$$

Картопляно-декстрозне середовище $G_{1\text{п}} = G_{\phi} \cdot C_{1\text{п}} / C_{\Sigma\phi} = 676 \cdot 20 / 40 = 338$.

Дріжджовий екстракт $G_{3\text{п}} = G_{\phi} \cdot C_{3\text{п}} / C_{\Sigma\phi} = 676 \cdot 10 / 40 = 169$.

Солодовий екстракт $G_{2\text{п}} = G_{\phi} \cdot C_{2\text{п}} / C_{\Sigma\phi} = 676 \cdot 5 / 40 = 84$.

Соєвий пептон $G_{4\text{п}} = G_{\phi} \cdot C_{4\text{п}} / C_{\Sigma\phi} = 676 \cdot 5 / 40 = 85$.

2.4.2. Розрахунок кількості води для приготування поживного середовища для інокулятора

При стерилізації середовища у інокуляторі кількість конденсату буде:

$$V_{\text{фк}} = V_{\text{псф}} \cdot K_{\text{кон}} = 16,9 \cdot 0,1 = 1,69 \text{ л.}$$

Для розчинення компонентів необхідна кількість води становить:

$$V_{\text{вф}} = V_{\text{псф}} - G_{\text{ф}} - V_{\text{фк}} = 16,9 - 0,676 - 1,69 = 14,534 \text{ л.}$$

Оскільки всі компоненти поживного середовища стерилізуються при 112 °С розділення на композиції не здійснюється.

3.1. Кількість поживного середовища та посівного матеріалу в колбах становить 1,6 л.

3.2. Об'єм готового поживного середовища у колбах, л

$$V_{\text{псф}} = V_{\text{ф}} / (1 + X_{\text{ф}}) = 1,7 / (1 + 0,1) = 1,5 \text{ л,}$$

3.3. Витрати посівного матеріалу на засів колб

$$V_{\text{пмф}} = V_{\text{ф}} - V_{\text{псф}} = 1,7 - 1,5 = 0,2 \text{ л}$$

3.4. Розрахунок кількості компонентів поживного середовища в колбах

3.4.1. Відповідно до складу поживного середовища загальні витрати компонентів на визначений об'єм поживного середовища $V_{\text{псф}}$ складуть:

$$G_{\text{ф}} = V_{\text{псф}} \cdot C_{\Sigma\text{ф}} = 1,5 \cdot 40 = 60 \text{ г, в тому числі:}$$

Картопляно-декстрозне середовище $G_{1\text{п}} = G_{\text{ф}} \cdot C_{1\text{п}} / C_{\Sigma\text{ф}} = 60 \cdot 20 / 40 = 30$.

Дріжджовий екстракт $G_{3\text{п}} = G_{\text{ф}} \cdot C_{3\text{п}} / C_{\Sigma\text{ф}} = 60 \cdot 10 / 40 = 15$.

Солодовий екстракт $G_{2\text{п}} = G_{\text{ф}} \cdot C_{2\text{п}} / C_{\Sigma\text{ф}} = 60 \cdot 5 / 40 = 7,5$.

Соєвий пептон $G_{4\text{п}} = G_{\text{ф}} \cdot C_{4\text{п}} / C_{\Sigma\text{ф}} = 60 \cdot 5 / 40 = 7,5$.

3.4.2. Розрахунок кількості води для приготування поживного середовища для культивування у колбах. Кількість води необхідної для розведення до необхідної концентрації компонентів середовища становить:

$$V_{\text{вф}} = V_{\text{псф}} - G_{\text{ф}} - V_{\text{фк}} = 1500 - 60 = 1440 \text{ мл.}$$

Оскільки всі компоненти поживного середовища стерилізуються при 112 °С розділення на композиції не здійснюється.

5.7.3. Розрахунок матеріального балансу

Таблиця 5.7.3

Матеріальний баланс на один цикл виробничого біосинтезу

№	Використано		Отримано	
	Назва сировини і напівпродукту	Кількість, кг, л	Назва кінцевого продукту, відходів та втрат	Кількість, кг, л
1	ПРИГОТУВАННЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ ВИРОЩУВАННЯ ІНОКУЛЯТУ В КОЛБАХ НА КАЧАЛКАХ			
1.1	Картопляно-декстрозне середовище	0,03	Нестерильне ПС	1,5
1.2	Дріжджовий екстракт	0,015		
1.3	Солодовий екстракт	0,0075		
1.4	Соевий екстракт	0,0075		
1.5	Вода	1,44		
	Всього:	1,5	Всього:	1,5
2	СТЕРИЛІЗАЦІЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА В АВТОКЛАВІ			
2.1	Нестерильне ПС	1,5	Стерильне ПС	1,5
	Всього:	1,5	Всього:	1,5
3.	ВИРОЩУВАННЯ ПОСІВНОГО МАТЕРІАЛУ В КОЛБАХ НА КАЧАЛЦІ			
3.1	Стерильне ПС	1,5	Посівний матеріал	1,7
3.2	Посівний матеріал з чашки	0,2		
3.3	Втрати (частка)	0,01		0,01
	Всього:	1,7	Всього:	1,7
4	ПРИГОТУВАННЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ ІНОКУЛЯТОРА ОБ'ЄМОМ 30 Л			
4.1	Картопляно-декстрозне середовище	0,338	Нестерильне ПС	15,21
4.2	Дріжджовий екстракт	0,169		
4.3	Солодовий екстракт	0,084		
4.4	Соевий екстракт	0,085		
4.5	Вода	14,534		
	Всього:	15,21	Всього:	15,21
5	СТЕРИЛІЗАЦІЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ ІНОКУЛЯТОРА ОБ'ЄМОМ 30 Л			

5.1	Нестерильне ПС	15,21	Стерильне ПС	16,9
5.2	Конденсат	1,69	(втрат немає)	
	Всього:	16,9	Всього:	16,9
6	ВИРОЩУВАННЯ ПОСІВНОГО МАТЕРІАЛУ В ІНОКУЛЯТОРІ ОБ'ЄМОМ 30 Л			
6.1	Стерильне ПС	16,9	Посівний матеріал	16,7
6.2	Посівний матеріал з колб на качалках	1,7		
6.3	Втрати (частка)	0,1	Втрати (кількість)	1,9
	Всього:	18,6	Всього:	18,6
7	ПРИГОТУВАННЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ ФЕРМЕНТЕРА ОБ'ЄМОМ 300 Л			
7.1	Екстракт цукрової тростини	3,1	Нестерильне ПС	139,5
7.2	Дріжджовий екстракт	0,8		
7.3.	Натрію нітрит	1,5		
7.4.	Вода	134,1		
	Всього:	139,5	Всього:	139,5
8	СТЕРИЛІЗАЦІЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ ФЕРМЕНТЕРА ОБ'ЄМОМ 300 Л			
8.1.	Нестерильне ПС	139,5	Стерильне ПС	154,9
8.2.	Конденсат	15,4		
	Всього:	154,9	Всього:	154,9
9	ПРИГОТУВАННЯ ПІДЖИВЛЮВАЛЬНОГО РОЗЧИНУ ДЛЯ ВИРОБНИЧОГО БІОСИНТЕЗУ			
9.1	Екстракт цукрової тростини	3,3	Нестерильний ПР	11,3
9.2	Вода	8		
	Всього:	11,3	Всього:	11,3
10	СТЕРИЛІЗАЦІЯ ПІДЖИВЛЮВАЛЬНОГО РОЗЧИНУ ДЛЯ ВИРОБНИЧОГО БІОСИНТЕЗУ			
10.1	Нестерильний ПР	11,3	Стерильний ПР	12,4
10.2	Конденсат	1,1		
	Всього:	12,4	Всього	12,4
11	ВИРОБНИЧИЙ БІОСИНТЕЗ			
11.1	Стерильне ПС	154,9	Культуральна рідина на фільтрацію	165,6

11.2	Посівний матеріал з інокулятора	16,7		
9.3	Підживлювальний розчин	12,4		
9.3	Втрати (частка)	0,1	Втрата (кількість)	18,4
	Всього:	184	Всього:	184

Оскільки кількість культуральної рідини згідно матеріального балансу (165,6 л) не співпадає з кількістю культуральної рідини, відповідно п.1.4. (160 л) розрахунку партій продукту знаходимо похибку:

$$(165,6-160) \cdot 100/165,6 = 3,38\%,$$

Дане значення менше 5 % тому вважаємо, що матеріальний баланс зроблений вірно.

5.7.4. Розрахунок технологічного обладнання

1. Розрахунок кількості виробничих ферментерів.

1.1. Приблизний загальний геометричний об'єм ферментерів при заданому $K_{зф}=0,6$, л:

$$V_{фг}=V_{ф}/K_{зф}=184/0,6=306,7 \text{ л}$$

1.2. Вибираємо найближчий за об'ємом ферментер, л:

$$V_{фт}=300$$

1.3. Кількість виробничих ферментерів при заданому K_z , од.:

$$N_{фр}=V_{фг}/V_{фт}=306,7/300=1,02 - \text{приймаємо } 1$$

1.4. Уточнюємо коефіцієнт заповнення вибраного ферментера, частка, $K_{зф}$:

$$K_{зф}=V_{ф}/V_{фт} \cdot N_{фт}=184/300 \cdot 1=0,613.$$

Оскільки уточнений коефіцієнт заповнення не перевищує заданих меж (0,5-0,65) приймаємо до установки кількість ферментерів $N_{фт} + 1$ запасний.

2. Розрахунок кількості посівних апаратів.

2.1. Приблизний загальний геометричний об'єм посівного апарата при заданому $K_{па}=0,6$:

$$V_{пг}=V_{па}/K_{па}=18,6/0,6=31 \text{ л}$$

2.2. Вибираємо найближчий за об'ємом ферментер:

$$V_{\text{пт}}=30 \text{ л}$$

2.3. Кількість посівних апаратів при заданому K_3 , од.:

$$N_{\text{пр}}=V_{\text{пт}}/V_{\text{пт}}=31/30=1,033 - \text{приймаємо } 1$$

2.4. Уточнюємо коефіцієнт заповнення вибраних з таблиці ферментерів, частка, $K_{\text{зпа}}$:

$$K_{\text{зпа}}=V_{\text{па}}/V_{\text{пт}} \cdot N_{\text{пт}}=18,6/30 \cdot 1=0,62.$$

Оскільки уточнений коефіцієнт заповнення не перевищує заданих меж (0,5-0,65) приймаємо до установки кількість ферментерів $N_{\text{пт}} + 1$ запасний.

3. Розрахунок кількості качалочних колб.

3.1. Приблизний загальний необхідний об'єм качалочних колб при заданому $K_{\text{кол}}=0,2$:

$$V_{\text{колг}}=V_{\text{кол}}/K_{\text{кол}}=1,717/0,2=8,6 \text{ л}$$

3.2. Об'єм 1 качалочної колби:

$$V_{\text{колг}}=0,750 \text{ л}$$

3.3. Кількість качалочних колб при заданому $K_{\text{кол}}$, од.:

$$N_{\text{кол}}=V_{\text{колг}}/V_{\text{колг}}=8,6/0,75=11,5 - \text{приймаємо } 12.$$

4. Розрахунок кількості реакторів-змішувачів для приготування композицій А, Б для виробничого біосинтезу.

Композиція А стерилізується у реакторі-змішувачі. Стерилізація композиції Б здійснюється безпосередньо у виробничому ферментері.

4.1. Підбираємо геометричний об'єм реактора-змішувача для композиції А. Приблизний загальний геометричний об'єм реактора-змішувача при заданому $K_{36}=0,8$:

$$V_{\text{Аг}}=V_{\text{А}}/K_{36}=40,7/0,8=50,9 \text{ л}$$

4.2 Вибираємо найближчий за об'ємом реактор :

$$V_{\text{рт}}=63 \text{ л}$$

4.3 Кількість реакторів при заданому K_{36} :

$$N_p = V_{A\Gamma} / V_{p\Gamma} = 50,9 / 63 = 0,8, \text{ приймаємо } 1 \text{ од.}$$

4.4 Уточнюємо коефіцієнт заповнення вибраних з таблиці ферментерів, частка, $K_{зр}$:

$$K_{зр} = V_A / V_{p\Gamma} \cdot N_p = 40,7 / 63 \cdot 1 = 0,64$$

Оскільки дане значення $K_{зр}$ не сильно відрізняється від прийнятих меж (0,7-0,85). Приймаємо до установки кількість реакторів для приготування композиції А $N_{p\Gamma} = 1 + 1$ запасний.

5. Розрахунок кількості реакторів-змішувачів для приготування підживлювального розчину.

5.1. Підбираємо геометричний об'єм реактора-змішувача для композиції А. Приблизний загальний геометричний об'єм реактора-змішувача при заданому $K_{зб} = 0,8$:

$$V_{A\Gamma} = V_A / K_{зб} = 12,4 / 0,8 = 15,5 \text{ л}$$

5.2. Вибираємо найближчий за об'ємом реактор:

$$V_{p\Gamma} = 16 \text{ л}$$

5.3. Кількість реакторів при заданому $K_{зб}$:

$$N_p = V_{A\Gamma} / V_{p\Gamma} = 15,5 / 16 = 0,98, \text{ приймаємо } 1 \text{ од.}$$

5.4. Уточнюємо коефіцієнт заповнення вибраних з таблиці ферментерів, частка, $K_{зр}$

$$K_{зр} = V_A / V_{p\Gamma} \cdot N_p = 12,4 / 16 \cdot 1 = 0,775$$

Оскільки дане значення $K_{зр}$ не сильно відрізняється від прийнятих меж (0,7-0,85). Приймаємо до установки кількість реакторів для приготування підживлюваного розчину $N_{p\Gamma} = 1 + 1$ запасний.

5.8. Специфікація обладнання

Специфікація наведеного в апаратурній схемі обладнання представлена у табл. 5.8.

Специфікація обладнання ділянки допоміжних робіт та виробничого біосинтезу міцеліальної маси

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика (виробник)
СМ-1	CIP-мийка	1	CIP-мийка BIORUS габарити довжини*ширина*висота 1900x850x1520 мм, з двома резервуарами об'ємом 100 л, двома фільтрами, двома насосами потужністю 4 кВт, блока керування, датчиками температури та рН Китай [91]
ДЗ-2, ДЗ-15, ДЗ-20, ДЗ-22	Ваговий дозатор	4	Габарити не більше 560*725*750мм, похибка зважування — 0,5%, продуктивність 1,6-8 кг/хв, діапазон номінальних значень 0,4 – 1 кг. Виробник ООО «Асквік Центр» Україна[92]
ПЗ-3	Повітрозабірник	1	Виготовлений із нержавіючої сталі, із полірованою поверхнею, з металевою решіткою для видалення механічних забруднень
Ф-4	Фільтр грубої очистки повітря	1	Рамка із оцинкованого профілю з фільтруючим синтетичним матеріалом. Габарити 490x592x300 мм. Тип фільтрувального матеріалу U35 швидкість протікання 1,5 м/с, перепад початкового тиску 50 Па, різниця кінцевого тиску 250 Па. ФЯК G4. Фірма «АС ФІЛЬТР» Україна [93,94]
К-5	Компресор	1	Компресор EnviroAire T110 фірми Compressors international, габарити 2597x1744x2001 мм, потужність 19,51 л/с, робочий

			тиск 0,8 МПа. Виробник Gardner Denver, США [86]
T-6	Теплообмінник-охолоджувач	1	Осушувач Airpol холодильного типу ОР30, габарити 350x497x450 мм, продуктивність 110 м ³ /год, потужність 0,29 кВт. Виробник Airpol, Польща [87]
РС-7	Ресивер	1	Ресивер повітряний вертикальний РВ 100.370 об'ємом 100 л, робочий тиск 1 МПа, робоча температура - 20 - +100 °С. Виробник ООО ПКП Конгур, Україна [95]
T-8	Теплообмінник нагрівач	1	Теплообмінник VS150 із нержавіючої сталі 316 з товщиною стінки 0,37 мм. Виробник Ventus, Польща [96]
Ф-9	Фільтр тонкої очистки	1	Фільтр тоної очистки CLEARPOINT FWF S050. Габарити висота*ширина – 210*75 мм. Пропускна здатність 65 м ³ /год, тиск 0,7 МПа, ефективність E=95 %. Виробник BEKOTECHNOLOGIES, Німеччина [97]
М-10, М-23	Мірник	2	Об'єм 5 л, виконаний із нержавіючої сталі 316 L. Виробник «Промвіт», Україна [98]
Ф - 12, Ф - 13, Ф – 16, Ф – 19, Ф – 24, Ф - 25	Індивідуальні фільтри	6	Фільтр із фільтрувальним елементом фторопластовою мембраною. Пропускна здатність 14 м ³ /год, ефективність E=99,995 %. Виробник «Технофільтр-Україна» [99]
ЗП-11	Засівний бак	1	Об'єм 5 л, виконаний із нержавіючої сталі 316 L
I-14	Інокулятор	1	Об'єм 30 л. Нержавіюча сталь AISI 304, 316L. Габарити 25*750 мм. Швидкість перемішування

			20–600 об/хв. Виробник ООО «Сартогосм», Росія-Німеччина [79]
P3-17	Реактор- змішувач для приготування та стерилізації композиції А	1	Об'ємом 63 л, виготовлений із нержавіючої сталі 316L. Оснащений сорочкою та пропелерною мішалкою. Виробник «Промвіт», Україна [100]
H-18, H-27	Відцентровий насос	2	DM 06 з продуктивністю 8,3 л/хв, у магнітній муфті Виробник «Debem» Італія [101]
P3-21	Реактор-змішувач	1	Реактор-змішувач об'ємом 15 л, виготовлений із сталі AISI 316L. Здатний працювати під тиском. Оснащений сорочкою, датчиками температури, рівня та мішалкою. В нижній частині розміщено нижній спуск. Виробник «Стройторгсервис», Україна [102]
Фр-26	Ферментер	1	Ферментер Biotechno із нержавіючої сталі 316L об'ємом 300 л. Габарити 500*1500. Оснащений форсункою для СІР-мийки. Автоматична подача повітря у барботер. Оснащений автоматичним витратоміром повітря та автоматичним витратоміром кисню. Швидкість перемішування 30 – 700 об/хв. Виробник «Біотехно» Росія [77]

5.9. Опис технологічної схеми процесу біосинтезу міцеліальної маси *Agaricus bisporus*

Технологічна схема біосинтезу міцеліальної маси *Agaricus bisporus* включає допоміжні роботи (санітарна підготовка виробництва, підготовка і стерилізація

поживних середовищ, а також підготовка повітря,) та технологічний процес (підготовка посівного матеріалу *A. bisporus* та виробничий біосинтез).

Технологічна схема біосинтезу міцеліальної маси *A. bisporus* наведена у графічній частині проекту.

ДР 1. Санітарна підготовка виробництва

ДР 1.1. Підготовка персоналу

Під час роботи проводиться перевірка знань персоналом посадових інструкцій. На виробництві міцеліальної маси *A. bisporus* персонал забезпечений спеціальним одягом.

ДР 1.2. Підготовка мийних та дезінфікувальних засобів

ДР 1.2.1. Підготовка 2 % розчину каустичної соди

У підготовлений реактор СІР-мийки (СМ-1), через об'ємно-ваговий дозатор ДЗ-2 подається 1,57 кг каустичної соди (NaOH). З метою розчинення та утворення розчину концентрацією 2 %, додається 77,3 л питної води. Мішалка здійснює перемішування до моменту повного розчинення солі. Для використання діного рзчину у якості миючого, його попередньо нагрівають глухою парою до 40 °С. Виготовлений 2% розчин використовується для миття І-14, РЗ-17, Фр-26.

ДР 1.2.2. Підготовка 2 % розчину азотної кислоти

Слабкий (2%) розчин кислоти, як правило, готується із більш концентрованої (37%) кислоти. Згідно пропорцій 4,25 л 37% кислоти витрачається на приготування 78,6 л 2%. Приймаючи до уваги малий об'єм 37% розчину використовувати об'ємно-ваговий дозатор не доцільно. У підготовлений реактор СІР-мийки (СМ-1) за участі циліндра на 2 л потрапляє 4,25 л 37% азотної кислоти (HNO₃), для доведення даного розчину до заданої концентрації у реатор за участі ротаметра подається 74,35 л питної води, за участі мішалки відбувається стабілізація кислоти. Виготовлений розчин використовується для миття І-14, РЗ-17 , Фр-26.

ДР 1.2.3. Приготування дезінфікуючого розчину Бланідас 300

Оскільки для приготування 10 л 0,06% робочого розчину необхідно використати 4 таблетки, то для приготування 189,2 л такого ж розчину необхідно 76 таблеток. Зважаючи на той факт, що даний розчин використовується для зовнішнього миття, його приготування у реакторі не є економічно доцільним. Тому миючий готують у пластиковій тарі об'ємом 5 л з використанням 1,2 таблетки та 3 л води, що відповідає концентрації миючого розчину 0,06% за хлором. Виготовленого розчину достатньо для миття 30 м² приміщення, після чого готують новий розчин. Приготований розчин зберігається 6 днів.

ДР 1.3. Підготовка виробничих приміщень

ДР 1.3.1. Щоденне прибирання виробничих приміщень

Зважаючи на тривалість виробничого біосинтезу (4 дні) та незначні забруднення щоденне прибирання доцільно реалізувати за участі води лише для підлоги.

ДР 1.3.2. Генеральне прибирання виробничих приміщень

Генеральне прибирання виробництва відбувається 1 раз на тиждень. Оскільки кількість трудоднів становить 81, то за період виробництва проводиться 12 генеральних прибирання. Генеральне прибирання робочих зон включає миття стін, вікон та дверей 0,06% розчином Бланідас 300.

ДР 1.4. Підготовка технологічного обладнання

ДР 1.4.1. Миття обладнання

CIP-мийка застосовується для миття ємнісного обладнання: інокулятора, реактора-змішувача й виробничого ферментер. Спершу у апарат відбувається подача холодної води з метою видалення залишків речовин. Після ополіскування проводиться подача 2% розчину каустичної соди за температури 40 °C та подальше миття, тривалість процесу – 20 хв. Після завершення миття сода рециркулює у CIP-мийку при попередньому фільтруванні. 2% розчин азотної кислоти подається в апарат із метою нейтралізації у процесі миття, тривалість – 30 хв. Кислота також рециркулює у CIP-мийку. Повторюється перша операція.

ДР 1.4.2. Стадія технічного огляду

На даному етапі із метою виявлення неущільнень й руйнувань у комунікаціях, а також у запірній арматурі на обладнанні. За умови виявлення наведених вище відхилень відбувається підтягування різьбових з'єднань, заміна прокладок та ін.

ДР 1.4.3. Перевірка обладнання на герметичність

Щоб встановити герметичність обладнання проводиться закриття запірної арматури із подільшою подачею аераційного повітря до устанавлення надлишкового тиску $P = 0,1 - 0,2$ МПа. За досягнення потрібного надлишкового тиску припиняється подача повітря, відбувається фіксація показів манометру й часу витримки, тобто 30–60 хв, в операційному журналі. За різниці перепаду тиску не більше ніж на 0,01 МПа приймається рішення про герметичність апарату.

ДР 1.4.4. Стерилізація обладнання

Для того щоб уникнути резонансу температур у ферментері та сорочці у апарат подають глуху пару до устанавлення температури на рівні 80–90 °С. Разом із ферментером відбувається і стерилізація запірої арматури та комунікацій, які контактують із ферментером. У ферментер гостра пара подається крізь барботер або нижній спуск. Важливим моментом при цьому є вихід відпрацьованого повітря через вентиль для видалення повітря з апарату. За умови устанавлення температури стерилізації $t_{\text{ст}} = 130\text{--}135$ °С проводиться закриття арматури, фіксується початок стерилізації та витримування на протязі заданого часу стерилізації (1 год).

ДР 1.4.5. Охолодження обладнання

По закінченні стерилізації у сорочку апарата проводиться подача холодної води. Задля уникнення утворення вакууму при падінні тиску у виробничий апарат реалізується подача стерильного повітря. Обладнання вважається охолодженим за температури 30–40 °С, надлишкового тиску $P = 0,003\text{--}0,005$ Мпа. Зважаючи на поступовість охолодження його тривалість 1 год.

ДР 2. Підготовка аераційного повітря

ДР 2.1. Забір атмосферного повітря

Заради відбору найменш забрудненого повітря забір реалізується за участі вертикальної труби з повітрязабірником ПЗ-3. Оптимальна висота забору повітря – $H \sim 3$ м від даху виробничої будівлі.

ДР 2.2. Очищення повітря від металічних домішок

Наступним етапом очищення повітря є його потрапляння у фільтр грубої очистки Ф-4 через вертикальне сопло, далі за рахунок спеціального рельєфу всередині корпусу створені зони розрядження, де затримуються частинки пилу. В результаті частинки осідають на дно бункера, а очищене повітря потрапляє на подальше очищення. Ефективність процесу 80 %.

ДР 2.3. Стиснення повітря

Названий процес відбувається у компресорі К-5. Повітря потрапляє у компресор шляхом проходження через впускний клапан. При подальшому переміщенні поршня проводиться стиснення повітря та одночасно перекриття впускного клапану й витіснення стисненого повітря через випускний клапан. При стисненні будь-якої речовини спостерігається зменшення її об'єму. При стисненні повітря нагрівається до $120 - 150^{\circ}\text{C}$. Під час зворотного руху поршня через різницю тисків випускний клапан закривається, а впускний відкривається і заповнює поршневу порожнину повітрям. Потім відбувається повторення циклу [103]

ДР 2.4. Охолодження стиснутого повітря

Теплообмінник Т-6 охолоджує гаряче повітря з метою конденсації зайвої вологи до температури, яка не більша за $+10^{\circ}\text{C}$ від температури навколишнього середовища. У результаті названого етапу повітря охолоджується до 25°C з вологістю 21 %.

ДР 2.5. Видалення сконденсованої вологи

При переміщенні потоку повітря через ресивер РС-7, відбувається відокремлення від нього часточок масла та сконденсованої вологи. Конденсат та масло потрапляють у нижню частину апарату та виливаються у каналізацію. Повітря потрапляє на стадію стабілізації.

ДР 2.6. Стабілізація повітря

Для рівномірних показників вмісту газів стиснене аераційне повітря стабілізується шляхом підігрівання до 45–50 °С за участі глухої пари у теплообміннику Т-8.

ДР 2.7. Очищення повітря у головному фільтрі

Стабілізоване повітря проходить через головний фільтр Ф-9, у якому відбувається відділення завислих часток, до отримання повітря із ступенем очищення $E=95\%$.

ДР 2.8. Очищення повітря у індивідуальних фільтрах

Очищене повітря через трубопроводи подається безпосередньо до індивідуальних фільтрів (Ф-12, Ф-13 Ф – 16, Ф – 19, Ф - 24, Ф-25), які безпосередньо встановлені на ферментері та інокуляторі, для стерилізації аераційного повітря. Кінцевий ступень очищення E 99,9999%. Індивідуальні фільтри стерилізують гострою парою під час здійснення стерилізації обладнання.

ДР 3. Приготування та стерилізація піногасника

ДР 3.1. Приготування та стерилізація піногасника для інокулятора

Зважаючи на те, що фінокулятор оснащено механічним піногасником для піногасіння використовується 0,1 % хімічного піногасника по відношенню до об'єму поживного середовища. Згідно пропорції кількість поживного середовища становить 16,9 л, відповідно кількість піногасника становить 0,017 л.

Зважаючи на малий об'єм (17 мл) оливкової олії, вимірювання робиться за участі мірного циліндру. Необхідну кількість переносять у колбу об'ємом 50 мл, яка закривається ватною пробкою. Стерилізацію оливкової олії проводять за участі автоклава (режим стерилізації: 112 °С протягом 30 хвилин). Підготовлений піногасник подається за показами датчику піни у інокулятор І-14.

ДР 3.1. Приготування та стерилізація піногасника для виробничого ферментера

Відповідно до пропорції 1 мл оливкової олії витрачається на 1 л середовища, згідно розрахунку на кількість поживного середовища 167,3 л кількість піногасника становить 167 мл.

167 мл оливкової олії відбирають мірним циліндром, розраховану кількість оливкової олії переносять у колбу об'ємом 500 мл, яку далі закривають ватною пробкою та проводять стерилізацію у автоклаві (112 °С, 30 хвилин). Простерилізована оливкова олія подається за датчиком піни у ферментер Фр-26.

ДР 4. Підготовка титрувальних розчинів

Оскільки сумарна кількість титрувальних розчинів є досить малою, доцільніше готувати титрувальні розчини разом для усіх стадій.

ДР 4.1. Підготовка 6 % розчину фосфорної кислоти

Через легкість кислоти 6% розчин готується під витяжною шафою біля полям'я пальник задля забезпечення асептичних вимог. 171 мл стерильної дистильованої води за допомогою стерильного циліндра переноситься у круглу колбу V=500 мл, аналогічним способом при постійному перемішуванні додається 33 мл 37 % фосфорної кислоти. Колбу із приготованим розчином закривають скляною притертою пробкою.

ДР 4.2. Підготовка 6 % розчину гідроксиду натрію

14 г гідроксиду натрію зважують на технічних вагах, отриману наважку перемішують у колбу об'ємом 500 мл та додають 190 мл дистильованої води, здійснюється перемішування до розчинення солі. Колба із підготовленим розчином закривається ватно-марлевою пробкою і стерилізується в автоклаві (131 °С упродовж 40 хв).

ДР 5. Приготування та стерилізація поживних середовищ

ДР 5.1. Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в колбах на качалках

Для вирощування інокуляту на першій стадії необхідно приготувати 1700 мл поживного середовища. Джерелом вуглецю у середовищі є екстракт цукрової

тростини, джерелом азоту – натрію нітрит. Вміст компонентів для приготування 1700 мл середовища наведено в табл. 5.9.1. 34 г картопляно-декстрозного середовища, 17 г дріжджового екстракту, 9 г солодового екстракту і 9 г соєвого пептону зважують на технічних вагах. Підготовлені наважки поміщають у конічну колбу об'ємом 3 л та при перемішуванні додають 1661 мл дистильованої води. Задля зручності вирощування посівного матеріалу підготовлене нестерильне поживне середовище рівномірно розливають у 12 термостійких колб об'ємом 750 мл. Закриті ватно-марлевими пробками колби стерилізуються у автоклаві (112 °С, 30 хв).

Таблиця 5.9.1

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 1700 мл середовища

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента у 1700 мл середовища, г
Картопляно-декстрозне середовище	20	34
Дріжджовий екстракт	10	17
Солодовий екстракт	5	9
Соєвий пептон	5	9

ДР 5.2. Приготування і стерилізація поживного середовища для одержання посівного матеріалу в ферментері об'ємом 30 л

На даному етапі технологічного процесу необхідно отримати 18,6 л інокуляту. Для визначення кількості води необхідно врахувати кількість посівного матеріалу (1,7 л) та конденсату (1,8). Для приготування заданого середовища загальна

кількість води становить 15,1 л. У табл. 5.9.2 наведено витрати компонентів на виготовлення 18,6 л середовища.

Таблиця 5.9.2

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 18,6 л середовища

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента у 18,6 л середовища, г
Картопляно- декстрозне середовище	20	372
Дріжджовий екстракт	10	186
Солодовий екстракт	5	93
Соєвий пептон	5	93

На технічних вагах зважують картопляно-декстрозного середовища 372 г, дріжджового екстракту 186 г, по 93 г солодового екстракту та соєвого пептону. Розчинення наважок для зручності переносять у колбу об'ємом 2 л і при перемішуванні додають 1 л води для їх розчинення. Підготовлений розчин через конектор подається у інокулятор I-15 разом із рештою води (11,7 л) згідно із ротаметром. У інокуляторі проводиться стерилізація середовища (112 °С, 30 хв).

ДР 5.3. Приготування і стерилізація поживного середовища для виробничого біосинтезу в ферментері об'ємом 300 л (0,3 м³)

У виробничому ферментері міститься 184 л культуральної рідини. Для встановлення загальної кількості води для створення поживного середовища доцільно врахувати кількість посівного матеріалу (16,7 л), а також внесення підживлювального розчину (12,4 л) на 2 добу культивування. Загальна кількість води – 154,9 л. Вміст компонентів для приготування 184 л середовища наведено в табл. 5.9.3.

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 184 л середовища

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента у 184 л середовища, кг	Композиція	Об'єм композиції, л
Екстракт цукрової тростини	20	3,7	А	41,1
Дріжджовий екстракт	5	0,9		
Нітрат натрію	10	1,8	Б	113,8

ДР 5.3.1. Приготування і стерилізація композиції А

3,7 кг екстракту цукрової тростини і 0,9 кг дріжджового екстракту через ваговий дозатор ДЗ-15 потрапляють у збірник (Р-17) об'ємом 63 л. До компонентів додаються 25,5 л питної води та відбувається перемішування із подальшою стерилізацією композиції. Під час стерилізації кількість конденсату становить 11 л. Режим стерилізації - 112 °С упродовж 30 хв. Здійснення стерилізації відбувається шляхом подачі гострої пари через нижній спуск збірника та одночасною подачею глухої пари у сорочку збірника.

ДР 5.3.2. Приготування і стерилізація композиції Б

1,8 кг нітрату натрію через ваговий дозатор ДЗ-22 подається у мірник об'ємом 5 л М-23 разом з 3 л води з трубопроводу згідно ротаметру, зважаючи на гарне розчинення нітриту натрію у воді перемішування не здійснюється. Концентрований розчин разом із 104,6 л питної води через ротаметр з трубопроводу подаються у простерилізований металевий ферментер в якому безпосередньо відбувається стерилізація. Під час стерилізації кількість конденсату становить 4,4 л. Параметри

стерилізації: $t=131^{\circ}\text{C}$, $\tau=40$ хв. Стерилізація відбувається шляхом подачі гострої пари, яка подається через барботер, а також глухої пари у сорочку.

ДР 5.4. Підготовка підживлювального розчину для виробничого біосинтезу

3,66 кг екстракту цукрової тростини через ваговий дозатор ДЗ-20 подається у реактор РЗ – 21 об'ємом 15 л, одночасно здійснюється подача і 8 л води, для пришвидшення розчинення проводиться перемішування з наступною стерилізацією. Режим стерилізації – температура 112°C , тривалість 30 хв. Простерилізований розчин подається у виробничий ферментер Ф - 26 на 2 добу культивування, коли концентрація джерела Карбону стає меншою 5 г/л.

ТП 6. Підготовка посівного матеріалу.

ТП 6.1. Підтримання колекційної культури

A. bisporus у якості колекційної культури зберігають за температури 4°C протягом 3-4 місяців у пробірках зі скошеним картопляно-дестрозним агаром. Всі роботи із колекційною культурою *A. bisporus* проводяться лише у асептичних умовах.

ТП 6.2. Одержання робочої культури на агаризованих середовищах

Колекційну культуру *A. bisporus*, із пробірок з картопляно-дестрозним агаром, у вигляді агарових блоків розсівають на чашки Петрі з картопляно-дестрозним агаром та інкубують за наступних умов: температура 25°C , тривалість 4 доби.

ТП 6.3. Вирощування культури в колбах на качалках

Для вирощування посівного матеріалу *A. bisporus* у колбах об'ємом 750 мл із 121 мл поживного середовища, необхідно встановити показник рН у межах 6-6,5 додаванням 1,7 мл 6 % розчину фосфорної кислоти (від ДР 4.1) та за необхідності регулювання рН у межах 6-6,5 внесенням стерильного 6 % розчину гідроксиду натрію (від ДР 4.2). Підготовлені стерильні розчини у колби вносяться лише у асептичних умовах.

На чашці Петрі свердлом вирізають диски міцелію *A. bisporus* діаметром 5 мм і в асептичних умовах вносять в дванадцять стерильних качалочних колб.

Інокуляцію колб здійснюють з розрахунку 5 дисків на 50 мл поживного середовища. Мікробіологічний аналіз здійснюють після завершення культивування.

Після вирощування грибів *A. bisporus* у колбах на качалці (200 об/хв) упродовж 3 діб, отриману культуральну рідину з міцелієм із 12 колб після перемішування в асептичних умовах переносять у стерильну засівну колбу об'ємом 5 л.

ТП.6.4. Вирощування культури в інокуляторі об'ємом 30 л

У ферментері I-15 з простерилізованим поживним середовищем (від ДР 5.2) перед внесенням посівного матеріалу автоматично встановлюють рН у межах 6-6,5 додаванням 6% розчину фосфорної кислоти (від ДР 4.1), а також 6 % розчину гідроксиду натрію (від ДР 4.2) за показами датчиком рН. Наступним етапом є внесення посівного матеріалу *A. bisporus* (через засівну колбу від ТП 6.3). Датчик піни регулює процес піноутворення, яке мінімізується за рахунок наявності механічного піногасника, крім того, за необхідності відбувається піногасіння оливковою олією (від ДР 3.1). Асептичність під'єднання ємностей зі стерильними розчинами до ферментера забезпечується фламбуванням. Кожні 8 годин відбувається пробовідбір із ферментера, для відібраних проб здійснюється мікробіологічний аналіз, визначення концентрації біомаси та встановлення концентрації джерел вуглецевого та азотного живлення.

Після вирощування грибів *A. bisporus* у інокуляторі I-15 при режимі перемішування 150 об/хв, аерації 0,25 л повітря/л*год упродовж 3 діб при температурі 25 °С та рН 6-6,5 культуральну рідину з міцелієм *A. bisporus* у асептичних умовах перекачують за допомогою труби перетискання в виробничий ферментер Фр – 26 об'ємом 300 л.

ТП 7. Біосинтез

ТП 7.1. Виробниче культивування у ферментері об'ємом 300 л

Виробниче культивування *A. bisporus* здійснюється у ферментері Фр – 26 із робочим об'ємом 300 л. У ферментер із простерилізованою композицією Б (від ДР

5.3.2) в асептичних умовах за допомогою стерильного відцентрового насосу Н-18 відбувається перекачування 41,1 л композиції А (від ДР 5.3.1). За показами датчика автоматично відбувається регулювання рН у межах 6-6,5 додаванням 6% розчину фосфорної кислоти (від ДР 4.1) та 6% розчину гідроксиду натрію (від ДР 4.2). Наступним етапом є внесення посівного матеріалу *A. bisporus* через трубу перетискання (від ТП 6.4). За показами датчику піни здійснюється регулювання вмісту піни, за необхідності відбувається піногасіння за допомогою механічного піногасника та оливковою олією (ДР 3.1). Асептичність під'єднання ємностей зі стерильними розчинами до ферментера забезпечується фламбуванням. Тривалість культивування *A. bisporus* становить 4 доби при наступних умовах: температура 25 °С, рН 6-6,5, режим перемішування 150 об/хв, аерація 0,25 л повітря/ л *год.

Кожні 8 годин здійснюється пробовідбір. Для відібраних проб проводиться мікробіологічний аналіз, визначення концентрації біомаси та джерел вуглецевого та азотного живлення.

Виробничий біосинтез закінчується на 4 добу по досягненні культурою *A. bisporus* експоненційної фази росту, концентрація біомаси на кінець культивування становить 15 г/л, при утворенні меншої кількості біомаси культивування припиняється за умови, що весь вуглецевмісний субстрат буде спожитий.

ЗВ 8. Знешкодження відходів

ЗВ 8.1. Знешкодження газоподібних відходів

До газових викидів виробництва одержання міцеліальної маси *A. bisporus* належать лише викиди відпрацьованого повітря. Повітря, яке використовується для перевірки герметичності обладнання, не містить шкідливих речовин. Загальні обсяги викидів становлять 441 л за один виробничий цикл, оскільки за рік на виробництві здійснюється 12 циклів річні обсяги газових викидів становлять 5292 л. Оскільки таке повітря має низький рівень забруднення, встановлювати дорогі способи очищення недоцільно. Для очищення відпрацьованих газових викидів

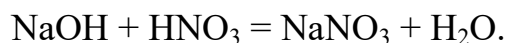
даного виробництва використовуються індивідуальні фільтри, в яких повітря очищується до ступеню очищення 99,999 % і після може повторно використовуватися. Але, зважаючи на можливість потрапляння спор даного організму, при очищенні повітря із виробничого ферментера та інокулятора необхідно стежити за швидкістю фільтрування, щоб уникнути забивання фільтра. Варто зазначити, що потрапляння даного організму у навколишнє середовище не є небезпечним, оскільки дана культура є досить вразлива до різних шкідників. Після фільтрування такий фільтр необхідно простерилізувати для знищення не термостійких спор даного базидіоміцета.

ЗВ 8.2. Зешкодження рідких відходів

На даному виробництві можна виділити різні групи рідких відходів: відпрацьована вода, відпрацьований розчин каустичної соди, відпрацьований розчин азотної кислоти, відпрацьований розчин Бланіда 300 та відфільтрована культуральна рідина.

Кількість відходів за один виробничий цикл становить 549 л, відповідно за рік роботи виробництва кількість рідких відходів виробництва складе 5174 л, тому для їх знешкодження необхідно звертати значну увагу.

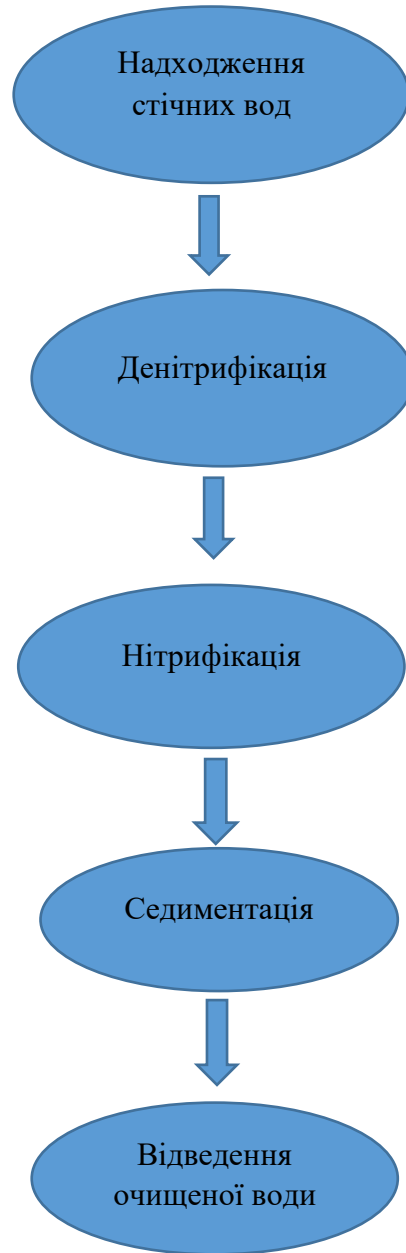
Розчини каустичної соди та азотної кислоти використовуються для миття ємнісного обладнання за участю СІР-мийки. Такі розчини певний час відновлюються за допомогою фільтрів від залишків забруднень і використовуються повторно. Після закінчення виробництва розчин каустичної соди нейтралізується розчином азотної кислоти:



Отримані стічні води з нітритом натрію змішуються з відпрацьованими водами. Відпрацьована вода має низький рівень забруднення, оскільки використовується для миття. У ній може міститися багато органічних забруднень. До них додається відпрацьований розчин Бланіда 300. У стічні води також

потрапляє відфільтрована та сильно розбавлена культуральна рідина. Такі стічні води відносяться до 3 класу небезпеки.

Очищення стічних вод даного виробництва відбувається за участі SBR-реактора. Процес очищення відбувається так:



Даний спосіб очищення є простим у реалізації, ефективним, не потребує багато місця для встановлення очисного обладнання, автоматичним, очищує воду до високої якості, що робить можливим її подальше використання на виробництві і зменшує річну кількість стічних вод підприємства [105].

ЗВ 8.3. Знешкодження твердих відходів

Твердими відходами виробництва міцеліальної маси печериць є пластикова тара та поліетилен, які довго розкладаються у навколишньому середовищі. За рік виробництва утворюється 36 кг твердих відходів. Такі відходи можна розкласти за допомогою бактерій *Ideonella sakaiensis*, які були відкриті китайськими вченими. Але даний спосіб ще не достатньо вивчений і не має промислових штамів даного мікроорганізму, які можна було б придбати. Тому найбільш доцільним є спосіб збирання пластикового та поліетиленового сміття, його сортування та відправлення на сміттєперероблюючі заводи, оскільки їх можна використовувати повторно. Даний спосіб знешкодження відходів є досить дешевий і навіть може приносити певні кошти [106, 107].

5.10. Контроль виробництва міцеліальної маси *Agaricus bisporus*

При культивуванні *A. bisporus* кожні 8 годин відбувається пробовідбір. Отримані проби застосовуються для проведення мікробіологічного контролю, визначення концентрації біомаси *A. bisporus*, а також визначення вмісту джерела вуглецю, яким виступає екстракт цукрової тростини, і азоту – нітриту натрію.

Мікробіологічний контроль здійснюється розсівом на чашки Петрі з агаризованими середовищами і мікроскопуванням.

Отриману пробу розсівають стерильною петлею на чашки Петрі до ізольованих колоній. Використовуються наступні види поживних середовищ: м'ясо-пептонний агар (МПА) із метою виявлення бактерій та сусло-агар (СА) – дріжджів і сторонніх грибів. Крім того, пробу культуральної рідини перевіряють на наявність продуцента. З цією метою зразок проби вносять на чашки з картопляно-декстрозним агаризованим середовищем для перевірки морфолого-культуральних ознак продуцента *A. bisporus*. Колонія *A. bisporus* росте суцільним газоном білого кольору з добре розвинутим повітряним міцелієм (рис. 5.10.1). Тривалість інкубування чашок – 5 діб при температурі 25-27 °С.

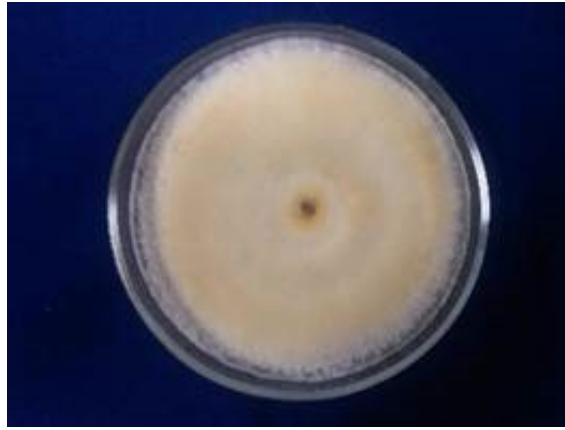


Рис. 5.10.1. Культура *A. bisporus* на чашці Петрі

Для мікроскопування повітряного міцелію *A. bisporus* використовують препарат «роздавлена крапля», який готують на знежиреному предметному склі нанесенням краплі культуральної рідини, накривають накривним скельцем і з подальшим сікроскопуванням з використання об'єктиву 40х. При мікроскопії виявляються спори яйцеподібні гладкі, 4-7,5 x 4-5,5 мкм.

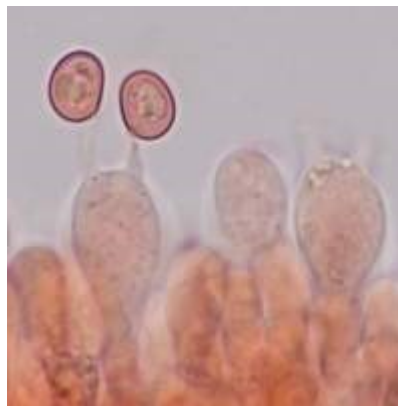


Рис. 6.2. Мікроскопія спор *A. bisporus* [104].

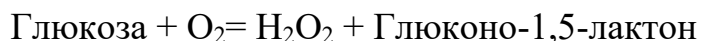
Концентрація біомаси. Біомасу *A. bisporus* визначають ваговим методом. Для визначення вмісту біомаси культуральну рідину об'ємом 100 мл центрифугували на протязі 10 хвилин. Отриманий осад клітин двічі промивають від залишків поживного середовища і переносили у бюкси. Бюкси з біомасою висушуються в сушильній шафі при температурі 100 °С до постійної маси міцелію.

Концентрація джерел карбону. Оскільки за вмістом Карбону у поживному середовищі регулюється внесення підживлювального розчину, для його визначення необхідно використовувати експрес-метод. Для визначення вмісту глюкози, яка

утворюються при біосинтезі екстракту цукрової тростини, у культуральній рідині запропоновано використовувати біохімічний аналізатор 2950D, в якому використовуються іммобілізовані ферментні електроди YSI, що дозволяє отримати результат протягом 60 с. YSI іммобілізує субстрат-специфічні ферменти між двома селективними, інтерферуючими мембранами і з'єднують мембранний компонент з платиновим електродом, що призводить до високоспецифічного вимірювання.

Відібрана у кількості 100 мл проба із ферментера переміщується та проводиться фільтрування через паперовий фільтр для відокремлення біомаси. Із приготовленого фільтрату по 5 мл зразка фільтрують у окремі пробірки через закріплений фільтр із діаметром пор 0,22 мкм. Отриманий у пробірках фільтрат розводять до концентрації глюкози 0 – 9 г/л за допомогою буферного розчину та дистильованої води. Готові зразки розміщують у аналізаторі і записують отриманий результат.

Ферментний зонд, який є основним елементом, оснащений тришаровою мембраною, на якій міститься іммобілізований фермент глюкозооксидази в середньому шарі. Лицьова частина зонда, розташована в буферному зразковому модулі, куди інструментом вводиться проба. Глюкоза із проби дифундує через першу мембрану. При контакті з іммобілізованою глюкозооксидазою вона швидко окислюється, утворюючи перекис водню (H_2O_2).



H_2O_2 , у свою чергу, проходить через внутрішню мембрану, і у результаті окислюється на платиновому аноді, при цьому утворюються електрони. Динамічна рівновага досягається за умови, що швидкість вироблення H_2O_2 разом із швидкістю, з якою перекис водню залишає іммобілізований ферментний шар, є постійними і позначаються стійкою реакцією. Потік електронів лінійно пропорційний стаціонарній концентрації H_2O_2 і, відповідно, концентрації субстрату. Все це відбувається за лічені секунди, в результаті чого цикл аналізу підготовленої проби становить 60 с [57, 108,109].

Нітроний метод визначення неорганічного азоту. Метод «нітронів» заснований на утворенні нерозчинної сполуки взаємодією нітрону (дифеніл-ендо-аніло-гідро-триазолу) та азотної кислоти (HNO_3). Хоча даний метод є досить тривалим, оскільки потреби у експрес визначенні вмісту нітрату немає, адже він присутній у надлишку, даний метод може використовуватися. Перевагою даного методу є те що на результат не буде впливати наявність екстракту цукрової тростини у культуральній рідині.

Реагенти: Нітрон. Розчиняють 10 гр. нітрону в 100 мл. 5% (мас. / об.) розчину оцтової кислоти; зберігають реагент; сплав Деварди; реагент Несслера; безазотна вода.

Техніка аналізу. Першим етапом є перенесення 10-мл. відфільтрованої через паперовий фільтр культуральної рідини у пробірку та додавання 1-5 мл. конц. сірчаної кислоти по краплях при постійному струшуванні. Отриману суміш нагрівають до 70°C за допомогою водяної бані і додають 1,5 мл. нітроного реагенту. Охолоджують і відкладають на декілька годин, у більшості випадків переважним є залишення зразка на ніч, щоб дозволити кристалізації нітратного нітрату завершитися, але зважаючи на необхідну швидкість можливим є витримання підготовленого зразку протягом 4-6 год при періодичному струшуванні. Отриманий розчин проціджується через крижану паличку для збору осаду і промивається двома 3 мл. води. Отриманий осад розводиться приблизно в 15 або 30 мл. гарячої води шляхом проціджування води через фільтрувальну паличку в напрямку, протилежному тому, який використовується для фільтрації. Після розведення розчин охолоджується та переноситься у колбу об'ємом 100 мл, розводиться 15 мл натрію гідроксиду і проводиться кип'ятіння протягом кількох хвилин, для видалення вільного аміаку. Розчин охолоджується і до нього додається близько 0,1 г. сплаву Деварди і необхідним є швидке приєднання колби до ректифікаційного апарату, оснащеного ресивером, який містить кілька мілілітрів розведеної соляної кислоти, достатньої для покриття кінчика трубки для доставки. Колбу обережно

нагрівають протягом 10 хв, додається 2,5 мл. реагенту Несслера і відрегульовується загальний об'єм до 25 мл. Вимірюється оптична щільність при використанні водного зразка. Із цією метою використовується фотоелектроколориметр із піком максимального пропускання 470 мп [110].

Для кращого розуміння показників контролю під час виробництва міцеліальної маси *A. bisporus* наведено таблицю 5.10.1.

Карта постадійного контролю біосинтезу міцеліальної маси *Agaricus bisporus*

Номер контрольної точки та назва стадії	Об'єкт контролю та показник, що визначається	Засоби та методи контролю	Періодичність перевірки та відбору проб	Нормативні значення показника
Кт, Кх 1.2.1 Приготування 2 % розчину каустичної соди	Концентрація розчину, температура	Термометр технічний, хімічний метод	Після приготування розчину	C=2%, t= 75 °C
Кт, Кх 1.2.2 Приготування 2 % розчину азотної кислоти	Концентрація розчину, температура	Термометр технічний, хімічний метод	Після приготування розчину	C=2%, t= 20 °C
Кт, Кх 1.2.1 Приготування 0,06 % розчину Бланідас 300	Концентрація розчину	Хімічний метод	Після приготування розчину	C= 0,06 %
Кт, 1.3.1, 1.3.2 Підготовка виробничих приміщень	Підлога, стіни, обладнання, чистота	Візуальний огляд	Після прибирання	Чисте приміщення, відсутність пилу та бруду
Кт 1.4.1 Миття обладнання	Мийний розчин, температура мийного розчину, чистота обладнання	Термометр технічний, годинник	Під час проведення операції	t= 75 і 20 °C, τ= 20 і 30 хв
Кт 1.4.3 Перевірка на герметичність	Герметичність роботи обладнання, час роботи, тиск	Монометр технічний, годинник	Тиск визначається безперервно під час перевірки на герметичність	P=0,1-0,2 МПа, τ= 0,5-1 год

Кт 1.4.4 Стерилізація обладнання	Обладнання, температура, тиск, час стерилізації	Монометр технічний, термометр технічний, годинник	Тиск визначається безперервно під час стерилізації	P=0,15 МПа, t= 130-135 °С, τ= 1 год
Кт 1.4.5 Охолодження обладнання	Обладнання, температура, тиск, час	Монометр технічний, термометр технічний, годинник	Тиск визначається безперервно під час охолодження	P=0,15 МПа, t= 130-135 °С, τ= 1 год
Кт 2.2 Грубе очищення повітря	Повітря на виході з фільтра, ступінь очищення, перепад тисків	Манометр, перевірка ступеня очищення згідно паспорту обладнання	Після очищення повітря у фільтрі грубої очистки	E=80%
Кт 2.3 Компресування повітря	Стиснене повітря, температура, тиск	Манометр технічний, термометр	Після компресування повітря	t= 120-150 °С
Кт 2.4 Охолодження повітря	Охолоджене повітря, температура,	Термометр технічний	Після охолодження повітря	t= 25 °С, W=21 %
Кт 2.5 Видалення зайвої вологи	Повітря після видалення зайвої вологи	Психрометричний метод	Після видалення зайвої вологи	W=50 %
Кт 2.6 Нагрівання повітря	Нагріте повітря, температура,	Термометр технічний	Після нагрівання повітря	t= 45-50 °С, W=21 %
Кт 2.7 Тонке очищення повітря	Повітря на виході з фільтра, ступінь очищення, перепад тисків	Манометр, перевірка ступеня очищення згідно паспорту обладнання	Після очищення повітря у фільтрі тонкої очистки	E=95%
Кт 2.8 Очищення повітря у індивідуальному у фільтрі	Повітря на виході з фільтра, ступінь очищення, перепад тисків	Манометр, перевірка ступеня очищення згідно паспорту обладнання	Після очищення повітря у фільтрі індивідуальної очистки	E=99,9999%
Км, Кт 3.1, 3.2 Приготування піногасника	Піногасник, температура, час, відсутність мікробіоти	Термометр, годинник, мікробіологічний контроль	мікробіологічний контроль після приготування	t= 112 °С, τ= 30 хв, відсутність мікробіоти

Км, Кх 4.1 <i>Приготування фосфорної кислоти</i>	Розчин фосфорної кислоти, концентрація, відсутність мікробіоти	мікробіологічний контроль	мікробіологічний контроль після приготування	С=6 %, відсутність мікробіоти
Кт, Кх, Км 4.2 <i>Приготування і стерилізація гідроксиду натрію</i>	Розчин гідроксиду натрію Температура, час, концентрація, відсутність мікробіоти	Термометр, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t= 131 °С, τ= 60 хв, С =6 %, відсутність мікробіоти
Кт, Км 5.1, 5.2 Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту	Поживне середовище, температура, час, стерильність	Манометр, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t= 112 °С, τ= 30 хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 5.3.1 Приготування та стерилізація композиції А	Композиція А, температура, час, стерильність	Манометр, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t= 112 °С, τ= 30 хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 5.3.2 Приготування та стерилізація композиції Б	Композиція Б, температура, час, стерильність	Манометр, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t= 131 °С, τ= 60 хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км 5.3.3 Приготування та стерилізація підживлювальн ого розчину	Підживлювальний розчин, температура, час, стерильність	Манометр, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t= 112 °С, τ= 30 хв, відсутність мікробіоти

Кт, Км 6.1 <i>Підтримання колекційної культури</i>	Колекційна культура <i>A. bisporus</i> , морфологічна однорідність, температура, відсутність сторонньої мікробіоти	Термометр, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час вирощування, мікро біологічний контроль під час пересівів раз на 3 місяці	t= 4 °C, однорідний газон білого кольору, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км 6.2 <i>Одержання робочої культури на агаризованому середовищі</i>	Культура <i>A. bisporus</i> відсутність сторонньої мікробіоти, відсутність неконтрольованих мутацій	Термометр, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час вирощування, мікробіологічний контроль проводять кожні 8 годин	t= 25 °C, τ= 4 ді, колонії білого кольору з добре вираженим повітряним міцелієм, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км 6.3 <i>Одержання робочої культури в колбах на качалках</i>	Посівний матеріал, тривалість вирощування, температура, частота обертів качалки, мікробіологічна чистота культури	Годинник, термометр технічний, датчик рН, технічний тахометр, мікробіологічний контроль	Температура і швидкість обертання контролюються і підтримуються автоматично весь час вирощування, мікроскопіювання після культивування.	t= 25 °C, τ= 3 діб, рН = 6-6,5, ω = 200 об/хв, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км 6.4 <i>Вирощування культури в інокуляторі об'ємом 30 л</i>	Посівний матеріал, тривалість вирощування, температура, частота обертів мішалки, рН, концентрація розчиненого кисню, мікробіологічна чистота культури, концентрація біомаси, глюкози та мінерального азоту	Годинник, термометр технічний, технічний тахометр, датчик піни, датчик повітря, мікроскоп, ваговий метод, ортотолуїдиновий метод, «нітронний» метод	Температура і швидкість обертання контролюються і підтримуються автоматично весь час вирощування, мікроскопіювання, визначення концентрацій біомаси, джерел карбону та азоту – кожні 8 годин	t= 25 °C, τ= 3 діб, ω = 150 об/хв, рН=6- 6,5, рО =0,25 г повітря/л*го д, с(X), с(C), с(N), відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Кх, Км 7.1	<i>Посівний матеріал,</i>	Датчик рН годинник,	рН; температура і швидкість	t= 25 °C, τ= 4 діб, рН=

<i>Виробниче культивування у ферментері об'ємом 300 л</i>	тривалість культивування, температура, частота обертів мішалки, рН, концентрація розчиненого кисню, мікробіологічна чистота культури, концентрація біомаси, концентрація ендополісахариду, концентрація джерел карбону та мінерального азоту	термометр технічний, тахометр, манометр, датчик піни, датчик повітря, мікроскоп, концентрація біомаси, ортотолуїдиновий метод, «нітронний» метод.	обертання контролюються і підтримуються автоматично весь час вирощування; мікроскопіювання, визначення концентрацій біомаси, джерел карбону та азоту – кожні 8 годин.	6-6,5, ω = 150 об/хв, $pO_2=0,25$ г повітря/л*год, $c(C)$, $c(N)$, $c(X)=15$ г/л, відсутність сторонньої мікробіоти
--	---	--	--	--

РОЗДІЛ 6. Автоматизація ділянки доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу

Найважливішим етапом даного виробництва є виробничий біосинтез, оскільки помилки під час процесу призводять до найбільших збитків, тому найкращим рішенням є максимальна автоматизація даного процесу. У біосинтезі міцеліальної маси *Agaricus bisporus* використовується наступна сировина: поживне середовище, посівний матеріал *A. bisporus*, титрувальні розчини та піногасник. Посівний матеріал передається з інокулятора, частина поживного середовища знаходиться у ферментері, а частина подається з збірника, титрувальні розчини та піногасник подаються із скляних ємностей через конектор.

У результаті аналізу технологічного процесу описаного у пункті 5.9 зроблені висновки, що автоматизація цього технологічного процесу повинна забезпечувати:

1. Контроль і регулювання температури у ферментері шляхом зміни подачі пари та води від ТЕЦ.
2. Контроль витрати повітря у ферментері.
3. Контроль за рівнем рідини у ферментері з сигналізацією досягнення верхнього припустимого рівня і управління клапаном подачі рідини у ферментер.
4. Контроль і регулювання рН в ферментері шляхом зміни витрати титрувальних розчинів від станції підготовки.
5. Контроль і регулювання піноутворення в ферментері шляхом зміни витрати піногасника від стадії підготовки.

Для розуміння завдання на розробку автоматизації побудуємо таблицю (табл. 6.1) технологічних вимог до системи автоматизації із вказаними параметрами, які контролюються.

					НУХТ БТЕК 04.01.04 КР ПЗ				
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	Розділ 6. Автоматизація ділянки доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу	Літ.	Арк.	Акрушів	
Розроб.		Бондарук С.В.							
Перевір.		Красінько В.О.					114	6	
Консульт.		Клименко О.М.				Кафедра БТМ			
Н. Контр.									
Затверд.		Пирог Т.П.							

Технологічні вимоги до системи автоматизації

№ п/п	Машина, апарат, агрегат	Параметр, місце відбору імпульсу	Значення параметру, допустимі відхилен-ня	Система автоматизації		
				Вид системи автомати- зації	Характер контролю, регулюван- ня, управління	Додаткові вимоги
1	Фермен- тер	Темпера- тура	25±1 °С	Контроль	Відображення	АРМ оператора
				Регулюван- ня	Стабілізація	Дія на подачу пари та води
2		Аерація	42,5 ±1 л/год	Контроль	Відображення	АРМ оператора
3		Рівень	169±10 л	Контроль	Сигналізація	Світлова
4		рН	6-6,5	Контроль	Відображення	АРМ оператора
				Регулюван- ня	Стабілізація	Дія на подачу титруваль- них розчинів
5		Піноутво- рення	Рівень піноутворення	Регулюван- ня	Сигналізація	Дія на подачу піногасника

Оскільки усі наведені у таблиці параметри є важливими для отримання якісної міцеліальної маси *A. bisporus*, тому засоби автоматизації мають бути максимально сучасними, надійними при використанні, швидкими та давати похибку вимірювань до 1 %. У зв'язку із використанням засобів автоматизація для контролю різних фізичних величин, усі датчики повинні бути оснащені уніфікованим вхідним сигналом 4-20 мА, а також важливим є використання уніфікованих вихідних сигналів 0-10 В.

В першому контурі управління та автоматичного контролю згідно із записом у таблиці вказано, що у виробничому ферментері має бути наявним контроль та регулювання температури, яка за умовами культивування має регламентоване значення 25 ± 1 °C. Зміни параметру відображаються на АРМі оператора-технолога з одночасною реєстрацією змін у його архіві. Для вимірювання температури ферментер оснащений термометром опору PT100-SMD1206, який розміщений нижній боковій частині ферментера. Даний термометр опору підходить найкраще за діапазоном вимірювання, який становить для даного приладу 50...130°C із класом точності В 0,12 %. У датчик вбудовано перетворювач температури типу АТ для перетворення збільшення активного опору термометра в уніфікований сигнал 4-20 мА. Управляючий сигнал від 4...20 мА поступає на перетворювач електричного сигналу в пневматичний – РС-28G/A (16) і далі передається на пневматичний привід для управління клапанами типу Р150 (1в), що використовуються для водяної пари. Для управління температурою передбачається стабілізація температури на заданому значенні за рахунок зміни витрати пари або води залежно від ситуації, які подаються у сорочку апарата [111,112,113,114].

У другому контурі необхідно контролювати кількість аераційного повітря, яке надходить у ферментер. Для цього використовується лічильник витрати повітря ДНЕПР-7У, в який вбудований комп'ютер типу ноутбук здатний відображати інформацію. Всі дані зберігаються в пам'яті комп'ютера. Витратоміри забезпечує вимір об'ємної витрати і сумарного об'єму повітря в трубопроводах за рахунок безперервного вимірювання швидкості і відомої площі поперечного перерізу. Оскільки дана величина стала протягом процесу і не зазнає впливу від навколишнього середовища, регулювання протягом процесу культивування недоцільне. [115].

У третьому контурі передбачено сигналізацію про аварійне підвищення рівня у ферментері. Рівень вимірюється за допомогою поплавкового магнітного рівнеміру ПДУ-И (3а). Даний датчик попереджає про досягнення максимально

допустимого рівня в апараті за рахунок світлової сигналізації. Сигналізація передбачається на АРМі оператора-технолога [116].

Четвертий контур передбачає контроль та регулювання показника рН, який регламентовано має бути у межах 6,0-6,5. Зміни рН під час процесу відображаються і реєструються неперервно у часі на АРМі оператора. При відхиленні показників відбувається регулювання. Для вимірювання рН середовища використовується датчик SMARTPAT PH 8570, перевагою якого є можливість його стерилізації разом з ферментером, що дозволяє зберегти асептичність процесу. Також даний датчик оснащений аналоговим виходом з уніфікованим сигналом 4-20 мА, тому не має необхідності для встановлення зовнішнього перетворювача. Уніфікований сигнал поступає на перетворювач електричного сигналу в пневматичний – Fisher i2P-100 (46). Пневматичний сигнал далі передається на привід для управління клапанами типу Р150 (4в) через які подаються титрувальні розчини із скляної ємності [117,118].

У **п'ятому контурі** необхідно контролювати процес піноутворення. Автоматичний контроль піногасіння відбувається за допомогою електрода датчика піни LBFS-B1421.0. При наявності сигналу від датчика піни, розміщеного на кришці ферментера, який визначає рівень рідини та верхню межу піни, активується подача піногасника із скляної ємності через клапан, по заданому користувачем алгоритму. Управляючий сигнал 4...20 мА від датчика LBFS-B1421 поступає на перетворювач електричного сигналу в пневматичний – Fisher i2P-100 (56). Пневматичний сигнал далі передається на привід для управління клапанами типу Р150 (5в) через які подається піногасник із скляної ємності. Крім того, передбачено механічне піногасіння за допомогою спеціальної лопаті на верхньому рівні вала мішалки, що настраюється по висоті [118,119].

Для наведення характеристики використаних для автоматизації виробництва міцеліальної маси датчиків створено таблицю 6.2, у якій вказано основні характеристики та країни виробники.

Специфікація на прилади і засоби автоматизації

Позиція	Місце установки	Найменування характеристика приладу	Тип моделі	Виробник
1a	По місцю	Термометр опору, матеріал виготовлення – нержавіюча сталь, градувальна характеристика Pt100, діапазон вимірювань: -50...+130 °С, розміри 3,2x1,6x0,55мм, клас точності – 0,12, приєднання G1/2, максимальний опір для вихідних сигналів - 100 Ом, вихідний сигнал – аналоговий 4...20 мА або RS 485 (протокол RTU або T-bus), термоопір – RS485	PT100-SMD120	PROFFUSE (Україна)
1б	На щиті	Електропневмоперетворювач, вхідний сигнал - електричний 4...20 мА, вихідний сигнал - пневматичний 20 ... 100 кПа, основна похибка 0,5	PC-28G/A	APLISENS (Польща)
1в 4в 5в	По місцю	Пневматичний привід для управління кранами та заслінками, управляючий сигнал 20...100кПа, приєднання від 1/2” до 1” GAS або NPT, температура робочого середовища -40 + 180°С	P150	ACL s.r.l. (Італія)
2a	По місцю	Максимальна відносна похибка вимірювання 2 %, частотний вихідний сигнал з частотою від 0 до 1000 Гц, пропорційний об'ємній витраті повітря, додатковоим є організація уніфікованого вихідного сигналу постійного струму (4-20) мА, а також зберігання в енергонезалежній пам'яті та передавання архівної вимірювальної інформації через послідовний інтерфейс RS232 і RS485 до персонального комп'ютеру.	Днепр-7	ООО «Днепр» (Україна)
3a	По місцю	Матеріал – нержавіюча сталь 12X18H10T, діапазон робочих температур – -60...+125 °С, діапазон робочого тиску – від вакууму до 2 МПа, густина середовища - $\geq 0,65$ г/см ³ . Аналоговий вихід з уніфікованим сигналом 4-20 мА.	ПДУ-И	ОВЕН (Україна)
4a	По місцю	2-дротовий контур, уніфікований сигнал 4 ... 20 мА, оснащений вбудованим перетворювачем з інтегрованою інтерфейсною шиною HART 7,	SMARTPAT PH 8570	KROHNE (Україна)

		автоклавусмий датчик з термометром опору Pt1000. Тип з'єднання - PG13.5.		
46 56	На щиті	Електропневмоперетворювач, вхідний сигнал - електричний 4...20 мА, вихідний сигнал - пневматичний 0,2 - 1,0 бар, гістерезис - 0,4% від повного діапазону вихідного сигналу	i2P-100	Fisher (США)
5a	По місцю	Матеріал – нержавіюча сталь, температура процесу -40...+115°C, тиск - -1...10 бар, точність ± 1 мм, вихідний сигнал аналоговий – 4...20 мА, приєднання G ½, розпізнавання піни	LBFS-B1421.0	Baumer Group (Швейцарія)

Отже, виконано схему автоматизації процесу біосинтезу для культивування *A. bisporus*. Було запропоновано автоматизувати наступні параметри: температуру, аерацію, рівень заповнення ферментера, рН та піноутворення. Автоматизація даних параметрів дозволить дотримуватися умов та параметрів культивування та звести до мінімуму ризику помилок при культивуванні *A. bisporus*.

ВИСНОВКИ

1. Виявлено постійно зростаючий інтерес до комерційного вирощування та використання грибів роду *Agaricus* у різних сферах життєдіяльності людини. Встановлено найбільш небезпечні для промислового грибівництва мікопатогенні інфекції вірусного, бактеріального та мікроміцетного походження, серед яких найбільшу втрату врожаю для грибів роду *Agaricus* завдають мікроміцети, зокрема виділені з промислових грибних господарств України мікофіли, ідентифіковані як *Cladobotryum mycophilum* та *Cladobotryum* sp. – збудники павутинної цвілі.
2. Досліджено родову приналежність патогенних мікроміцетів з уражених плодових тіл *Agaricus bisporus*, зібраних на грибних господарствах України.
3. У результаті експериментальних досліджень характеру взаємодії чотирьох штамів *A. bisporus* із виділеними мікофільними мікроміцетами було встановлено резистентність двох штамів: *A. bisporus* 36 та *A. bisporus* Ш1 до мікопатогенів.
4. Виявлено ефективні для використання у грибних господарствах України фунгіцидні препарати для боротьби із *Cladobotryum spp.*, найефективнішими з яких є Ширлан (діюча речовина флуазінам) та Флексіті (діюча речовина метрафенон) за рахунок пригнічення росту та механізмів спороутворення *Cladobotryum spp.*
5. Встановлено, що виділені на території України штами *Cladobotryum spp.* проявляють стійкість до фунгіцидного препарату Споргон (діюча речовина прохлораз) та Деразолу з Фундазолом (бензимидазольні фунгіциди), що може бути наслідком тривалого використання даних фунгіцидних препаратів на грибних господарствах.
6. Збільшення виробництва печериць (*Agaricus bisporus*), зокрема за останній рік на 8%, потребує збільшення виготовлення посівного матеріалу та нових пропозицій стосовно технологій отримання посівного матеріалу.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ:

1. Цизь О.М., Приліпка О.В. Стан галузі грибівництва в Україні та світі [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <http://edorada.org/articles/460>
2. Українське грибівництво: погляд у майбутнє [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <https://a7d.com.ua/novini/40360-ukrayinske-gribvnictvo-poglyad-u-maybutnye.html>
3. Волощук Н.М., Бондар Т.І., Троїцький І.М. та ін. Конкурентні мікроорганізми та віруси при вирощуванні Печериці двоспорової // «Наукові доповіді НУБіП». – Вип.6. – 2010. – С. 10-22.
4. McLaughlin DJ, Spatafora JW (Eds.) *Systematics and Evolution* (2nd edn). The *Mycota VII Part A*. Springer, Berlin, 2014, 141–175.
5. de Sá-Nakanishi A.B, Soares A.A, de Oliveira A.L et. al. Effects of treating old rats with an aqueous *Agaricus blazei* extract on oxidative and functional parameters of the brain tissue and brain mitochondria // *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. – 2014. – Vol.2014. – doi: 10.1155/2014/563179.
6. Wei Q, Zhan Y, Chen B. et. al. Assessment of antioxidant and antidiabetic properties of *Agaricus blazei* Murill extracts // *Food Sci Nutr*. – 2019. – Vol. 8, №1. – P. 332-339.
7. Rózsa S., Măniutiu D.-N., Posta G. et. al. Influence of the Culture Substrate on the *Agaricus blazei* Murrill Mushrooms Vitamins Content // *Plants*. – 2019. – Vol. 8. – P.316-335.
8. Soares A. A., De Oliveira A. L., S'a-Nakanishi A. B. et al. Effects of an *Agaricus blazei* aqueous extract pretreatment on paracetamol-induced brain and liver injury in rats // *BioMed Research International*. – 2013. – Vol. 2013. – doi.org/10.1155/2013/469180.
9. DaSilva A.F., Sartori D., MacEdoJr F.C. et. al. Effects of β -glucan extracted from *Agaricus blazei* on the expression of ERCC5, CASP9, and CYP1A1

genes and metabolic profile in HepG2 cells // *Hum. and Exp. Toxicol.* – 2013. – Vol.32, №6. – P. 647–654.

10. Nur Shahirah N., Zuraina M.Y.F., Nor Fadilah R. et. al. Cytotoxicity Effect of *Agaricus blazei*, *Grifola frondosa* and *Hericium erinaceus* Used in Traditional Medicine // *The Open Conference Proceedings Journal.* – 2014. – Vol. 5. – P. 27 – 30.

11. Miyagawa M., Hirono Y., Kawazoe A. et. al. Effect of Hot Water Extract from *Agaricus blazei* Murill on Chemotaxis of Neutrophils // *Journal of Cosmetics, Dermatological Sciences and Applications.* – 2013. – Vol. 3. – P. 12 – 17.

12. Val C.H, Brant F, Miranda A.S et. al. Effect of mushroom *Agaricus blazei* on immune response and development of experimental cerebral malaria // *Malar J.* – 2015. – Vol. 14. – doi: 10.1186/s12936-015-0832-y.

13. Tangen JM, Tierens A, Caers J et. al. Immunomodulatory Effects of the *Agaricus blazei* Murrill-Based Mushroom Extract AndoSan in Patients with Multiple Myeloma Undergoing High Dose Chemotherapy and Autologous Stem Cell Transplantation: A Randomized, Double Blinded Clinical Study // *Biomed Res Int.* – 2014. – Vol. 2015. – doi: 10.1155/2015/718539.

14. Therkelsen S. P., Hetland G., Lyberg T. et. al. Effect of a Medicinal *Agaricus blazei* Murrill-Based Mushroom Extract, AndoSan™, on Symptoms, Fatigue and Quality of Life in Patients with Ulcerative Colitis in a Randomized Single-Blinded Placebo Controlled Study // *PLoS One.* – 2016. – Vol. 11, №3. – doi: [10.1371/journal.pone.0150191](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0150191).

15. Lima C. U.J.O., Gris E. F., Karnikowski M. G.O. Antimicrobial properties of the mushroom *Agaricus blazei* – integrative review // *Revista Brasileira de Farmacognosia.* – 2016. – Vol. 26, №6. – P. 780 – 786.

16. Gameiro P.H., Nascimento J.S., Rocha B.H.G. et. al. Antimutagenic effect of aqueous extract from *agaricus brasiliensis* on culture of human lymphocytes // *Journal of Medicinal Food*. – 2013. – Vol.16, №2. – P. 180– 183.
17. Yurkiv B, Wasser SP, Nevo E et. al. The Effect of *Agaricus brasiliensis* and *Ganoderma lucidum* Medicinal Mushroom Administration on the L-arginine/Nitric Oxide System and Rat Leukocyte Apoptosis in Experimental Type 1 Diabetes Mellitus // *Int J Med Mushrooms*. – Vol. 17, №4. – 2015. – P. 339 -350.
18. Garcia C., Rios Faria C. M. D., Dalla Santa H. S. et. al. Antimicrobial activity of *Agaricus brasiliensis* on *Plasmopara viticola* and its effect on the induction of resistance to the control of downy mildew on ‘Isabel Precoce’ // *Arq. Inst. Biol.* – Vol. 85. – 2018. – P. 1 – 8.
19. Kaygusuz O., Kaygusuz M., Dodurga Y. et. al. Assessment of the antimicrobial, antioxidant and cytotoxic activities of the wild edible mushroom *Agaricus lanipes* (F.H. Møller & Jul. Schäff.) Hlaváček // *Cytotechnology*. – 2017. – Vol. 69, №1. – P. 135 – 144.
20. Soltanian,H., Rezaeian, S-H., Shakeri, A. et. al. Antibacterial activity of crude extracts and fractions from Iranian wild-grown and cultivated *Agaricus* spp. // *Biomed Res.* – 2016. – Vol. 27, №1. – P. 56 - 59.
21. Kosanić, M., Ranković B., Rančić A. et. al. Evaluation of metal contents and bioactivity of two edible mushrooms *Agaricus campestris* and *Boletus edulis* // *Emirates Journal of Food and Agriculture*. – 2017. – Vol. 29, №2. – P. 98 – 103.
22. Wilbers R.H, Westerhof L.B, van de Velde J et. al. Physical Interaction of T Cells with Dendritic Cells Is Not Required for the Immunomodulatory Effects of the Edible Mushroom *Agaricus subrufescens* // *Front Immunol.* – 2016. – 7. – doi.org/10.3389/fimmu.2016.00519.
23. Ramos M., Burgos N., Barnard A. et. al. *Agaricus bisporus* and its by-products as a source of valuable extracts and bioactive compounds // *Food Chem.* – 2019. – Vol. 292. – P. 176 – 187.

24. Risan M. H., Taemor S. H., Muhsin A. H. et. al. Antibacterial activity of *Agaricus bisporus* and *Pleurotus ostreatus* extracts against some gram negative and positive bacteria // *European Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences*. – 2017. – Vol. 4, №12. – P. 9 – 13.
25. Hussien G. M.A., El Mokadem M. T., Youssry A. A. et. al. In vitro Study on the antimicrobial potentialities of two edible mushrooms (*Agaricus bisporus*) and (*Pleurotus ostreatus*) // *Journal of Scientific Research in Science*. – 2015. – Vol. 32, №10. – P. 176 – 191.
26. Ndungutse, V., Mereddy, R., Sultanbawa, Y. Bioactive properties of mushroom (*Agaricus bisporus*) stipe extracts // *J. Food Process. Preserv.* – 2015. – Vol. 39, №6. – P. 2225-2233.
27. Hojat G.M., Dashti F. Chemical composition and antioxidant properties of cultivated button mushrooms (*Agaricus bisporus*) // *Hort. Environ. and Biotechnol.* – 2015. – Vol. 56, №3. – P. 376 – 382.
28. Ragasa C. Y., Reyes J. M. A., Tan M. C. S et. al. Sterols and Lipids from *Agaricus bisporus* // *International Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*. – 2016. – Vol. 8, №10. – P. 1451 – 1453.
29. Stojković D, Reis FS, Glamočlija J et. al. Cultivated strains of *Agaricus bisporus* and *A. brasiliensis*: chemical characterization and evaluation of antioxidant and antimicrobial properties for the final healthy product--natural preservatives in yoghurt // *Food Funct.* – 2014. – Vol. 5, №7. – P. 1602 – 1612.
30. Ghahremani-Majd H, Dashti F. Chemical composition and antioxidant properties of cultivated button mushrooms (*Agaricus bisporus*) // *Hort Environ Biotechnol.* – 2015. – Vol. 56, №3. – P. 376–382.
31. Vairamuthu G. M., Peter J. J. R., Jerley A. et. al. Effect of Chitosan in Radical Scavenging and Bactericidal Activity Isolated from *Agaricus bisporus* Mushroom // *Int. J. Life. Sci. Scienti. Res.* – 2018. – Vol. 4, №4. – P. 1952 – 1959.

32. Mao Y, Mao J, Meng X. Extraction optimization and bioactivity of exopolysaccharides from *Agaricus bisporus* // *Carbohydr Polym.* – 2013. – Vol. 92, №2. – P. 1602-1607.
33. Ditamo Y, Rupil LL, Sendra VG et. al. In vivo immunomodulatory effect of the lectin from edible mushroom *Agaricus bisporus* // *Food Funct.* – 2016. – Vol. 7, №1. – P. 262 – 269.
34. Ašić A, Bešić L, Muhović I et. al. Purification and Characterization of β -Glucosidase from *Agaricus bisporus* (White Button Mushroom) // *Protein J.* – 2015. – Vol. 34, №6. – P. 453 – 461.
35. Solano-Aguilar G. I., Jang S., Lakshman S. et. al. The Effect of Dietary Mushroom *Agaricus bisporus* on Intestinal Microbiota Composition and Host Immunological Function // *Nutrients.* – Vol. 10, №11. – 2018. – P. 1721.
36. Волощук Н. М. Вивчення видового складу мікроміцетів зерна для виробництва посівного міцелію *Agaricus bisporus* (J. E. Lange) Imbach/Н. М. Волощук // Науковий вісник Національного університету біоресурсів і природокористування України, 2015, N Вип. 210, ч. 1. - С.294-298.
37. Бойко О. А. Морфологія та структурні особливості патогенів Basidiomycetes / О. А. Бойко, Т. П. Шевченко, А. А. Бойко // Мікробіологічний журнал. – 2013. – Т.75. - №3. – С. 54-59.
38. Kertesz M.A., Thai M. Compost bacteria and fungi that influence growth and development of *Agaricus bisporus* and other commercial mushrooms // *Appl Microbiol Biotechnol.* – 2018. – Vol. 102, № 4. – P. 1639 – 1650.
39. Carrasco J, Preston G.M. Growing edible mushrooms: a conversation between bacteria and fungi // *Environ Microbiol.* – 2019. – doi: 10.1111/1462-2920.14765.
40. Gautam C. K., Madhav M., Sinha A. et. al. VIT-CMJ2: Endophyte of *Agaricus bisporus* in Production of Bioactive Compounds // *Iran J Biotechnol.* – 2016. – Vol. 14, №2. – P. 19 – 24.

41. Ahlawat O.P., Manikandan K. Evaluation of bacterial inoculants for yield enhancement of white button mushroom, *Agaricus bisporus* under commercial scale cultivation // *Mushroom Research*. – 2015. – Vol. 24, №2. – P. 95-104.
42. Особливості екстракції нуклеїнових кислот вірусної природи з печериць / Т. В. Іванова // Науковий вісник Національного університету біоресурсів і природокористування України. Серія : Біологія, біотехнологія, екологія. - 2015. - Вип. 214. - С. 106-111.
43. Іванова Т. В. Модифікація методу виділення та очищення дволанцюгових РНК вірусів з плодових тіл печериці двоспорової // Вісник ЖНАЕУ. – 2014. – Вип. 42, №2, т.1 – С. 49 – 54.
44. Deakin G., Dobbs E., Bennett J. M. et. al. Multiple viral infections in *Agaricus bisporus* - Characterisation of 18 unique RNA viruses and 8 ORFans identified by deep sequencing // *Sci Rep*. – 2017. – Vol. 7. – doi: [10.1038/s41598-017-01592-9](https://doi.org/10.1038/s41598-017-01592-9)
45. Milijasevic-Marcic S., Todorovic B., Stepanovic M. et. al. Monitoring of bacterial diseases of *Agaricus bisporus* in Serbia // *Pestic. Phytomed*. – 2016. – Vol. 31, №1-2. – P. 29-35.
46. Muhammad I, Sossah F. L., Yang Y. et. al. Identification of resistance to cobweb disease caused by *Cladobotryum mycophilum* in wild and cultivated strains of *Agaricus bisporus* and screening for bioactive botanicals // *RSC Advances*. – 2019. – Vol. 9. – P.14758 – 14765.
47. Gea F.J., Carrasco J., Santos M. et. al. *Cladobotryum mycophilum*, causal agent of cobweb disease on commercial *Agaricus bisporus* and *Pleurotus eryngii* groups in Spain // *Proceedings of the 8th International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products*. – 2014. – P. 523 – 529.
48. Kosanovic D., Potocnik I., Duduk B. et. al. *Trichoderma* species on *Agaricus bisporus* farms in Serbia and their biocontrol // *Annals of Applied Biology*. – 2013. – Vol. 163. – P. 218 – 230.

49. Fu Y., Wang X., Li D. et. al. Identification of Resistance to Wet Bubble Disease and Genetic Diversity in Wild and Cultivated Strains of *Agaricus bisporus* // *Int J Mol Sci.* – 2016. – Vol. 16, №10. – doi: [10.3390/ijms17101568](https://doi.org/10.3390/ijms17101568)
50. Geosel A., Szabo A., Akan O. et. al. Effect of essential oils on mycopathogens of *Agaricus bisporus* // *Proceedings of the 8th International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products.* – 2014. – Vol. I. – P. 530 – 535.
51. Carrasco J., Navarro M.J., Santos M. et. al. Effect of five fungicides with different modes of action on cobweb disease (*Cladobotryum mycophilum*) and mushroom yield // *Annals of Applied Biology* – 2017. – Vol. 171, №1. – P. 62– 69.
52. Kumar V., Yadav U. Screening of antifungal activity of *Pleurotus ostreatus* and *Agaricus bisporus* // *Biolive.* – 2014. – Vol. 2, №3. – P. 918 – 923.
53. Pandin C, Darsonval M, Mayeur C. et. al. Biofilm Formation and Synthesis of Antimicrobial Compounds by the Biocontrol Agent *Bacillus velezensis* QST713 in an *Agaricus bisporus* Compost Micromodel // *Appl Environ Microbiol.* – 2019. – Vol. 85, №12. – doi.10.1128/AEM.00327-19.
54. Pandin C, Védie R, Rousseau T et. al. Dynamics of compost microbiota during the cultivation of *Agaricus bisporus* in the presence of *Bacillus velezensis* QST713 as biocontrol agent against *Trichoderma aggressivum* // *Biol Control.* – 2018. – Vol. 127. – P. 39 – 54.
55. Pandin C, Le Coq D, Deschamps J et. al. 2018. Complete genome sequence of *Bacillus velezensis* QST713: a bio-control agent that protects *Agaricus bisporus* crops against the green mould disease // *J Biotechnol.* – 2018. – Vol. 278. – P. 10 – 19.
56. Sasidhara R., Bakki V. Screening of Mushrooms for Polysaccharides // *Iranian Journal of Biotechnology.* – Vol. 12, №4. – 2014. – P.73 – 76.

57. Kim K., Choi B., Lee I. Bioproduction of mushroom mycelium of *Agaricus bisporus* by commercial submerged fermentation for the production of meat analogue // *J Sci Food Agrid.* – Vol. 91. – 2011. – P. 1561-1568.
58. Kurbanoglua E.B., Algura O.F., Zulkadirb A. Submerged production of edible mushroom *Agaricus bisporus* mycelium in ram horn hydrolysate // *Industrial Crops and Products.* – Vol. 19. – 2004. – P. 225-230.
59. Schmidt T. M., Hoeltz M., Müller A. P. et. al. Production of *Agaricus bisporus* (JE Lange) Imbach Biomass under Submerged Cultivation by Using *Citrus reticulata* Blanco Waste as an Alternative Carbon Source // *Current Journal of Applied Science and Technology.* – Vol. 25, №1. – 2017. – P. 1 – 11.
60. Falcon-Garcia G., Carbonero-Aguilar P., Cremades O. et. al. Effects of supplementation on the mycelial ergosterol content of *Agaricus bisporus* grown on media formulated with olive oil subproducts // *International Journal of Environmental & Agriculture Research.* – Vol. 4, №7. – 2018. – P. 36 – 44.
61. Zhang J., Elser J. J. Carbon:Nitrogen:Phosphorus Stoichiometry in Fungi: A Meta-Analysis // *Front Microbio.* – Vol.8. – 2017. – doi:[10.3389/fmicb.2017.01281](https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01281).
62. Kurbatov, A. I. Study of the agaricus bisporus strain a-15 grain spawn obtaining method / A. I. Kurbatov, O. V. Shapovalova, L. S. Strelnikov // Topical issues of new drugs development : abstracts of XXIV international scientific and practical conference of young scientists and student, April 20, 2017. - Kh., 2017. - Vol. 1. - P. 319-320.
63. *Agaricus bisporus* [Электронный ресурс]. – Режим доступа: https://www.mushroomexpert.com/agaricus_bisporus.html
64. Sharma M. V., Sagar A., Joshi M. Study on Antibacterial Activity of *Agaricus bisporus* (Lang.) Imbach // *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci.* – Vol. 4, №2. – 2015. – P. 553 – 558.

65. *Lishma N. P., L. Das.* Influence of different nutrient sources on the growth of white button mushroom (*Agaricus bisporus*) in Kerala // *International Journal of Applied and Pure Science and Agriculture.* – Vol. 1, №4. – 2015. – P. 27 – 30.
66. *Yadav M.K., Chandra R.* Effect of Culture Media, pH and Temperature on Mycelial Growth of *Agaricus Bisporus* Strains // *Journal of pure and applied microbiology.* – Vol. 8, №3. – 2014. – P. 1 – 5.
67. *Ismail M., Kibriya G., Hossain J. et. al.* Effect of physicochemical components on mycelial growth of *Agaricus bisporus* - a popular edible mushroom // *Plant Environment Development.* – Vol. 5, №1. – 2016. – P. 7 – 12.
68. *T. Cavalier-Smith.* A revised six-kingdom system of life // *Biol. Rev.* – Vol. 73. – 1998. – P. 203 – 266.
69. *Agaricus bisporus* [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=1005091&lvl=3&lin=f&keep=1&srchmode=1&unlock>
70. Список компаній - Гриби і мицелій - Україна [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <https://ua.kompass.com/a/%D0%B3%D1%80%D0%B8%D0%B1%D1%8B-%D0%B8-%D0%BC%D0%B8%D1%86%D0%B5%D0%BB%D0%B8%D0%B8/02380/>
71. *Дикаленко М.* Українські фермери стрімкими темпами нарощують виробництво та експорт грибів [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <https://landlord.ua/news/ukrayinski-fermeri-strimkimi-tempami-naroshhuyut-virobnitstvo-ta-eksport-gribiv/>
72. *Вдовенко С.А.* Вирощування їстівних грибів: Навч. посіб., 2010.- 120с.

73. «Гелека-М». Как вырастить лучшие грибы на рынке [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://landlord.ua/news/keyisy/geleka-m-kak-vyirastit-luchshie-gribyi-na-ryinke/>
74. Грибне царство Степана Чабана [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://www.volyn.com.ua/news/15916-gribne-tsarstvo-stepana-chabana.html>
75. 40 днів - і є свіжа копійка [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://expres.online/archive/news/2017/07/29/254793-40-dniv-svizha-kopiyka>
76. Kim S.W., Hwang H.J., Park J.P. et. al. Mycelial growth and exopolymers production by submerged culture of various edible mushrooms under different media // *Lett Appl Microbiol.* – Vol. 34, № 1. – 2002. – P. 56 – 61.
77. Pat. 0235579 USA. Method of culturing agaricus bisporus mycelium and medium for culturing the same / Young-Duk Kim, Yong-Hwi Kim. – Publ. 24.09.2009
78. Промышленный ферментер 300-500 л [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://www.biotechno.ru/catalog/promyshlennaya-fermentatsiya/promyshlennyy-fermenter-biotechno-obemom-300-500-l/>
79. BIOSTAT® Cplus [Электронный ресурс]. – Режим доступа: http://www.sartogsm.ru/biostat_c_plus.html
80. Наказ МОЗ України від 14.12.2001 № 502
81. Сода кальцинированная [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://prom.ua/ua/p4274507-soda-kaltsinirovannaya.html>
82. Дезинфицирующее средство «Бланидас 300» [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://blanidas.com.ua/ru/blanidas-300-1kg/>
83. Санокварт 1000 мл ДезоМарк Санокварт 1л [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://prom.ua/ua/p574100251-sanokvart-1000-dezomark.html>

84. Станція СІР-мийки обладнання КМЗ-СЦМ [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <http://kmbp.com.ua/produksiya/molochna-promislovist/stantsiji-cip-mijki/stantsiia-cip-myiky-obladnannia-kmz-stsm>
85. Очищення повітря у фармацевтичній промисловості [Електронний ресурс]. – Режим доступу: https://7-vz.com.ua/category/ochistka_vozdukh_v_farmatsevticheskoy_promyshlennosti/
86. Компресори EnviroAire Т / TVS з технологією oil-free [Електронний ресурс]. – Режим доступу: https://www.compressors.ua/kompresory-z-technologieu-oil-free-oil-less/EnviroAire_T_TV_S
87. Осушувачі холодильного типу, точка роси +3 ° С, до 16 бар [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <https://konstrack.com/uk/catalog/pidgotovka-povitrya/osushuvachi-povitrya/osushuvachi-holodilnogo-tipu-krapka-rosi-3-s-do-16-bar/>
88. Конспект лекцій з дисципліни «Асептика біотехнологічних виробництв» освітньо-професійної програми другого (магістерського) рівня вищої освіти зі спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія» усіх форм навчання/ Укл.: Головей О.П., Гуляєв В.М. – Кам'янське, ДДТУ, 2017р., 140с.
89. *Dijkstra FI, Scheffers WA, Wikén TO. Submerged growth of the cultivated mushroom, Agaricus bisporus // Antonie Van Leeuwenhoek. – 1972. – Vol. 38, №3. – P. 329-340.*
90. *Kerrigan RW, Challen MP, Burton KS. Agaricus bisporus genome sequence: a commentary // Fungal Genet Biol. – 2013. – Vol. 5. – P. 1-4.*
91. Автоматическая Сип-мойка 2X100 л BIORUS [Електронний ресурс]. – Режим доступу: [https://bio-rus.ru/oborudovanie/mobilnyie-sip-mojki-i-sip-stanczii/mobilnyie-sip-mojki-\(rossiya,-biorus%C2%AE-\)/avtomaticheskaya-sip-mojka-cip-2x100l-biorus%C2%AE.html](https://bio-rus.ru/oborudovanie/mobilnyie-sip-mojki-i-sip-stanczii/mobilnyie-sip-mojki-(rossiya,-biorus%C2%AE-)/avtomaticheskaya-sip-mojka-cip-2x100l-biorus%C2%AE.html)

92. Дозатори вагові облікові спеціальні ДВУ-1 і ДВУ-3 [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <https://asvik.kiev.ua/ua/catalog/group/product/34>
93. Фильтр ФЯК G4 490x592x300-5 [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <https://asfilter.com.ua/catalog/ventilyatsiya/karmannyu-filtr-490kh592kh300-5-g4/>
94. Фильтрующий материал G4 от NEW FILTER [Електронний ресурс]. – Режим доступу: https://newfilter.com.ua/ru/ventiljacionnie_filtri/filtruyshie_materiali_g2_-_g4.html
95. Ресивер воздушный вертикальный РВ 100.370 [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <http://www.kongyr.com.ua/resiver-vozdushniy-vertikalniy-rv-100-370/>
96. Теплообменники VTS [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <http://servicevts.ru/category/vts-zapchasti/teploobmenniki-vts/>
97. Фильтры для очистки сжатого воздуха CLEARPOINT [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <https://dnepirstan.com.ua/%D1%84%D0%B8%D0%BB%D1%8C%D1%82%D1%80%D1%8B-%D0%B4%D0%BB%D1%8F-%D0%BE%D1%87%D0%B8%D1%81%D1%82%D0%BA%D0%B8-%D1%81%D0%B6%D0%B0%D1%82%D0%BE%D0%B3%D0%BE-%D0%B2%D0%BE%D0%B7%D0%B4%D1%83%D1%85%D0%B0-clearpoint/>
98. Емкость из нержавеющей стали 316 L объемом 5 л. [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <https://promvit.com.ua/emkost-iz-nerzhaveyushhej-stali-316-l-obemom-5-l/>
99. Фільтрувальні елементи ЕПМ.Ф [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <https://ukr.technofilter.kiev.ua/services/produktsiya/patronni-filtruvalni-elementi/--filtruvalni-elementi-epm.f>

100. Реактор [Электронний ресурс]. – Режим доступу: <https://promvit.com.ua/reaktor-so-smennymi-meshalkami-freza-i-proppelernaya/>
101. Герметичний насос з магнітною муфтою DM 06 [Электронний ресурс]. – Режим доступу: https://www.debem.com.ua/ukr/nasos/nasosy_s_magnitnoj_muftoj/dm06/
102. Химический реактор с мешалкой и рубашкой [Электронний ресурс]. – Режим доступу: <https://stprom.com.ua/p1016445830-himicheskij-reaktor-meshalkoj.html>
103. Поршневі компресори [Электронний ресурс]. – Режим доступу: <https://abtechnologies.com.ua/uk/obladnannya/kompresory/porshnevi/>
104. *Agaricus bisporus* (J. E. Lange) Imbach - Cultivated (Button) Mushroom [Электронний ресурс]. – Режим доступу: <https://www.first-nature.com/fungi/agaricus-bisporus.php>
105. SBR Реакторы циклической очистки [Электронний ресурс]. – Режим доступу: <http://myproject.msk.ru/ru/tehnologii/ochistka-stochnyh-vod/sbr-tehnologiya/>
106. Питающиеся пластиком бактерии позаботятся об окружающей среде. [Электронний ресурс]. – Режим доступу: <https://ecotechnica.com.ua/ekologiya/878-pitayushchiesya-plastikom-bakterii-pozabotyatsya-ob-okruzhayushchej-srede.html>
107. Пункты приема вторсырья компании [Электронний ресурс]. – Режим доступу: <https://www.vtorma.ua/ru/uslugi/punkty-priema-vtorsyrya-adresa-cto-prinimaem-cto-mozhno-sdat/>
108. 2950D Biochemistry Analyzer [Электронний ресурс]. – Режим доступу: <https://www.ysi.com/ysi-2950-biochemistry-analyzer>
109. Biosensor Technology | YSI Life Sciences [Электронний ресурс]. – Режим доступу: <https://www.ysi.com/ysi-blog/water-blogged-blog/2017/08/biosensor-technology-ysi-life-sciences>

110. Rae A.C., Hall A.N. Determination of nitrate in fermentation media by a modification of the nitron method // *Science of Food and Agriculture*. – 1973. – Vol. 14, №11. – P. 821-824.

111. PT100-SMD1206 PROFFUSE [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <https://www.tme.eu/ru/details/pt100-smd1206/datchiki-temperature-rezistivnye/proffuse/>

112. Перетворювач температури типу АТ для роботи з термометрами опору типу Pt100 і 100Н [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <https://aplisens.com.ua/prod/50>.

113. Електропневматичний міжсистемний перетворювач РС-28G/A [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <https://aplisens.com.ua/prod/64>

114. Клапан з пневмоприводом відсічний, тип Р150, Р152 [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <https://www.italgaz.com.ua/ua/pneumatic-valve/angle-seat-valve-acl-p150-p152.html>

115. Витратомір- лічильник для вимірювання повітря [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <http://dnepro-ukr.com.ua/ua/nasha-produktsiya/oblik-gaziv/product-34-detail>

116. ПДУ-И. Поплавковые датчики уровня с аналоговым выходным сигналом 4...20 мА [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <https://owen.ua/ru/datchiki/pdu-i-poplavkovye-datchiki-urovnja-s-analogovym-vyhodnym-signalom-4-20-ma>

117. SMARTPAT PH 8570 [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <https://ua.krohne.com/ru/pribory/analiticheskie-pribory-dlja-tehnologicheskikh-prochessov/analiticheskie-datchiki/datchiki-ph/smartpat-ph-8570/>

118. Электропневматические преобразователи Fisher™ i2P-100 [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <https://www.emerson.com/documents/automation/instruction-manual->

[%D1%8D%D0%BB%D0%B5%D0%BA%D1%82%D1%80%D0%BE%D0%BF%D0%BD%D0%B5%D0%B2%D0%BC%D0%B0%D1%82%D0%B8%D1%87%D0%B5%D1%81%D0%BA%D0%B8%D0%B9-%D0%BF%D1%80%D0%B5%D0%BE%D0%B1%D1%80%D0%B0%D0%B7%D0%BE%D0%B2%D0%B0%D1%82%D0%B5%D0%BB%D1%8C-fisher-i2p-100-fisher-i2p-100-electro-pneumatic-transducer-russian-ru-135354.pdf](#)

119. Датчики уровня CleverLevel LBFS Сигнализатор предельного уровня [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://www.prst.ru/docs/baumer/cleverlevel/LBFS.pdf>

Перелік публікацій за час навчання:

1. Бондарук С., Бондарчук В., Кернер А. Дослідження ефективності методів дезинфекції поверхні рук // Матеріали 84 міжнародної наукової конференції молодих учених, аспірантів і студентів “Наукові здобутки молоді – вирішенню проблем харчування людства у XXI столітті”, 23–24 квітня 2018 р. – К.: НУХТ, 2018 р. – Ч.1. – 471 с.
2. Бондарук С., Кернер А., Красінько В., Аль-Маалі Г. Перспектива створення біологічно активних добавок (БАД)з представників відділу Basidiomycetes // Матеріали 85 Ювілейної Міжнародної наукової конференції молодих учених, аспірантів і студентів "Наукові здобутки молоді –вирішенню проблем харчування людства у XXI столітті", присвяченої 135-річчю Національного університету харчових технологій, 11–12 квітня 2019р. –К.: НУХТ, 2019р. – Ч.1. –486 с.
3. Бондарук С.В., Кернер А.О., Аль-Маалі Г.А. Вплив концентрацій джерел азоту, вуглецю та рівень рН на ріст накопичення біомаси *Crinipellis schevzhenkoii* та *Abortiporus biennis* // Актуальні проблеми ботаніки та екології. Матеріали міжнародної конференції молодих учених (Харків, 6-9 вересня, 2019р.). - Київ, 2019. - с. 60.
4. Бондарук С., Красінько В. Перспективи використання макроміцетів родин *Agaricaceae* для одержання антимікробних біологічно активних речовин // Матеріали 86 Міжнародної наукової конференції молодих учених, аспірантів і студентів "Наукові здобутки молоді – вирішенню проблем харчування людства у XXI столітті", 2–3 квітня 2020 р. – К.: НУХТ, 2020 р. – Ч.1. – 372 с.
5. Медведєв Д.Г., Кернер А.О., Бондарук С.В., Аль-Маалі Г.А. Дослідження культуральних особливостей та фунгіцидної резистентності штамів *Cladobotryum mycophilum* (*Hypocreales*, *Ascomycota*) – вперше виявленого на

4. Дослідження ефективності методів дезінфекції поверхні рук

Світлана Бондарук, Валерія Бондарчук, Аліна Кернер

Національний університет харчових технологій, м. Київ, Україна

Вступ. Актуальність даної теми полягає в важливості запобігання поширенню таких захворювань як дизентерія, черевний тиф та гепатит методом профілактики розвитку шкідливих бактерій на поверхні рук.

Матеріали і методи. Проводили дослідження ефективності найбільш популярних побутових засобів для дезінфекції: вологих антибактеріальних серветок, антисептика для рук та мила. Крім того, як метод дезінфекції поверхні рук, було використано фен для створення умов сушіння рук у громадському місці. Посів мікроорганізмів з поверхні рук до та після обробки здійснювали методом поверхневих штрихів. Для посівів використовували чашки Петрі з МПА (для визначення загального мікробного забруднення) та з середовищем Ендо (для виявлення бактерій групи кишкової палички). Якісний та кількісний склад мікробіоти визначали стандартними методами мікроскопічного дослідження.

Результати. На руках, які не були очищені жодним засобом, на середовищі МПА було виявлено більше 1000 колоній мікроорганізмів: більшість – кокових бактерій та одна колонія мікроміцетів.

Аналіз мікробіоти поверхні рук, які були очищені антисептичним гелем, виявив більше 100 колоній на середовищі МПА та 4 колонії на середовищі Ендо, переважна кількість колоній кокових бактерій, також було виявлено грибку колонію.

Мікробіота рук, що були очищені найтрадиційнішим методом – з використанням мила та рушника, була представлена бактеріями та мікроміцетами. Загальна кількість колоній на МПА становила 100.

Непоганий дезінфікуючий ефект спостерігали за використання вологої серветки для очищення рук. На середовищі МПА виявлено 6 колоній кокових бактерій світло-коричневого кольору та 2 колонії паличкоподібних бактерій блідо-жовтого (тілесного) кольору.

Найкращий результат був від дезінфекції рук в умовах, наближених до умов очищення рук у громадських місцях: знайдено три білі колонії кокових бактерій на середовищі МПА. На середовищі Ендо жодної колонії не виявлено.

Висновки. Результати досліджень свідчать про ефективне зниження загальної обнасіненості мікроорганізмами поверхні рук за використання популярних та доступних побутових дезінфікуючих засобів. Найкращим способом очищення рук виявлено використання мила та просушуючих приладів.

4. Перспектива створення біологічно активних добавок (БАД) з представників відділу *Basidiomycetes*

Світлана Бондарук¹, Аліна Кернер¹,
Вікторія Красінсько¹, Галєб Аль-Маалі²

¹ – Національний університет харчових технологій, Київ, Україна

² – Інститут ботаніки ім. М.Г. Холодного НАНУ, Київ, Україна

Вступ. Біомаса грибів є джерелом багатьох корисних біологічно активних речовин. Тому увага вчених різних країн світу спрямована на з'ясування можливості використання лікарських грибів для створення біологічно активних добавок.

Викладення основного матеріалу. Базидіоміцети багаті на такі важливі сполуки, як терпеноїди різних класів (монотерпеноїди, сесквітерпеноїди, дитерпеноїди, сестертерпеноїди, тритерпеноїди, тетратерпеноїди). Установлено, що гриби в умовах глибинного культивування синтезують широкий спектр біологічно активних речовин: каротиноїди, низько- та високомолекулярні фенольні з'єднання, полісахариди, вуглеводні протектори, білки, ліпіди та інші, до того ж в кількостях, що перевищують такі в плодових тілах[1].

Гриби з класу базидіоміцетів використовуються для отримання великої кількості біологічно активних молекул, серед яких найбільш вивченими є полісахариди. Грибні полісахариди здатні проявляти протипухлинну, імуномодулюючу, протизапальну, противірусну, антиоксидантну, гіпоглікемічну та гепатопротекторну дію, а також захист від хронічного радіаційного стресу [2]. Є близько 650 представників з вищих *Basidiomycetes*, які, як було встановлено, володіють протипухлинною активністю, серед них види родів *Ganoderma*, *Grifola*, *Lentinus*, *Gomphus*, *Trametes* і *Pleurotus* [3,4].

На сьогодні популярною формою використання макроміцетів є створення на їх основі дієтичних добавок, що вживаються людиною для покращення стану здоров'я. Найбільшим виробником таких добавок є США, зокрема такі компанії як Nature's Sunshine Products, Ming Gold, SC Formula, Mico Forte, Rare Red Reishi. В Україні розпочато випуск харчових добавок серії "Мікосвіт" та "Міко" на основі плодових тіл та міцелію *L. edodes*, *G. frondosa*, *G. lucidum* та інших видів лікарських грибів, "Мікотон" – з використанням плодових тіл *Fomes fomentarius*[1].

Висновки. Подальше вивчення застосування базидіальних грибів для виготовлення БАДів є актуальним проектом, оскільки до складу грибів входять біологічно активні речовини, що мають позитивний вплив на людський організм.

Література.

1. Бісько Н.А., Бабицька В.Г., Бухало А.С. та ін. (2012), Биологические свойства лекарственных макромицетов в культуре: Сборник научных трудов в двух томах. Т. 2. / Под ред. Чл.-кор. НАН Украины С.П. Вассера, 459 с.
2. Qiong Wang, Feng Wang, Zhenghong Xu and Zhongyang Ding. (2017), Bioactive mushroom polysaccharides: a review on monosaccharide composition, biosynthesis and regulation, molecules, 22 (6), p. 955.
3. Cojocar S., Raud M., Bodea L.G. et. al. (2013) Water soluble *Pleurotus ostreatus* polysaccharide down-regulates the expression of MMP-2 and MMP-9 in Caco-2 Cells, *Not Bot Horti Agrobo*, 41 (2), p. 553-559.
4. Wisbeck E., Facchini J.M., Alves E.P. et. al. (2017) A polysaccharide fraction extracted from *Pleurotus ostreatus* mycelial biomass inhibit Sarcoma 180 tumor, *An Acad Bras Cienc.*, 89 (3), doi.org/10.1590/0001-3765201720150635.

Вплив концентрацій джерел азоту, вуглецю та рівень pH на ріст накопичення біомаси *Crinipellis schevzhenkoi* та *Abortiporus biennis*

Effect of nitrogen, carbon concentrations, and pH on growth and accumulation of biomass *Crinipellis schevzhenkoi* and *Abortiporus biennis*

Бондарук С.В.¹, Кернер А.О.¹, Аль-Маалі Г.А.²

¹ Національний університет харчових технологій, Україна

² Інститут ботаніки ім. М.Г. Холодного НАНУ, Україна

Bondaruk S.V.¹, Kerner A.O.¹, Al-Maali G.A.²

¹ National university of food technologies, Ukraine

² M.G. Kholodny Institute of Botany of NAS of Ukraine

Біомаса *Crinipellis schevzhenkoi* Buchalo та *Abortiporus biennis* (Bull.) Singer має важливе практичне значення, оскільки містить в своєму складі велику кількість біологічно активних речовин, таких як полісахариди, тритерпеноїди, білки та інші важливі структури. Метою дослідження, була оптимізація складу живильного середовища для збільшення виходу біомаси зазначених лікарських грибів.

Об'єктами дослідження були *Crinipellis schevzhenkoi* штам 31 та *Abortiporus biennis* штам 2591 з колекції шапинкових грибів Інституту ботаніки ім. М.Г. Холодного НАНУ (ІБК). Для дослідження впливу концентрацій вуглецю на ріст та накопичення біомаси використовували глюкозу у концентраціях 15, 20, 25, 30 г/л. Джерелами азоту у середовищі виступали пептон та дріжджовий екстракт, які використовували у концентраціях від 2 до 8 г/л. Вплив pH середовища на ріст зазначених видів досліджували в інтервалі 3–8.

В ході дослідження встановлено оптимальний склад живильного середовища для накопичення біомаси *A. biennis* 2591 містить 25 г/л глюкози, 3 г/л пептону, 3 г/л дріжджового екстракту. З'ясовано, що pH середовища 4,5–5,0 є оптимальним для *A. biennis* 2591. Після культивування протягом 7 діб на оптимізованому середовищі вихід біомаси складав 4,08 г/л.

Виявлено, що оптимальний склад живильного середовища для накопичення біомаси *C. schevchenkoi* 31 містить 25 г/л глюкози, 4 г/л пептону, 4 г/л дріжджового екстракту; pH в межах 7–8. Після культивування протягом 7 діб на оптимізованому середовищі вихід біомаси складав 5,86 г/л.

Effect of carbon, nitrogen concentration on growth and accumulation of biomass of *Crinipellis schevzhenkoi* 31 and *Abortiporus biennis* 2591 was studied. The maximum mycelial biomass for *C. schevzhenkoi* 31 was 5,86 g/l and for *A. biennis* 4,08 g/l was achieved after cultivation for 7 days with the optimised concentration of sources carbon and nitrogen.

4

5. Перспективи використання макроміцетів родини *Agaricaceae* для одержання антимікробних біологічно активних речовин

Світлана Бондарук, Вікторія Красінько

Національний університет харчових технологій, Київ, Україна

Вступ. Завдяки великому природному різноманіттю базидіоміцети синтезують надзвичайно важливі для людства біологічно активні речовини з різними властивостями.

Викладення основного матеріалу. Зважаючи на значну загрозу для здоров'я людей патогенних мікроорганізмів через резистентність до антибіотиків, одним з основних завдань сучасної науки є пошук нових речовин з антимікробними властивостями. Тому, досить велика кількість досліджень присвячена біологічно активним речовинам вищих базидіоміцетів із антибактеріальними властивостями. У неочищених екстрактах, отриманих з *Agaricus bisporus*, було визначено антибактеріальну активність відносно грампозитивних (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Micrococcus flavus*, *Listeria monocytogenes*) та грамнегативних (*Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Enterococcus cloacae*) бактерій. Однак зазначена активність значною мірою була пов'язана з методами екстрагування на основі розчинника, які демонстрували велику різницю в результатах [1]. Антимікробні властивості *A. blazei* були підтверджені у більшості досліджень з використанням методів *in vitro* та *in vivo* (випробування на мишах). Зокрема доведена дієвість використання грибного екстракту проти мікроорганізмів, що спричиняють пневмонію та фекальний перитоніт – інфекційні захворювання з високим ступенем летальності. Результати досліджень, які підтвердили антимікробну активність екстрактів гриба *A. blazei*, здебільшого виявили більшу дієвість проти грампозитивних бактерій, таких як *S. aureus*, *Salmonella typhi*, *Streptococcus pneumoniae*, *S. mutans*, *S. sobrinus*, *B. cereus*. Дослідники виявили, що в грибах є цілий ряд протимікробних речовин, представлених низькомолекулярними сполуками, які є переважно вторинними метаболітами, такими як терпени, сесквітерпени та інші стероїди, антрахінони, похідні бензойної кислоти та хінолін, а також первинні метаболіти, такі як шавлева кислота [2].

Антимікробну активність метанолового екстракту, отриманого з плодових тіл *A. lanipes*, було протестовано проти трьох видів грампозитивних бактерій, трьох грамнегативних бактерій та одного виду дріжджів [3]. Різні екстракти видів *A. bisporus*, *A. bitorquis*, *A. essettei*, *A. silvicola* та *A. brasiliensis* з родини *Agaricaceae* виявили протимікробну дію проти різних мікроорганізмів, таких як *M. luteus*, *S. aureus*, *B. subtilis*, *Proteus vulgaris*, *Yersinia enterocolitica* та *Candida albicans*; однак, екстракт *A. lanipes* додатково виявив незначну протимікробну дію проти бактерій *E. coli* [3].

Література

1. Ramos M, Burgos N, Barnard A et. al. (2019), *Agaricus bisporus* and its by-products as a source of valuable extracts and bioactive compounds, *Food Chem.*, 292, p. 176-187.
2. Sokovic M., Ciric A., Glamoclija J. et. al. (2016), Antimicrobial properties of the mushroom *Agaricus blazei* – integrative review, *Molecules*, 19 (4), p. 4189-4199.
3. Kaygusuz O., Kaygusuz M., Dodurga Y. et. al. (2017), Assessment of the antimicrobial, antioxidant and cytotoxic activities of the wild edible mushroom *Agaricus lanipes*, *Cytotechnology*, 69 (1), p. 135-144.

Дослідження культуральних особливостей та фунгіцидної резистентності штамів *Cladobotryum mycophilum* (*Hypocreales*, *Ascomycota*) — вперше виявленого на промислових культурах печериці в Україні збудника павутинної цвіль

Дмитро Г. МЕДВЕДЕВ¹, Аліна О. КЕРНЕР², Світлана В. БОНДАРУК², Галєб А. АЛЬ-МААЛІ¹

¹ Інститут ботаніки ім. М. Г. Холодного НАН України
вул. Терещенківська 2, Київ 01604, Україна

² Національний університет харчових біотехнологій та екологічного контролю
вул. Володимирська 68, Київ 01601, Україна
galeb.almaali@gmail.com

Medvediev D. G.¹, Kerner A. O.², Bondaruk S. V.², Al-Maali G. A.¹ 2019. Investigation of cultural features and fungicide resistance of the strains of *Cladobotryum mycophilum* (*Hypocreales*, *Ascomycota*), a causal agent of cobweb disease on button mushroom crops, newly recorded in Ukraine. *Ukrainian Botanical Journal*, 76(2): 121–131.

¹ M. G. Kholodny Institute of Botany, National Academy of Sciences of Ukraine

2 Tereshchenkivska Str., Kyiv 01001, Ukraine

² National University of Food Biotechnology and Environmental Control
68 Volodymyrska Str., Kyiv 01004, Ukraine

Abstract. For the first time, *Cladobotryum mycophilum*, a causal agent of cobweb disease of *Agaricus bisporus*, was discovered on mushroom farms in Ukraine. Growth characteristics and morphology features of five strains of *C. mycophilum* were studied on standard nutrient media of different composition. Particular attention was paid to determining the sensitivity of these strains to the following fungicides: benzimidazole fungicides (carbendazim and benomyl), fluazinam, metrafenone and prochloraz. In the study, we used concentrations recommended by manufacturers for application on mushroom farms. It was found that all strains were resistant to carbendazim. Only one strain had a high sensitivity to benomyl, two strains had a very low sensitivity, and two strains were resistant. Resistance to benzimidazole fungicides and absence of camphor odor are characteristic of *C. mycophilum* Type II. Prochloraz, which is the most common alternative to benzimidazole fungicides, inhibited the growth of two strains only. Investigation of the influence of these fungicides on micromorphology of *C. mycophilum* demonstrated that benzimidazole fungicides and prochloraz do not inhibit sporulation. Metrafenone, a new highly selective fungicide, inhibited the growth of all strains. Only one strain had a low sensitivity to this fungicide. Metrafenone significantly changed the mycelium micromorphology of *C. mycophilum*: the average thickness of hyphae was reduced by half, with respect to control in a medium without fungicides; the cytoplasm contained numerous inclusions, while conidia and conidiophores were absent. Fluazinam inhibited the growth of all these strains. Hypertrophy of vegetative cells, enlarged deformed conidiophores and conidiogenous cells were observed on the medium with fluazinam. Numerous cells had large vacuoles that occupy up to 70% of the cells. Fluazinam, like metrafenone, completely blocked sporulation of *C. mycophilum*.

Keywords: *Agaricus bisporus*, benzimidazole fungicides, cobweb disease, fluazinam, metrafenone, prochloraz

Медведєв Д. Г., Кернер А. О., Бондарук С. В., Аль-Маалі Г. А. 2019. Дослідження культуральних особливостей та фунгіцидної резистентності штамів *Cladobotryum mycophilum* (*Hypocreales*, *Ascomycota*) — вперше виявленого на промислових культурах печериці в Україні збудника павутинної цвіль. *Український ботанічний журнал*, 76(2): 121–131.

Резюме. Вперше в грибних господарствах України було виявлено *Cladobotryum mycophilum*, збудника павутинної цвіль — небезпечної хвороби *Agaricus bisporus*. Вивчено характеристики росту та морфологічні ознаки п'яти штамів *C. mycophilum* на стандартних живильних середовищах різного складу. Особливу увагу було приділено визначенню чутливості штамів до фунгіцидів з різними активними речовинами: карбендазім і беномил (бензімідазольні фунгіциди), флуазинам, метрафенон і прохлораз. У дослідженні використовували концентрації, рекомендовані виробниками для застосування на грибних фермах. Виявлено, що всі досліджені штами були стійкими до карбендазіму; до беномилу один мав високу чутливість, два — дуже низьку чутливість і два — були стійкими. Стійкість до бензімідазольних фунгіцидів і відсутність запаху камфори, відмічені у всіх досліджених штамів, визначають їхню приналежність до *C. mycophilum* Type II. Прохлораз, який є найпоширенішою альтернативою бензімідазольним фунгіцидам, пригнічував зростання лише двох штамів. Дослідження впливу цих фунгіцидів на мікроморфологію *C. mycophilum* виявило, що бензімідазольні фунгіциди й прохлораз не пригнічують споруляції. Метрафенон пригнічував ріст всіх штамів, й тільки один штам мав низьку чутливість до нього. Метрафенон суттєво змінював мікроморфологію міцелію *C. mycophilum*: середня товщина гіф зменшувалася вдвічі по відношенню до контролю, окремі гіфи містили численні гранули, конідії й конідиносці не утворювались. Флуазинам пригнічував ріст всіх досліджених штамів. На середовищі з флуазинамом спостерігалася гіпертрофія вегетативних клітин, збільшені й деформовані конідиносці та конідіогенні клітини; багато клітин мали великі вакуолі, які займали до 70% простору клітини. Флуазинам, як і метрафенон, повністю блокував спорування в *C. mycophilum*.

Ключові слова: *Agaricus bisporus*, бензімідазольні фунгіциди, метрафенон, павутинна цвіль, прохлораз, флуазинам

© 2019 Д. Г. Медведєв, А. О. Кернер, С. В. Бондарук, Г. А. Аль-Маалі

Вступ

Agaricus bisporus (J.E.Lange) Imdach — один з найбільш поширених культивованих видів їстівних грибів у світі. Загалом, кілька мікофільних видів грибів з родів *Hypomyces* (Fr.) Tul. & C.Tul., *Verticillium* Nees, *Trichoderma* Pers., *Neurospora* Shear & B.O.Dodge та *Penicillium* Link у процесі розвитку в компості або на поверхні карпофорів викликають різні захворювання печериці при промисловому виробництві (Fletcher, Gaze, 2007). Численні види роду *Hypomyces*, що утворюють анаморфи роду *Cladobotryum* Nees, уражують *A. bisporus* та викликають хворобу, відому як павутинна цвіль. Починаючи з середини 1990-х років види роду *Cladobotryum* перестали бути рідкісними збудниками захворювань печериць, а хвороба, викликана цими збудниками, набула характеру епідемії (Fletcher, Gaze, 2007; Carrasco et al., 2017). Наразі види роду *Cladobotryum* спричиняють значні збитки в умовах промислового виробництва *A. bisporus*. Втрати врожаю печериць в різних країнах становлять 28–40% (Seth, Dar, 1989; Bhatt, Singh, 1992; Ozaktan, Bora, 2000; Adie et al., 2006; Carrasco et al., 2017). Історично склалось, що павутинна цвіль у першу чергу асоціюється з *C. dendroides* (Bull.) W.Gams & Hooz., проте, на сьогодні накопичились відомості про те, що *C. varium* Nees, *C. multiseptatum* de Hoog, *C. verticillatum* (Link) S.Hughes та особливо *C. mycophilum* (Oudem.) W. Gams & Hooz. також є збудниками цієї хвороби, як в *A. bisporus*, так і в інших широко культивованих видів їстівних грибів (Carrasco et al., 2017).

Упродовж багатьох років вважали, що збудником павутинної цвилі на карпофорах *A. bisporus* в умовах грибних господарств на території України є *Cladobotryum dendroides* (= *Dactylium dendroides* (Bull.) Fr.). Проте існують численні свідчення, що протягом останніх 20 років ситуація в різних країнах світу докорінно змінилась, і основним патогеном, що викликає це захворювання, виявився інший вид — *C. mycophilum*. Так, Гарет МакКай зі співавторами (McKay et al., 1999) за допомогою молекулярних маркерів проаналізували 34 штами, які були попередньо визначені як *C. dendroides*. Вони були зібрані дослідниками в грибних господарствах Ірландії, Великої Британії, Бельгії, Нідерландів, Люксембургу, Німеччини, Канади, США та депоновані в національні колекції культур мікопатогенних грибів. У результаті молекулярно-

генетичного дослідження, проведеного авторами, було встановлено, що лише три штами з цього списку насправді належать до *C. dendroides*, а 31 штамп перевизначено як *C. mycophilum* (McKay et al., 1999). Схожа ситуація з поширенням *C. mycophilum* виявилась і в інших країнах. Так, вчені з Кореї та Іспанії у двох незалежних дослідженнях встановили, що основним збудником, який викликає павутинну цвіль у цих країнах, є саме *C. mycophilum*, а не *C. dendroides*, як вважалося раніше (Back et al., 2010, 2012; Gea et al., 2011). Зазначимо, що подібні помилкові визначення, можливо, пов'язані з кількома причинами: по-перше, цівиди мають однакову морфологію колоній та не відрізняються за розміром та формою конідій (проте мають різний спосіб утворення конідій); по-друге, авторитетні дослідники роду *Cladobotryum* відмічали, що *C. mycophilum* не асоційований з *A. bisporus* (Rogerson, Samuels, 1994).

Зазначимо, що поширення *C. mycophilum*, яке супроводжується скороченням частоти трапляння *C. dendroides* у грибних господарствах, з великою вірогідністю пов'язано з широким використанням бензімідазольних фунгіцидів (McKay et al., 1999).

Враховуючи вищевикладене, нами були поставлені такі цілі: дослідити поширення *C. mycophilum* у спеціалізованих господарствах України з вирощування печериць, з'ясувати культуральні особливості досліджуваних ізолятів *C. mycophilum* на різних живильних середовищах та встановити стійкість штамів *C. mycophilum* до різних фунгіцидів.

Матеріали та методи

Боляція та визначення чистих культур. Уражені павутинною цвиллю плоди тіла *A. bisporus* були зібрані впродовж 2016–2017 рр. у п'яти спеціалізованих промислових господарствах із вирощування печериць у різних областях України (табл. 1). У лабораторних умовах з цих плодів тіл відокремлювали частини тканини з ознаками ураження *Cladobotryum* spp. та переносили їх на стерильне живильне середовище МЕА (мальць екстракт агар) з антибіотиком. Інкубацію чашок Петрі проводили при температурі 18 ± 1 °C упродовж 3–4 діб до появи міцелію з характерними для *Cladobotryum* spp. ознаками. Отриману чисту культуру переносили на середовище МЕА (Pronadisa, Іспанія) для подальшої ідентифікації (de Hoog, 1978; Rogerson, Samuels, 1994; Tammi, Põldmaa, 2013). Мікроскопічні дослідження

Ukrainian Botanical Journal, 2019, 76(2)

Таблиця 1. Місця та дати відбору матеріалу для ізоляції чистих культур різних штамів *Cladobotryum mycophilum*
Table 1. Places and dates of material selection for the isolation of pure cultures of various strains of *Cladobotryum mycophilum*

Штам	Місця розташування промислових господарств	Дата відбору матеріалу
№ 4	м. Маріуполь, Донецька обл.	23.06.2016
№ 6	м. Суми	03.05.2017
№ 7	с. Довгинське, Запорізька обл.	23.05.2017
№ 8	с. Олександрівка-Калинове, Донецька обл.	17.07.2017
№ 10	с. Сергіївка, Запорізька обл.	15.09.2017

здійснювали на світловому мікроскопі марки Zeiss (Німеччина). Мікропрепарати готували в 3%-му розчині КОН. Культури грибів роду *Cladobotryum*, ідентифіковані як *C. mycophilum*, використовували в подальшому дослідженні.

У дослідженнях з визначення характерних для окремих штамів морфологічних ознак та швидкості росту цих штамів використовували такі середовища: 1) глюкозо-пептон-дріжджовий агар (ГПДА), г/л: глюкоза – 25, дріжджовий екстракт – 3, пептон – 3, K_2HPO_4 – 1, KH_2PO_4 – 1, $MgSO_4 \times 7H_2O$ – 0,25, агар – 20; 2) MEA (Pronadisa, Іспанія); 3) Чапека (Bioline Italiana S.r.l., Італія). Культивування міцелію проводили при $25 \pm 1^\circ C$.

Швидкість росту вимірювали за формулою (Bisko et al., 2012):

$$V = (R_2 - R_1) / (t_2 - t_1),$$

де V – швидкість росту, мм/доба; R_1 – радіус колонії на час t_1 ; R_2 – радіус колонії на час t_2 .

Чутливість до фунгіцидів. У дослідженні використовували найбільш поширені у вітчизняному грибовидстві фунгіцидні препарати – флуазинам, метрафенон, карбендазім, прохлораз та беноміл, основні характеристики яких представлені в табл. 2. Для визначення чутливості ізолятів до фунгіцидів використовували ГПДА-

середовище, що обумовлено високою швидкістю росту на ньому всіх досліджених штамів. Вивчення стійкості різних штамів *C. mycophilum* до фунгіцидів вивчали за допомогою модифікованого дифузійно-го методу. Блоки з фунгіцидами виготовляли шляхом агаризації стерильного розчину препарату; з полімеризованого таким чином середовища стерильно вирізали блоки діаметром 5 мм і висотою 3 мм. Вміст фунгіцидів у блоках дорівнював максимальній дозі, рекомендованій для виробництва печериць (табл. 2). Блоки з фунгіцидом розміщували на поверхні ГПДА-середовища на відстані 20–25 мм від інокулюма досліджуваного штаму. В одній чашці розміщували не більше двох блоків з одним препаратом. Інокуляцію проводили, використовуючи споровий матеріал, який наносили на задану точку на поверхні агаризованого середовища методом проколу. Культивування проводили при $25 \pm 1^\circ C$. Зону інгібування вимірювали на момент повного припинення росту міцелію, що для всіх штамів відбувалося на 7 добу культивування. В зв'язку з тим, що зона інгібування не завжди мала правильну округлу форму, її розміри обчислювали за площею (cm^2), застосовуючи програми ImageJ. Штам вважали чутливим, якщо середнє значення зони інгібування було понад $2\ cm^2$ (що відповідає середньому діаметру зони 16 мм); помірно стійким – якщо вона була більшою за $1,5\ cm^2$ і меншою, ніж $2\ cm^2$ (що відповідає діапазону діаметрів 14–16 мм); якщо розмір зони не перевищував $1,5\ cm^2$ (діаметр менше 14 мм), штам вважали стійким до відповідного фунгіциду. Зону інгібування визначали як таку, в якій не спостерігалось жодних ознак росту міцелію. Зону пригнічення визначали як таку при наявності зміненої, по відношенню до контролю, морфології колонії.

Таблиця 2. Характеристики використаних у дослідженні фунгіцидів

Table 2. Characteristics of fungicides used in the study

Характеристики	Фунгіцид (активна речовина)				
	флуазинам	метрафенон	прохлораз	карбендазім	беноміл
Комерційна назва	Ширлан	Флексіті	Споргон	Дерозал	Фундазол
Виробник	Syngenta, Швейцарія	BASF, Німеччина	BASF, Німеччина	Bayar, Німеччина	Agro-Chemie Ltd, Угорщина
Препаративна форма	суспензія	суспензія	порошок	суспензія	порошок
Тип діючої речовини	арілоамінопіридин	бензофенон	імідазол	бензимидазол	
Вміст діючої речовини	500 г/л	300 г/л	450 г/кг	500 г/л	500 г/кг
Рекомендована доза фунгіциду*	0,125 г/л	0,9 г/л	1,35 г/л	1,5 г/л	1,5 г/л

*Рекомендована виробником доза для застосування в грибовидстві подана в перерахунку на діючу речовину

У випадках, коли фіксували інгібуючу дію фунгіцидів на ріст *C. mycophilum*, проводили додаткові дослідження впливу фунгіцидів на мікоморфологію. В зазначеному експерименті фунгіциди в максимальних рекомендованих дозах додавали безпосередньо до ГПДА-середовища, використовуючи фільтри для стерильної фільтрації з розміром пор 0,2 мкм (Filtres FIORONI, Китай). Фунгіциди додавали в розплавлене (50 °C) агаризоване середовище та швидко розливали по чашках Петрі з метою уникнення термічного розкладу препарату. Культивували досліджувані штами грибів на середовищах з фунгіцидами при 25 ± 1 °C.

Всі досліди проводили у 3–6 повторностях, статистичну обробку даних – у програмі *Statistica 10*.

Результати та обговорення

Усі п'ять відібраних штамів збудника павутинної цвілі були нами ідентифіковані як такі, що належать до виду *C. mycophilum*. Всі штами мали характерні для зазначеного виду ознаки (de Hoog, 1978; Rogerson, Samuels, 1994), а саме: колонії на МЕА-середовищі швидко-ростучі, широкорозпростерті, міцелій рясний, бавовняний, реверзум колонії забарвлений у рожевий та червоний кольори. Конідієносці довгі нерозгалужені, нерівномірно розгалужені або вертицилятно розгалужені; конідіогенні клітини довжиною 30–37 мкм, шириною 3,5–5,3 мкм. Конідії 15–32 × 5–7 мкм циліндричні або еліпсоїдні несептовані, або мають одну–дві перетинки. Характерною ознакою *C. mycophilum*, що відрізняє його від подібного *C. dendroides*, є ретрогресивний конідіогенез і наявність спор із широким базальним рубцем (Tamm, Põldmaa, 2013).

Раніше повідомлялося про знаходження на території України цього виду на плодових тілах *Pleurotus* sp., *Inocybe geophylla* (Fr.) P.Kumm. та на рештках неідентифікованих базидієвих грибів з території Харківської області (Prylutskyi et al., 2017). Проте ці знахідки були зроблені у природних екосистемах. Зазначимо, що дотепер не повідомлялося про поширення даного мікопатогена в спеціалізованих господарствах України з вирощування печериць, однак, враховуючи його глобальне поширення в грибних господарствах у світі, цього слід було очікувати.

Підприємства з вирощування печериць обстежувались упродовж усього року, але всі виявлені

штами *C. mycophilum* виділені з уражених карпофторів *A. bisporus*, які були зібрані лише у травні–вересні, що свідчить про приуроченість розвитку *C. mycophilum* до теплих місяців. Це підтверджують літературні дані, в яких зазначається, що тепла й волога погода стимулює розвиток павутинної цвілі в господарствах з вирощування печериць (Vedder, 1978).

Характеристика росту та морфології колоній на стандартних живильних середовищах. Усі досліджені штами *C. mycophilum* мали неоднакову швидкість росту на живильних середовищах різного складу (рис. 1). Всі штами *C. mycophilum* мали високу швидкість росту на середовищі ГПДА: від 14 мм на добу (штам № 7) до 20 мм (штам № 10). Три штами № 6, 7 та 8 мали однакову (у межах статистичної похибки) швидкість росту на середовищах ГПДА та МЕА. В цілому швидкість росту штамів *C. mycophilum* на середовищі МЕА повністю відповідала значенням, що були отримані іншими дослідниками за аналогічних умов (Grogan, 2000).

Більшість штамів на середовищі Чапека росли значно повільніше, ніж на інших середовищах. Виключенням був штам № 7, швидкість росту якого на цьому середовищі дорівнювала швидкості росту на МЕА.

Суттєвою була й різниця в морфології колоній на різних середовищах. Міцелій *C. mycophilum* на ГПДА-середовищі відрізнявся високою щільністю, а повітряний міцелій мав характерну неоднорідну структуру, сформовану пучками високих розгалужених конідієносців. Колонії всіх штамів на зазначеному середовищі були забарвлені в жовто-солом'яний колір, за винятком краю, який був білим. Жовте забарвлення міцелію з'являлося на 4–5 добу культивування. Реверзум колонії на 3–4 добу набував яскраво-жовтого забарвлення, яке згодом змінювалось на коричневе, а на 6–7 добу – на яскраво-рожеве та червоне.

На середовищі МЕА міцелій всіх штамів був білий або кольору слонової кістки та мав неоднорідну структуру з вираженою радіальною концентричністю. Реверзум колонії на 3–5 добу набував яскраво-жовтого кольору, а на 7–9 добу – рожевого та червоного. Зазначимо, що на відміну від ГПДА-середовища, рожевий колір на МЕА-середовищі був значно світлішим, власне забарвлення реверзumu рожевим пігментом було нерівномірним, а проміжна стадія, на якому

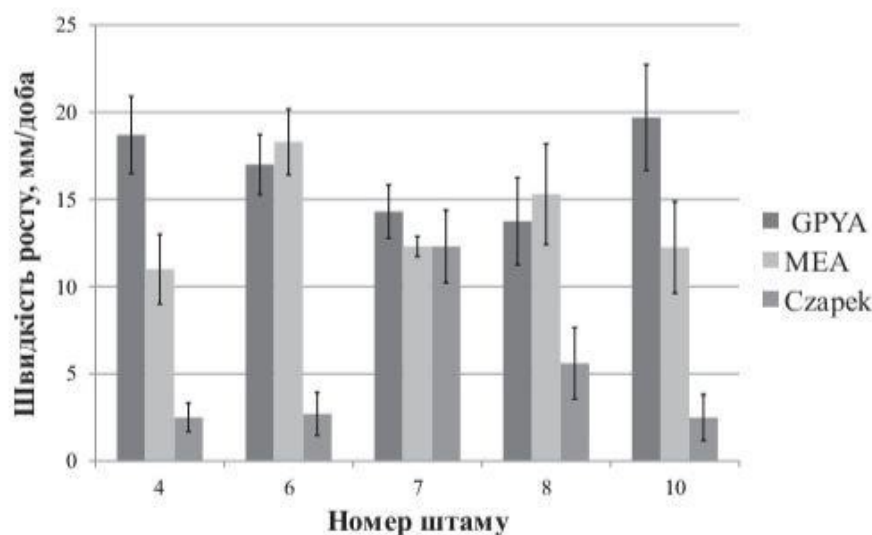


Рис. 1. Швидкість росту штамів *Cladobotryum mycophilum* на різних живильних середовищах: GPYA (ГПДА – глюкозо-пептон-дріжджовий агар), MEA (малець екстракт агар) та Czapek (середовище Чапека) ($\bar{x} \pm SE$)

Fig. 1. Growth rate of *Cladobotryum mycophilum* strains on different nutrient media: GPYA (glucose-peptone-yeast agar), MEA (malt extract agar) та Czapek (Czapek medium) ($\bar{x} \pm SE$)

реверзум мав коричневе забарвлення, на MEA-середовищі була відсутня.

На середовищі Чапека міцелій всіх штамів без виключення був набагато менш щільним, ніж на середовищах ГПДА та MEA. Міцелій всіх штамів мав білий колір, крім штаму № 4, який був солом'яного кольору. Пігментація реверзumu в різних штамів мала індивідуальні риси. Реверзум колонії штаму № 4 на 3 добу був жовтим, а на 5 добу мав темно-зелене забарвлення, яке поширювалось від центру по мірі культивування, при цьому зона росту колонії залишалась жовтою. У штамів № 6, 8 та 10 жовтий колір з'являвся на 5 добу експерименту. В цих штамів реверзум залишався жовтим упродовж всього періоду культивування. Край реверзumu штаму № 7 на 3 добу культивування набував темно-зелено-коричневого кольору, на наступну добу в центрі колонії з'являлося рожеве забарвлення. Наприкінці культивування реверзум колонії зазначеного штаму мав концентричні зони, забарвлені в рожевий, жовтий та оливково-зелений кольори.

Отримані результати свідчать про те, що кожен штам *C. mycophilum* має індивідуальні біологічні особливості, які проявляються в морфології колонії

та швидкості росту на живильних середовищах з неорганічним та органічним джерелами азоту.

Стійкість до фунгіцидів. Факт виявлення в грибних господарствах України нового мікопатогенного гриба *C. mycophilum* гостро ставить питання про використання й підбір оптимальних фунгіцидів для боротьби з ним та стримування поширення інфекції на сусідні господарства. Основні заходи боротьби з павутинною цвілью були розроблені ще в 1980-х рр. і спрямовані в першу чергу на боротьбу з найбільш поширеним у той час *C. dendroides* (Fletcher et al., 1986). Основними рекомендованими фунгіцидами були препарати бензimidазольної природи. Хоча багато досліджень прямо вказує на те, що значна кількість штамів *C. mycophilum* мають резистентність до цих сполук (McKay et al., 1999), частина новітніх видань, призначених для технологів грибних господарств (Fletcher, Gaze, 2007), та ряд наукових досліджень, присвячених фунгіцидній резистентності *C. mycophilum* (Kim et al., 2014), рекомендують бензimidазольні фунгіциди для боротьби з павутинною цвілью, збудником якої є цей гриб. Наукові відомості свідчать про наявність у грибних господарствах світу штамів *C. mycophilum* з різною стійкістю

Таблиця 3. Вплив фунгіцидів на ріст штамів *Cladobotryum mycophilum* у дослідях *in vitro* на ГПДА-середовищі ($x \pm SE$)
Table 3. Influence of fungicides on growth of *Cladobotryum mycophilum* strains *in vitro* on GPYA-medium ($x \pm SE$)

Номер штаму	Зона інгібування росту міцелію, см ²				
	флуазинам	метрафенон	прохлораз	карбендазім	беномил
№ 4	6,87 $\pm$ 1,16 ^ч	4,65 $\pm$ 1,41 ^ч	0 ^с	0 ^с	0 ^с
№ 6	4,31 $\pm$ 1,0 ^ч	16,68 $\pm$ 2,3 ^ч	0 ^с	0 ^с	0 ^с
№ 7	10,20 $\pm$ 2,13 ^ч	1,71 $\pm$ 0,23 ^{пс}	0 ^с	0 ^с	2,49 $\pm$ 0,37 ^{пс}
№ 8	6,87 $\pm$ 1,54 ^ч	8,34 $\pm$ 1,76 ^ч	19,86 $\pm$ 2,2 ^ч	0 ^с	2,1 $\pm$ 0,35 ^{пс}
№ 10	7,12 $\pm$ 1,91 ^ч	15,66 $\pm$ 1,9 ^ч	45,45 $\pm$ 3,7 ^ч	0 ^с	9,27 $\pm$ 2,4 ^ч

ч – чутливий до відповідного фунгіциду штаму; пс – помірно стійкий до відповідного фунгіциду штаму; с – стійкий до відповідного фунгіциду штаму.

до фунгіцидів, що прямо вказує на необхідність дослідження їхньої резистентності в Україні.

При дослідженні стійкості до фунгіцидів штамів *C. mycophilum*, виділених в українських грибних господарствах, нами були використані фунгіциди як бензімідазольного ряду (карбендазім та беномил), так і фунгіциди іншої хімічної природи (флуазинам, метрафенон, прохлораз), що широко застосовуються у вітчизняній грибній індустрії. Дію всіх фунгіцидів вивчали при максимальній концентрації, рекомендованій виробникам. Обрання такої моделі дослідження обґрунтовується особливостями використання фунгіцидів у господарствах. Як показують наші власні спостереження, виробники грибів застосовують фунгіцидні препарати саме у найвищих дозволених концентраціях з метою зниження ризиків прояву стійкості до менших концентрацій препарату. Отже, якщо досліджений фунгіцид не ефективний за максимальної концентрації, то вивчення дії більш високих доз не є доцільним, оскільки використання таких доз у грибному господарстві буде прямим порушенням санітарно-гігієнічних норм.

Результати дослідження стійкості різних штамів *C. mycophilum*, виявлених в українських грибних господарствах, представлені в табл. 3.

Бензімідазольні фунгіциди. В ході експерименту було з'ясовано, що всі досліджені штами виявилися стійкими до карбендазіму, який належить до бензімідазольних фунгіцидів. Другий використаний у дослідженні фунгіцид цього класу – беномил суттєво інгібував ріст лише штаму № 10, а ріст штамів № 7 та № 8 стримував значно менше. Проте навколо блоків з фунгіцидами (беномілом або карбендазімом) у всіх штамів спостерігали зону, яка характеризувалась незначними змінами у морфології колонії:

щільність міцелію була меншою, а реверзум колонії відповідної зони був світлим. Ці зони можна трактувати, як зони пригнічення. В цілому діаметр зазначених зон становив близько 6 мм.

Прохлораз інгібував ріст двох штамів – № 8 та № 10. Останній штаму виявився особливо чутливим до дії прохлоразу. Проте, відмітимо значні зміни в морфології міцелію у всіх штамів відносно контролю без фунгіцидів: загальна щільність колонії була значно меншою, висота повітряного міцелію нижчою, а реверзум колонії був забарвлений неоднорідно у жовті, рожеві та вохряні зони та плями. Зазначені зміни не були локалізовані біля джерела фунгіциду, а поширювались на всю колонію. Таким чином, можна констатувати, що прохлораз досить сильно пригнічує навіть ті штами *C. mycophilum*, ріст яких він не інгібує.

Найефективнішими фунгіцидами були **флуазинам та метрафенон**. Найвразливішим до дії флуазинаму виявився штаму № 7, найменш чутливим – штаму № 4. Особливою ознакою дії цього фунгіциду було формування перед зоною інгібування додаткової зони пригнічення. Розмір цієї зони в середньому становив 5 мм, і вона складалась із щільного, притиснутого до середовища міцелію, забарвленого у жовтий колір; реверзум, що відповідав зоні пригнічення, мав темно-коричневе забарвлення та виразно світлий край на стику із зоною інгібування.

Метрафенон інгібував ріст 4 штамів. Особливо чутливими були штами № 6 та № 10. Штаму № 7 був помірно стійким до дії цього фунгіциду. Міцелій на стику із зоною інгібування не формував чіткого краю з утворенням щільного міцелію, який ми спостерігали в досліді з флуазинамом, навпаки, ця зона складалась з білого ватоподібного повітряного міцелію.

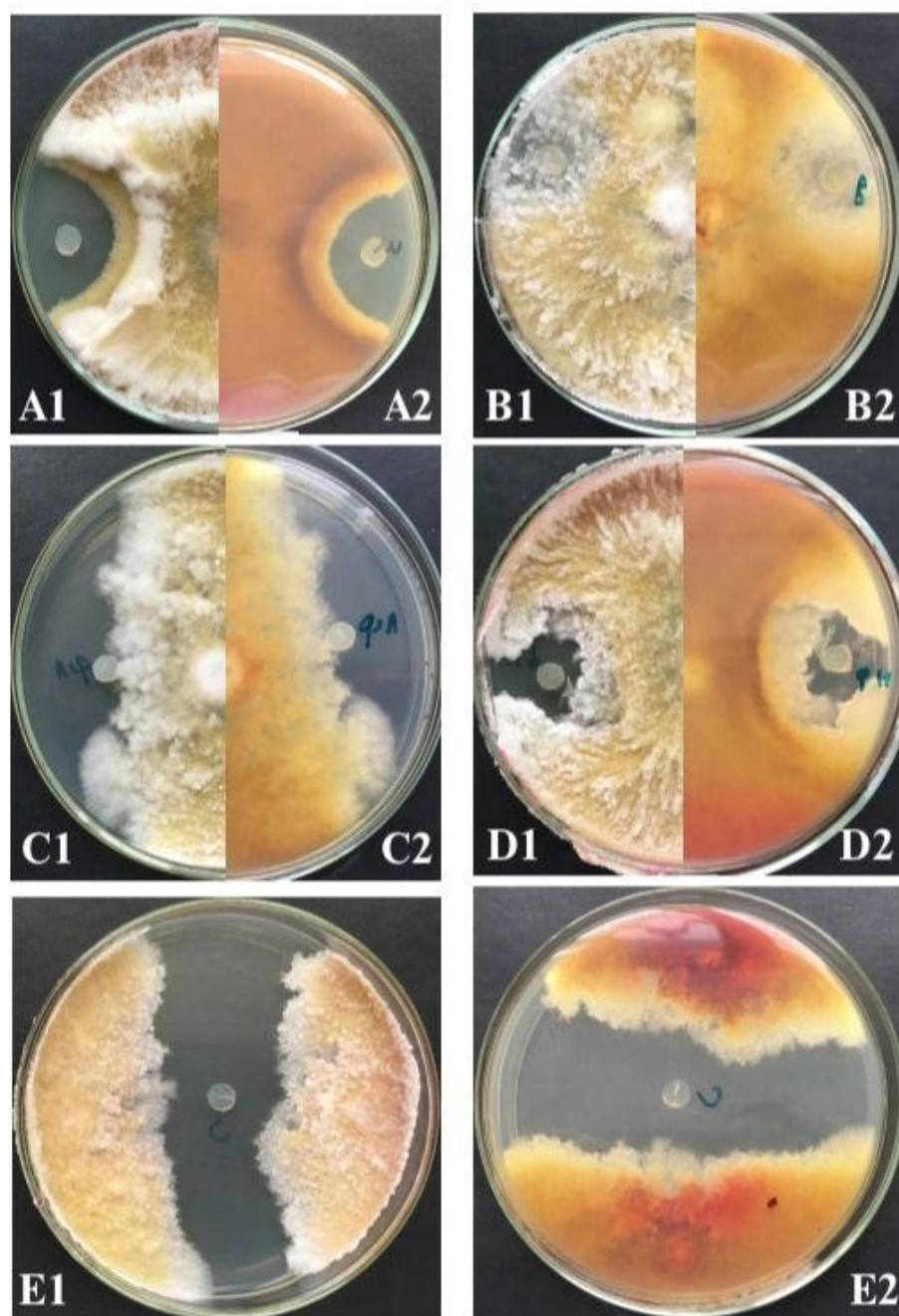


Рис. 2. Вплив різних фунгіцидів на ріст та морфологію колоній *Cladobotryum mycophilum*. А: флуазінам, штам № 6; тут і далі: 1 – загальний вид колонії; 2 – реверзум колонії; В: карбендазім, штам № 10; С: метрофенон, штам № 8; D: беномил, штам № 8; Е: прохлораз, штам № 8

Fig. 2. Influence of different fungicides on growth and morphology of *Cladobotryum mycophilum* colonies. A: fluzinam, strain No. 6; here and below: 1 – colony; 2 – reverse of the colony; B: carbendazim, strain No. 10; C: metrofenon, strain No. 8; D: benomyl, strain No. 8; E: prohloraz, strain No. 8

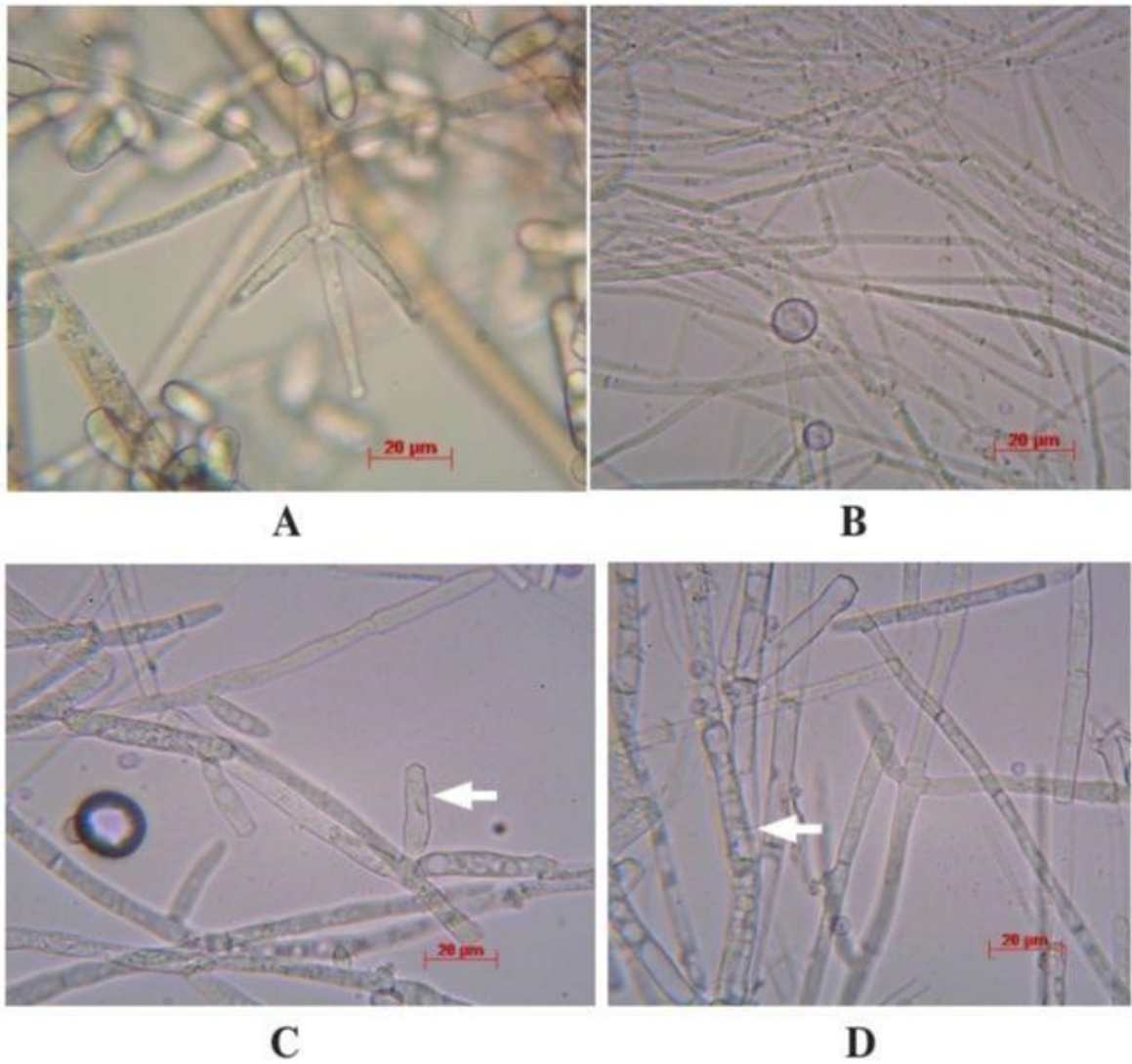


Рис. 3. Зміни у мікроморфології *Cladobotryum mycophilum* (штам № 10) під впливом фунгіцидів. А: контроль, без фунгіцидів; В: метрафенон; С та D: флуазінам. Стрілками позначено деформовані кондіогенні клітини (С) та вакуолізовані ділянки (D)

Fig. 3. Influence of different fungicides on micromorphology of *Cladobotryum mycophilum* (strain No. 10):

A: control trial without fungicides; B: metrafenone; C and D: fluzinam.

Arrows indicate deformed conidiogeneus cells (C) and vacuolized portions (D)

хоча виробники комерційних препаратів на основі флуазинаму рекомендують застосовувати його у грибовництві для захисту врожаю від мікопатогенних грибів, наукових публікацій з цього питання не існує. Проте, встановлена досить широка доказова база доцільності та безпечності використання цього фунгіциду в сільському господарстві для захисту зернових та овочевих культур від фітопатогенних грибів (Matheron, Porchas, 2004; Dai et al., 2018; Jeschke et al., 2019).

Нами показано, що за дії флуазинаму відбувалися суттєві зміни мікоморфологічних ознак міцелію штамів *C. mycophilum*. По-перше, це проявлялось у суттєвому збільшенні товщини гіф та утворенні великих вакуолізованих ділянок. По-друге, відбувалась деформація конідієносців, яку супроводжувала гіпертрофія спорозонних клітин. І по-третє, що дуже важливо, флуазинам повністю пригнічував спороутворення (рис. 3).

Висновки

Вперше в спеціалізованих господарствах України з вирощування печериць виявлено небезпечний мікопатогенний грибок *C. mycophilum*. Виявлено штамові особливості п'яти ізолятів *C. mycophilum* по відношенню до різних типів живильного середовища та п'яти різних фунгіцидів. Отримані експериментальним шляхом дані показали, що більшість виявлених штамів *C. mycophilum* стійкі до бензімідазолних фунгіцидів та прохлоразу, проте чутливі до флуазинаму та метрафенону. Два останніх фунгіциди суттєво інгібують ріст міцелію *C. mycophilum* та повністю пригнічують спороутворення. Вважаємо доцільним рекомендувати застосовувати метрафенон та флуазинам для боротьби з *C. mycophilum* у грибних господарствах України за умов почергової зміни препаратів з метою зниження вірогідності утворення резистентних до фунгіцидів штамів-збудників павутинної гнилі.

СПИСОК ПОСИЛАНЬ

Adie B., Grogan H., Archer S., Mills P. 2006. Temporal and spatial dispersal of *Cladobotryum* conidia in the controlled environment of a mushroom growing room. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(11): 7212–7217. <https://doi.org/10.1128/AEM.01369-06>

Back C.-G., Kim Y.-H., Jo W.-S., Chung H., Jung H.-Y. 2010. Cobweb disease on *Agaricus bisporus* caused by *Cladobotryum mycophilum* in Korea. *Journal of*

General Plant Pathology, 76(3): 232–235. <https://doi.org/10.1007/s10327-010-0236-3>

Back C.-G., Lee C.-Y., Seo G.-C., Jung H.-Y. 2012. Characterization of species of *Cladobotryum* which cause cobweb disease in edible mushrooms grown in Korea. *Mycobiology*, 40(3): 189–194. <https://doi.org/10.5941/MYCO.2012.40.3.189>

Bhatt N., Singh R.P. 1992. Cobweb disease of *Agaricus bisporus*: incidence, losses and effective management. *Indian Journal of Mycology and Plant Pathology*, 22(2): 178–181.

Bisko N.A., Babitskaya V.G., Buchalo A.S., Krupoderova T.A., Lomberg M.L., Mikchaylova O.B., Puchkova T.A., Solomko E.F., Shcherba V.V. 2012. *Biologicheskie osobennosti lekarstvennykh makromisetov v kulture: Sbornik nauchnykh trudov*, vol. 2. Ed. S.P. Wasser. Kiev, 459 pp. [Бисько Н.А., Бабицкая В.Г., Бухало А.С., Круподерова Т.А., Ломберг М.Л., Михайлова О.Б., Пучкова Т.А., Соломко Э.Ф., Щерба В.В. 2012. *Биологические особенности лекарственных макромицетов в культуре: Сб. науч. трудов*, т. 2. Ред С.П. Вассер. Киев, 459 с.]

Carrasco J., Navarro M.J., Santos M., Gea F.J. 2017. Effect of five fungicides with different modes of action on cobweb disease (*Cladobotryum mycophilum*) and mushroom yield. *Annals of Applied Biology*, 171(1): 62–69. <https://doi.org/10.1111/aab.12352>

Carrasco J., Navarro M.J., Gea F.J. 2017. Cobweb, a serious pathology in mushroom crops: a review. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 15: e10R01. <https://doi.org/10.5424/sjar/2017152-10143>

Chakwiya A., Van der Linde E.J., Korsten L. 2015. In vitro sensitivity testing of *Cladobotryum mycophilum* to carbendazim and prochloraz manganese. *South African Journal of Science*, 111(11–12): 1–7. <http://doi.org/10.17159/sajs.2015/20140408>

Dai Y., Gan L., Ruan H., Shi N., Du Y., Liao L., Wei Z., Teng Z., Chen F., Yang X. 2018. Sensitivity of *Cochliobolus heterostrophus* to three demethylation inhibitor fungicides, propiconazole, diniconazole and prochloraz, and their efficacy against southern corn leaf blight in Fujian province, China. *European Journal of Plant Pathology*, 152(2): 447–459. <https://doi.org/10.1007/s10658-018-1490-z>

de Hoog G.S. 1978. Notes on some fungicolous hyphomycetes and their relatives. *Persoonia-Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, 10(1): 33–81.

Fletcher J.T., White P.F., Gaze R.H. 1986. *Mushrooms pest and disease control*. Ponteland: Intercept, 156 pp.

Fletcher J.T., Gaze R.H. 2007. *Mushroom Pest and Disease Control: A Colour Handbook*. Boca Raton: CRC Press, 192 pp.

Gea F.J., Navarro M.J., Suz L.M. 2011. First report of *Cladobotryum mycophilum* causing cobweb on cultivated king oyster mushroom in Spain. *Plant Disease*, 95(8): 1030–1030. <https://doi.org/10.1094/PDIS-03-11-0255>

Grogan H.M. 2000. Fungicide resistance among *Cladobotryum* spp. – causal agents of cobweb disease of the edible mushroom *Agaricus bisporus*. *Mycological Research*, 104(3): 357–364. <http://doi.org/10.1017/S0953756299001197>



US 20090235579A1

(19) **United States**(12) **Patent Application Publication****Kim et al.**(10) **Pub. No.: US 2009/0235579 A1**(43) **Pub. Date: Sep. 24, 2009**(54) **METHOD OF CULTURING AGARICUS
BISPORUS MYCELIUM AND MEDIUM FOR
CULTURING THE SAME**(86) PCT No.: **PCT/KR2007/002555**§ 371 (c)(1),
(2), (4) Date: **Nov. 25, 2008**(75) Inventors: **Young-Duk Kim, Seoul (KR);
Yong-Hwi Kim, Seoul (KR)**(30) **Foreign Application Priority Data**

May 25, 2006 (KR) 10-2006-0047117

Publication Classification

Correspondence Address:

**CANTOR COLBURN, LLP
20 Church Street, 22nd Floor
Hartford, CT 06103 (US)**(51) **Int. Cl.**
A01G 1/04 (2006.01)(52) **U.S. Cl.** **47/1.1**(57) **ABSTRACT**

Provided are a method of culturing *Agaricus bisporus* mycelium, the method comprising culturing *Agaricus bisporus* mycelium or spores thereof in a liquid medium comprising sugar cane extract, and a medium for culturing the *Agaricus bisporus* mycelium.

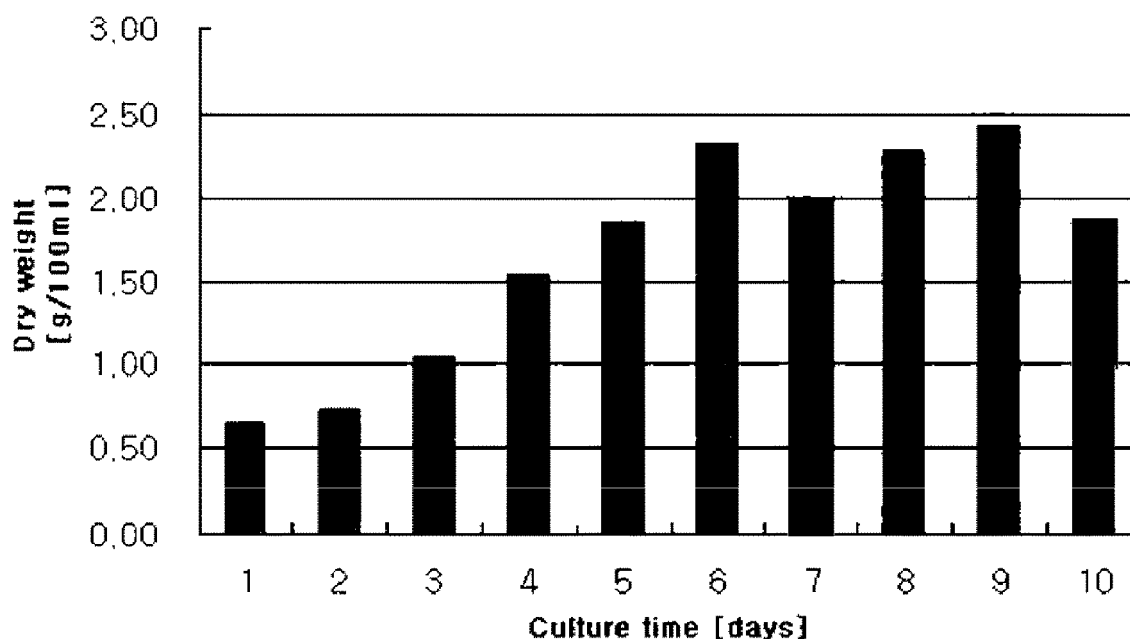
(73) Assignee: **CJ CORP., Seoul (KR)**(21) Appl. No.: **12/302,469**(22) PCT Filed: **May 25, 2007**

FIG. 1

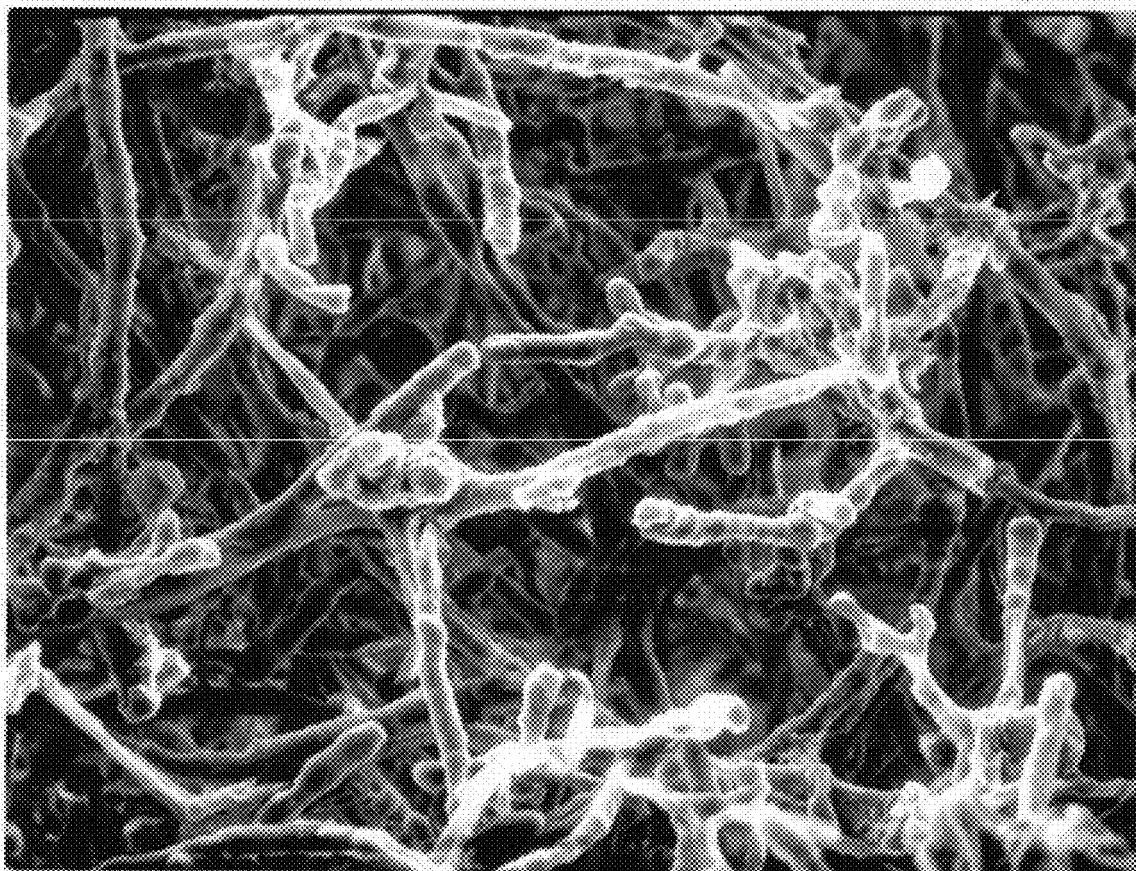


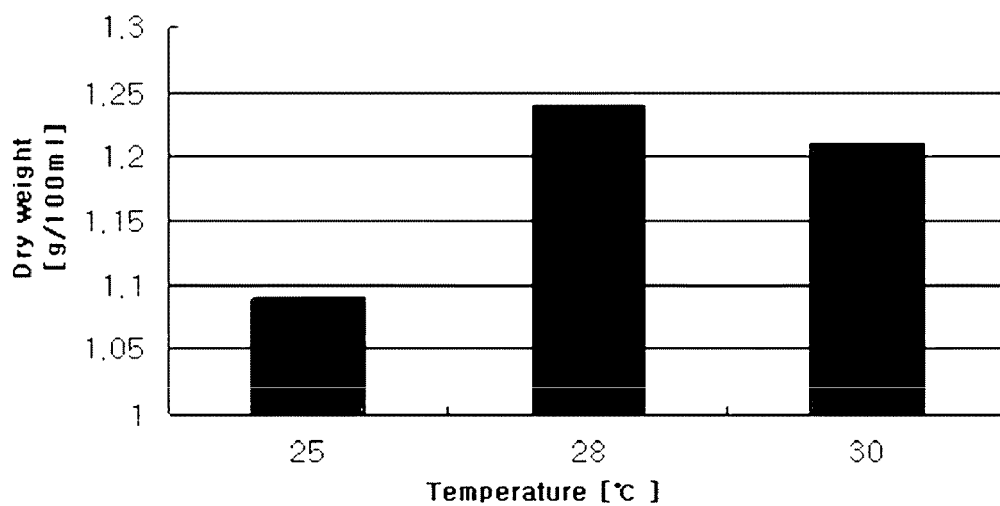
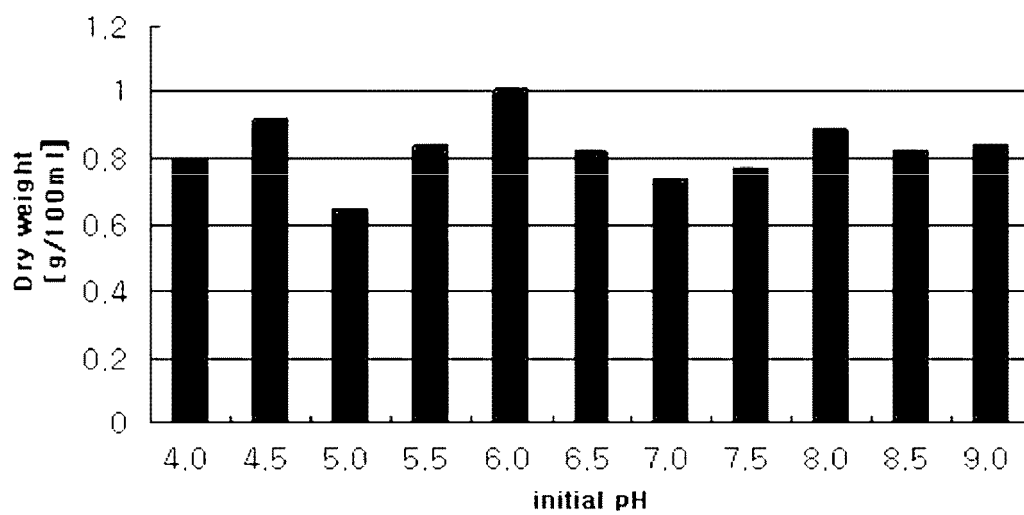
FIG. 2**FIG. 3**

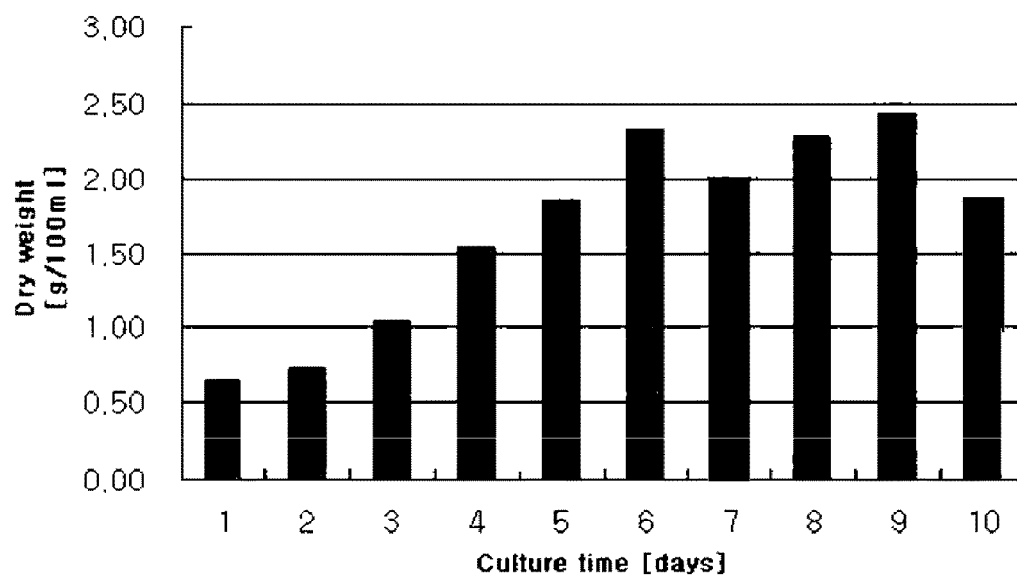
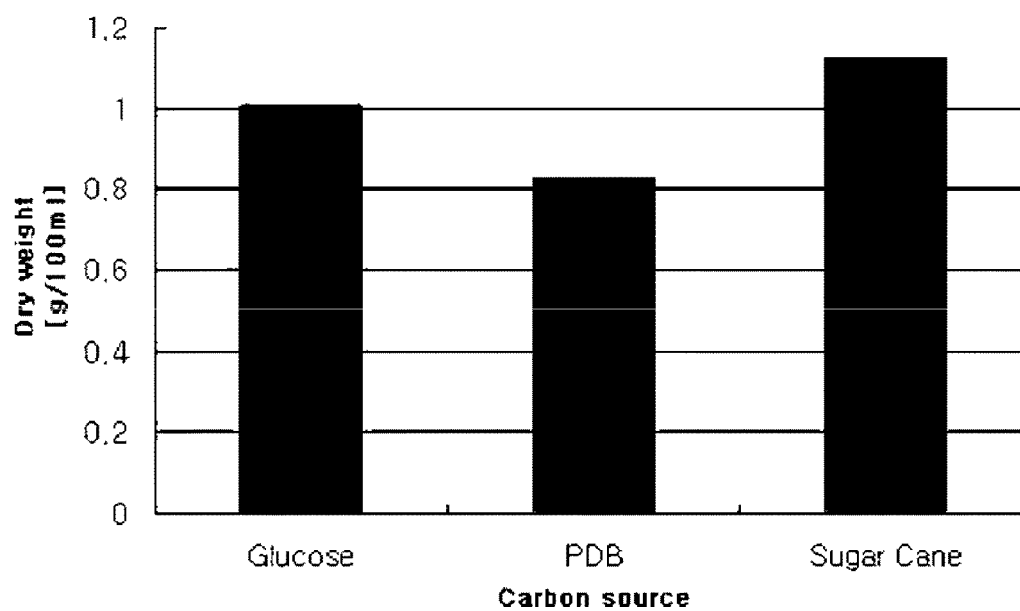
FIG. 4**FIG. 5**

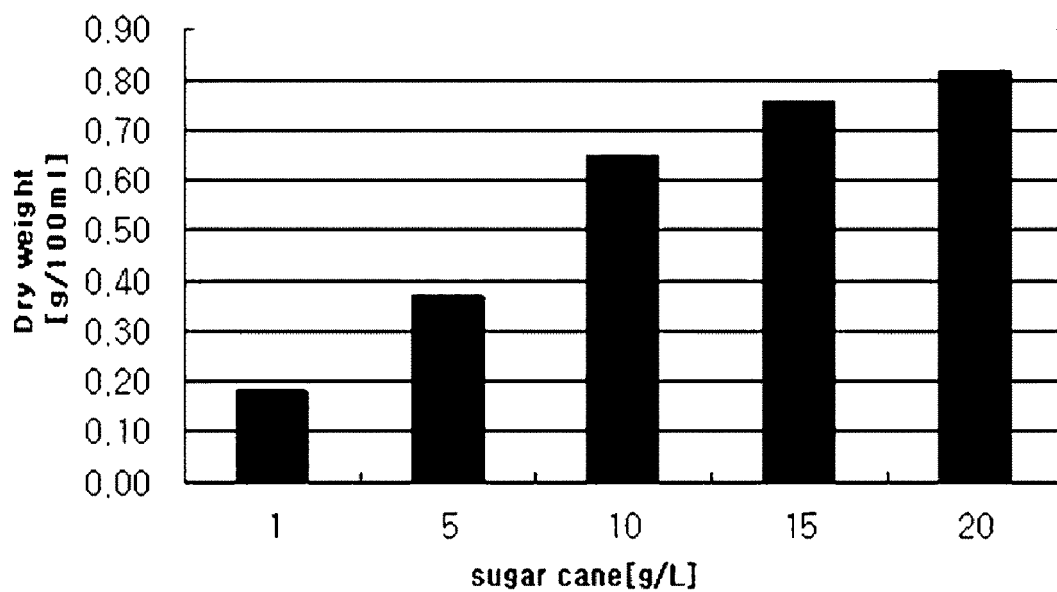
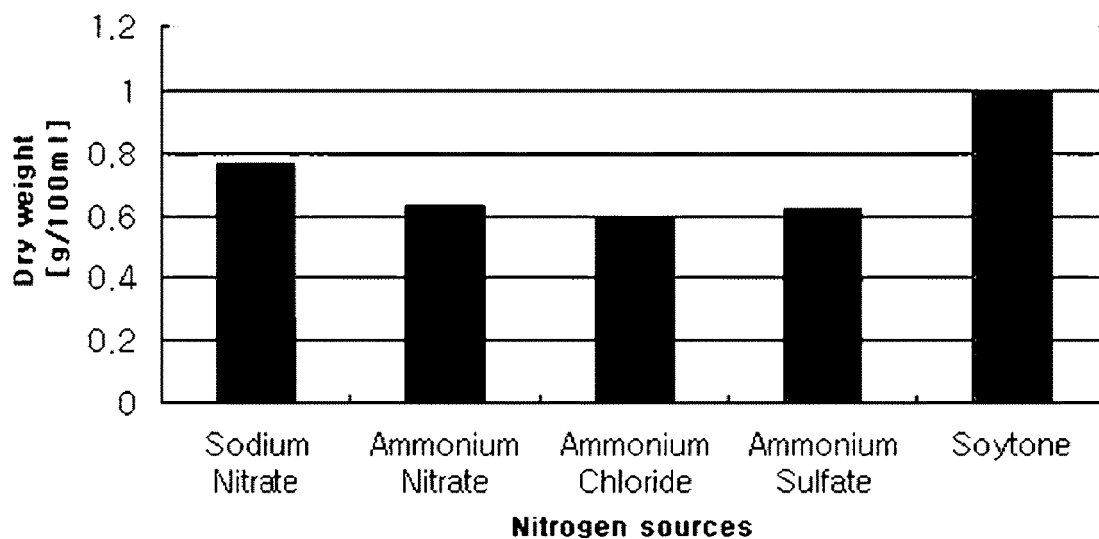
FIG. 6**FIG. 7**

FIG. 8

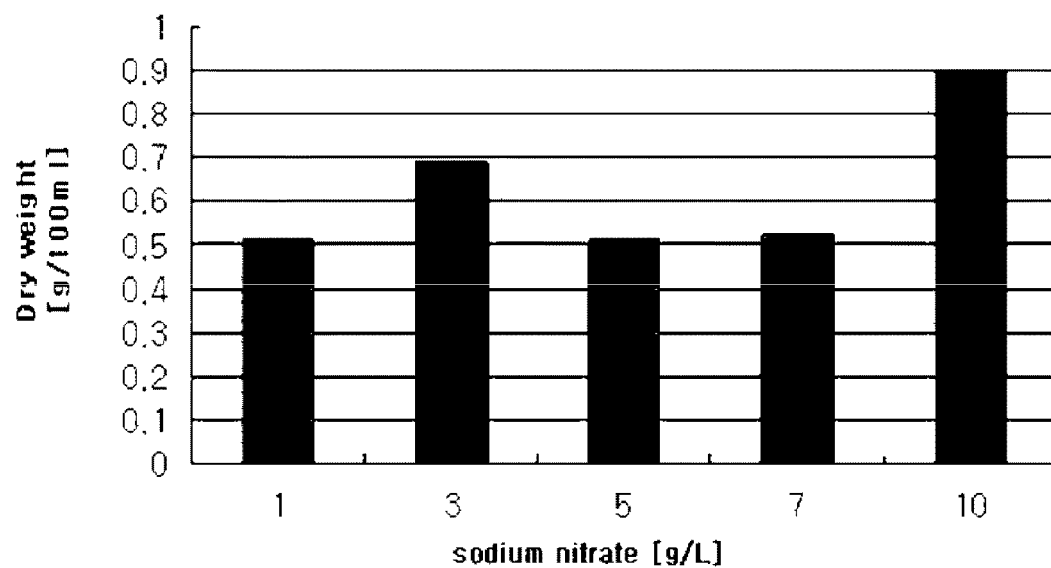
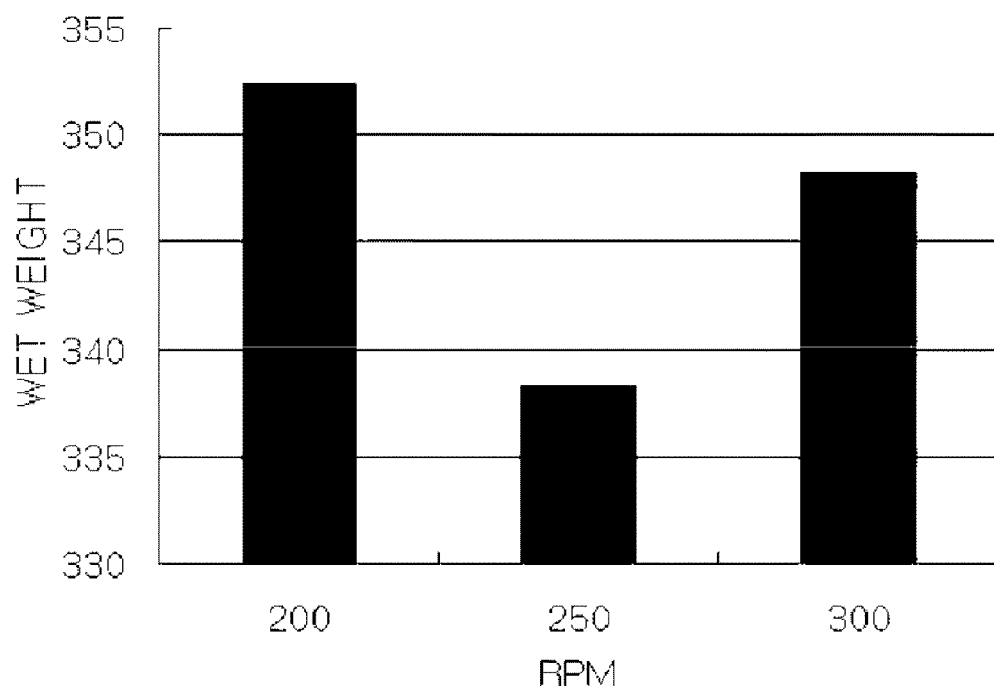


FIG. 9



METHOD OF CULTURING AGARICUS BISPORUS MYCELIUM AND MEDIUM FOR CULTURING THE SAME

TECHNICAL FIELD

[0001] The present invention relates to a method of liquid culturing *Agaricus bisporus* mycelium.

BACKGROUND ART

[0002] *Agaricus bisporus* is a mushroom that belongs to Agaricales Agaricaceae. As a conventional method of culturing *Agaricus bisporus* mycelium, a solid culture method and a liquid culture method have been known. The solid culture method has disadvantages in that a culture time is long, a probability of contamination is high, and it is difficult to automate an operation of recovering only mycelia after culture is terminated.

[0003] Compared to the solid culture method, the liquid culture method of *Agaricus bisporus* mycelium has advantages of a lower probability of contamination, and mass-cultivation in a relatively compact space for a short period of time. A paper written by Hunfeid et al. (Mycology 44: 605-611, 1952) discloses a method of liquid culturing *Agaricus bisporus* mycelium with shaking and oxygen supply. In addition, a paper written by Fraser et al. (Mushroom Sci. 3:190-200, 1956) describes that yeast extract and casein facilitate a growth of *Agaricus bisporus* mycelium. Also, Korean Patent Publication No. 1997-0027295 discloses a method of liquid culturing Basidiomycetes using at least one selected from the group consisting of sugar, maltose, fructose, glucose, sucrose, malt extract and starch syrup, as a carbon source. However, the liquid culture method has disadvantages in that a culture time is relatively long, and since monosaccharide and disaccharide are used, it has high costs, and is thereby not suitable for mass culture.

[0004] As seen in the prior art described above, there is still a need for developing a method of culturing *Agaricus bisporus* mycelium using medium components that are inexpensive to be suitable for mass culture and support high growth of mycelium to reduce the culture time and thus the contamination probability.

DISCLOSURE OF THE INVENTION

[0005] The present invention provides a method of efficiently culturing *Agaricus bisporus* mycelium.

[0006] The present invention also provides a medium for culturing *Agaricus bisporus* mycelium.

[0007] According to an aspect of the present invention, there is provided a method of culturing *Agaricus bisporus* mycelium, comprising culturing *Agaricus bisporus* mycelium or spores thereof in a liquid medium comprising sugar cane extract.

[0008] The sugar cane extract may have a concentration of 10-30 g/l. When the concentration of the sugar cane extract is less than 10 g/l, *Agaricus bisporus* mycelium does not grow enough. When the concentration of the sugar cane extract is greater than 30 g/l, an osmotic pressure is high and it is not cost-effective. Thus, the concentration is preferably in the range of 10-30 g/l. The sugar cane extract is mainly used as a carbon source and a growth factor source. The term "sugar cane extract" refers to unrefined extract sugar prepared by

extracting a juice and then concentrating and crystallizing the juice. The sugar cane extract can be directly prepared or commercially available.

[0009] The medium may further comprise nutrients such as a nitrogen source, phosphoric acid, trace elements and the like, in addition to the sugar cane extract. The nitrogen source may be an organic nitrogen or inorganic nitrogen, preferably soytone and sodium nitrate, and more preferably sodium nitrate. The sodium nitrate may have a concentration of 1-10 g/l in the medium. Sodium nitrate shows high absorption efficiency by *Agaricus bisporus* mycelium, is inexpensive, and maintains the pH of the medium constant while the pH of the medium changes when other ammonium-based nitrogen sources are used. When the concentration of sodium nitrate is less than 1 g/l, a nitrogen source required for the growth of *Agaricus bisporus* mycelium is deficient. When the concentration of sodium nitrate is greater than 10 g/l, it does not greatly affect the growth of *Agaricus bisporus* mycelium. Thus, it is preferred to use 1 g/l to 10 g/l sodium nitrate in the medium.

[0010] The medium may comprise a yeast extract at a concentration of 1-10 g/l.

[0011] The culturing of *Agaricus bisporus* mycelium may be conducted at an initial pH of the medium of 6.0 to 6.5, at a culture temperature of 25-28° C., while stirring at a stirring velocity of 150-250 rpm.

[0012] *Agaricus bisporus* mycelium may be dispersed using a blender before inoculation. While an inoculum is cultured, big agglomerates are formed with a growth of the mycelium, thereby making it difficult to supply oxygen. Therefore, to prevent this oxygen supply limitation, the mycelium is needed to be dispersed to small particles before inoculation.

[0013] The culturing of *Agaricus bisporus* mycelium may be conducted until a desired amount of mycelium is obtained. For example, a culture period may be generally 3-10 days, and preferably 3-6 days. According to an embodiment of the present invention, a culture period of 3-6 days is required to obtain a desired maximum yield of *Agaricus bisporus* mycelium. Therefore, a culture period of *Agaricus bisporus* mycelium according to the present invention can be much reduced, compared to the prior art in which a culture period of 14-15 days is required to obtain a desired maximum yield of *Agaricus bisporus* mycelium.

[0014] The culturing of *Agaricus bisporus* mycelium may further comprise pre-culturing the *Agaricus bisporus* mycelium or spores thereof in a liquid medium comprising potato dextrose broth of 15-25 g/l, yeast extract of 1-10 g/l, malt extract of 2-5 g/l, and soytone of 2-5 g/l.

[0015] Pre-culture refers to a preliminary culture to obtain mushroom seed culture from the primary strain before a main culturing of *Agaricus bisporus* mycelium is performed. Primary strain refers to a strain from which a seed culture is originated. Seed culture refers to a pure culture of the desired strain, i.e. primary strain, and an inoculum refers to a seed culture to be inoculated to a medium for proliferation.

[0016] The pre-culture may be conducted at an initial pH of 6.0 to 6.5, at a culture of temperature 25-28° C., and while stirring at a stirring velocity of 150-250 rpm. The obtained mycelium can be dispersed using a blender. During the pre-culture, big agglomerates may be formed due to a growth of the mycelium, and thereby oxygen supply may be limited. Therefore, to prevent this oxygen supply limitation, the mycelium is needed to be dispersed to small particles. The

pre-culture can be conducted until a desired amount of seed culture for proliferation is obtained, and the pre-culture generally requires 3-4 days.

[0017] The present invention also provides a medium for culturing *Agaricus bisporus* mycelium. The medium comprises sugar cane extract, and may preferably comprise the sugar cane extract in a concentration of 10-30 g/l. The medium may further comprise sodium nitrate as a nitrogen source. Preferably, the medium may comprise the sodium nitrate in a concentration of 1-10 g/l. In addition, the medium may further comprise a yeast extract in a concentration 1-10 g/l. The medium may have an initial pH of 6.0-6.5.

[0018] A medium according to an embodiment of the present invention may preferably comprise sugar cane extract in a concentration of 15-25 g/l and sodium nitrate in a concentration of 5-10 g/l, and more preferably further comprise a yeast extract in a concentration of 5-10 g/l.

[0019] The present invention also provides a medium for pre-culturing *Agaricus bisporus* mycelium or spores thereof, comprising a potato dextrose broth of 15-25 g/l, yeast extract of 1-10 g/l, malt extract of 2-5 g/l, and soytone of 2-5 g/l.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

[0020] The above and other features and advantages of the present invention will become more apparent by describing in detail exemplary embodiments thereof with reference to the attached drawings in which:

[0021] FIG. 1 is an electron microscopic image of *Agaricus bisporus* mycelium according to an embodiment of the present invention;

[0022] FIG. 2 illustrates the growth of *Agaricus bisporus* mycelium with respect to a culture temperature, according to an embodiment of the present invention;

[0023] FIG. 3 illustrates the growth of *Agaricus bisporus* mycelium with respect to an initial pH, according to an embodiment of the present invention;

[0024] FIG. 4 illustrates the growth of *Agaricus bisporus* mycelium with respect to a culture period, according to an embodiment of the present invention;

[0025] FIG. 5 illustrates the growth of *Agaricus bisporus* mycelium with respect to carbon source types in a medium, according to an embodiment of the present invention;

[0026] FIG. 6 illustrates the growth of *Agaricus bisporus* mycelium with respect to a concentration of sugar cane extract which is used as a carbon source, according to an embodiment of the present invention;

[0027] FIG. 7 illustrates the growth of *Agaricus bisporus* mycelium with respect to nitrogen source types in a medium, according to an embodiment of the present invention;

[0028] FIG. 8 illustrates the growth of *Agaricus bisporus* mycelium with respect to a concentration of sodium nitrate which is used as a nitrogen source, according to an embodiment of the present invention; and

[0029] FIG. 9 illustrates the growth of *Agaricus bisporus* mycelium with respect to a stirring velocity of a bioreactor, according to an embodiment of the present invention.

BEST MODE FOR CARRYING OUT THE INVENTION

[0030] Hereinafter, the present invention will be described more specifically with reference to the following Examples.

The following Examples are for illustrative purposes and are not intended to limit the scope of the invention.

EXAMPLE 1

Isolation of Strain and Preparation of Inoculum

[0031] A strain of *Agaricus bisporus* was obtained via tissue culture, and the obtained strain was cultured in a potato dextrose agar (PDA) at 25° C. for 3 weeks, and then the obtained *Agaricus bisporus* mycelium was stored at 4° C.

[0032] FIG. 1 is an electron microscopic image of *Agaricus bisporus* mycelium according to an embodiment of the present invention.

[0033] To prepare an inoculum using a solid culture, a part of the mycelium was separated from a center portion of a PDA plate medium that was refrigeration stored and inoculated into a solid medium, and then cultured in a thermostat at a temperature of 25° C. to obtain an inoculum. When an inoculum was prepared from *Agaricus bisporus* mycelium through a liquid culture, 100 ml of a PDBYMS medium comprising 20 g/l of potato dextrose broth (PDB), 10 g/l of yeast extract, 5 g/l of malt extract and 5 g/l of soytone was autoclaved in a 500 ml Erlenmeyer flask at 121° C. for 15 minutes, and then the mycelium was inoculated thereto and cultured at a stirring velocity of 200 rpm. In the following examples, a remaining portion of the medium besides particularly specified components was distilled water.

EXAMPLE 2

Seed Pre-culture

[0034] To examine optimum conditions for a seed pre-culture, mediums having compositions shown in Table 1 below were prepared. 100 ml of each of the prepared mediums was added to a 500 ml Erlenmeyer flask, and then autoclaved at 121° C. for 15 minutes. 1% (v/v) of a homogenized inoculum under sterile condition was then inoculated thereto, and cultured in a thermostat with a temperature of 25° C. with shaking at 200 rpm for 4 days. To measure the growth of the mycelium, the culture medium was filtered with a gauze, and separated at 1,500 rpm for 10 minutes using an ultracentrifuge, and then dried in a dry oven at a temperature of 60° C. for 24 hours to measure a dry weight of the mycelium.

TABLE 1

Experimental group	PDB(g/l)	Yeast extract (g/l)	Malt extract (g/l)	Soytone (g/l)	weight (g/100 ml)	Dry weight (g/100 ml)
P1	0	10	5	5	6.49	0.46
P2	5	10	5	5	7.50	0.65
P3	10	10	5	5	8.35	0.93
P4	15	10	5	5	7.65	1.01

[0035] As shown in Table 1, when the medium comprising 24 g/l of PDB, 10 g/l of yeast extract, 2-5 g/l of malt extract and 2-5 g/l of soytone was used, the growth of the mycelium is the highest.

[0036] Therefore, the medium comprising 24 g/l of PDB, 10 g/l of yeast extract, 5 g/l of malt extract and 5 g/l of soytone was used as a medium for pre-culturing of seed culture. In addition, as a basal medium of the culture used to set optimum culture conditions, a PDBYMS medium comprising 24 g/l of PDB, 10 g/l of yeast extract, 5 g/l of malt extract and 5 g/l of soytone was used.

[0037] Agglomerates formed as *Agaricus bisporus* mycelium grew in the pre-culture were dispersed using a blender before the main culture. The blender was a small mixer type as disclosed in Korean Patent Publication No. 1998-0072112.

EXAMPLE 3

Set Up Optimum Conditions of the Main Culture

[0038] 1. Optimum Temperature

[0039] To examine an optimum culture temperature for growing *Agaricus bisporus* mycelium, 100 ml of the basal medium was added to a 500 ml Erlenmeyer flask, and then autoclaved at 121° C. for 15 minutes. 1% (v/v) of a homogenized inoculum under sterile condition was then inoculated thereto, and cultured while shaking at 200 rpm in a thermostat at a temperature of 25° C. for 4 days to examine the growth of the mycelium. This process was repeated under the same conditions except the temperatures of 28° C. and then 30° C. were used.

[0040] FIG. 2 illustrates the growth of *Agaricus bisporus* mycelium with respect to a culture temperature, according to an embodiment of the present invention.

[0041] Referring to FIG. 2, the growth of the mycelium was excellent at 28° C. and 30° C., and particularly showed the highest value at 28° C.

[0042] 2. Optimum pH

[0043] To examine an optimum initial pH for growing *Agaricus bisporus* mycelium, 100 ml of the basal medium was added to a 500 ml Erlenmeyer flask at an initial pH of 4.0. The medium was then autoclaved at 121° C. for 15 minutes, and 1% (v/v) of a homogenized inoculum under sterile condition was inoculated thereto, and then cultured while shaking at 25° C. and at 200 rpm for 4 days to examine the growth of the mycelium. This process was repeated under the same conditions except that the pH was adjusted between 4.5 and 9.0 at increments of 0.5 using phosphoric acid and 50% of NaOH.

[0044] FIG. 3 illustrates the growth of *Agaricus bisporus* mycelium with respect to an initial pH, according to an embodiment of the present invention. Referring to FIG. 3, the growth of the mycelium was observed the highest at pH 6.0.

[0045] 3. Culture Period

[0046] To examine how a culture period affects the growth of *Agaricus bisporus* mycelium, 100 ml of the basal medium was added to each of 500 ml Erlenmeyer flasks, and then an initial pH was adjusted to 6.0-6.5. The medium was then autoclaved at 121° C. for 15 minutes, and 1% (v/v) of a homogenized inoculum under sterile condition was inoculated thereto, and then cultured while shaking at 25° C. and at 200 rpm for 10 days to examine the growth of the mycelium.

[0047] FIG. 4 illustrates the growth of *Agaricus bisporus* mycelium with respect to a culture period, according to an embodiment of the present invention. Referring to FIG. 4, the growth of the mycelium slowly increased until a culture period of 2 days, and then rapidly increased from the third day, showing a typical exponential phase. A maximum amount of the mycelium was 2.43 g/100 ml on the 9th day, and the growth of the mycelium declined afterwards. From the results shown in FIG. 4, a culture period of 6 days showing a slight difference from an amount of the mycelium at a culture period of 9 days was determined as an optimum culture period.

[0048] 4. Selection of Carbon Source and its Optimum Concentration

[0049] To select an optimum medium for the present culture, the basal medium was modified to examine its effect on the growth of the mycelium.

[0050] That is, 20 g/l of PDB as a carbon source was mixed with 10 g/l of yeast extract, 5 g/l of malt extract and 5 g/l of soytone. The pH of the medium was then adjusted to 6.0-6.5, and 100 ml of the medium was added to 500 ml Erlenmeyer flasks and then autoclaved at 121° C. for 15 minutes to prepare an experimental medium. Then, 1% (v/v) of a homogenized inoculum under sterile condition was inoculated thereto, and then cultured at 25° C. while shaking at 200 rpm for 4 days to examine the growth of the mycelium. This process was repeated under the same conditions except that glucose and then sugar cane extract (CJ Corporation) were used as the carbon source.

[0051] FIG. 5 illustrates the growth of *Agaricus bisporus* mycelium with respect to carbon source types in a medium, according to an embodiment of the present invention. Referring to FIG. 5, when sugar cane extract was used as a carbon source, the growth of the mycelium was the most efficient.

[0052] Next, to select an optimum concentration of the carbon source, mediums respectively including 1 g/l, 5 g/l, 10 g/l, 15 g/l and 20 g/l of the sugar cane extract mixed with 10 g/l of yeast extract, 5 g/l of malt extract and 5 g/l of soytone were prepared. A pH of each medium was then adjusted to 6.0-6.5, and 100 ml of each of the mediums was added to a 500 ml Erlenmeyer flask and then autoclaved at 121° C. for 15 minutes to prepare a series of mediums each of which has a different concentration of the carbon source. Then, the growth of mycelium was examined in the same manner as in the experiment on selection of carbon source.

[0053] FIG. 6 illustrates the growth of *Agaricus bisporus* mycelium with respect to a concentration of sugar cane extract used as a carbon source, according to an embodiment of the present invention. Referring to FIG. 6, when a concentration of the sugar cane extract was 10-20 g/l, the growth of the mycelium was excellent.

[0054] 5. Selection of Nitrogen Source and its Optimum Concentration

[0055] To examine optimum nitrogen source and concentration for growing *Agaricus bisporus* mycelium, 20 g/l of sugar cane extract, that is, an optimum carbon source, was added to a PDBYMS medium. 10 g/l of sodium nitrate as a nitrogen source was then added thereto. The pH of the medium was adjusted to 6.0-6.5, and 100 ml of the medium was added to 500 ml Erlenmeyer flasks and then autoclaved at 121° C. for 15 minutes to prepare a medium. This process was repeated under the same conditions except that ammonium nitrate, ammonium chloride, ammonium sulfate and then soytone were used as the nitrogen source. Then, the growth of mycelium was examined in the same manner as in the experiment on selection of carbon source.

[0056] FIG. 7 illustrates the growth of *Agaricus bisporus* mycelium with respect to nitrogen source types in a medium, according to an embodiment of the present invention. Referring to FIG. 7, when soytone was used as a nitrogen source, the growth of mycelium is the highest, followed by sodium nitrate. When the economical factor as well as the growth effect is considered, sodium nitrate may be most preferred as a nitrogen source.

[0057] Next, to select an optimum concentration of the nitrogen source, the growth of mycelium was examined in the

same manner as in the experiment on selection of nitrogen source, except that 1 g/l, 3 g/l, 5 g/l, 7 g/l and 10 g/l of sodium nitrate were used.

[0058] FIG. 8 illustrates the growth of *Agaricus bisporus* mycelium with respect to a concentration of sodium nitrate used as a nitrogen source, according to an embodiment of the present invention. Referring to FIG. 8, when the concentration of sodium nitrate was 10 g/l, the growth of mycelium was the highest. An additional experiment showed that when a medium comprised 10 g/l of sodium nitrate as a nitrogen source, and 5 g/l of yeast extract, the growth of mycelium reached the highest.

EXAMPLE 4

[0059] Liquid Culture of *Agaricus bisporus* Mycelium in a Bioreactor-optimum Impeller Rotation Number

[0060] To mass culture *Agaricus bisporus* mycelium, the mycelium was cultured while being stirred in a bioreactor.

[0061] BIOFLO Ilc Batch/Continuous Fermentor (New Brunswick Scientific.) was used as the bioreactor. A medium comprising 20 g/l of sugar cane extract, 10 g/l of sodium nitrate and 5 g/l of yeast extract in distilled water was used as a culture medium, and 1% (v/v) of a homogenized inoculum under sterile condition was inoculated into 2 l of the medium. Then, the inoculum was cultured with an air supply of 0.25 v/v/m at an impeller rotation speed of the bioreactor of 150 rpm for 4 days to measure a wet weight. This process was repeated under the same conditions except that impeller rotation speeds of 200 rpm, 250 rpm and 300 rpm were used, respectively.

[0062] FIG. 9 illustrates the growth of *Agaricus bisporus* mycelium with respect to an impeller rotation speed of a bioreactor, according to an embodiment of the present invention. Referring to FIG. 9, when the impeller rotation speed was 200 rpm, a maximum amount of mycelium was obtained.

INDUSTRIAL APPLICABILITY

[0063] According to the method of culturing *Agaricus bisporus* mycelium of the present invention, a large amount of *Agaricus bisporus* mycelium can be efficiently cultured within a short period of time.

1. A method of culturing *Agaricus bisporus* mycelium, comprising culturing *Agaricus bisporus* mycelium or spores thereof in a liquid medium comprising sugar cane extract.

2. The method of claim 1, wherein the sugar cane extract has a concentration of 10-30 g/l.

3. The method of claim 1, wherein the medium further comprises sodium nitrate as a nitrogen source.

4. The method of claim 3, wherein the sodium nitrate has a concentration of 1-10 g/l.

5. The method of claim 1, wherein the medium comprises yeast extract in a concentration of 1-10 g/l.

6. The method of claim 1, wherein the culturing of *Agaricus bisporus* mycelium is conducted at an initial pH of 6.0 to 6.5, at a culture temperature 25-28° C., while stirring at a stirring velocity of 150-250 rpm.

7. The method of claim 1, wherein the *Agaricus bisporus* mycelium is dispersed using a blender.

8. The method of claim 1, wherein the culturing of *Agaricus bisporus* mycelium is conducted for 3-6 days before completion.

9. The method of claim 1, further comprising preparing a mushroom seed culture by pre-culturing the *Agaricus bisporus* mycelium or spores thereof in a liquid medium comprising potato dextrose broth of 15-25 g/l, yeast extract of 1-10 g/l, malt extract of 2-5 g/l, and soytone of 2-5 g/l.

10. The method of claim 9, wherein the pre-culturing of the *Agaricus bisporus* mycelium or spores thereof is conducted at an initial pH of 6.0 to 6.5, at a culture temperature 25-28° C., while stirring at a stirring velocity of 150-250 rpm.

11. The method of claim 10, further comprising dispersing the pre-cultured mushroom mycelia using a blender.

12. A medium for culturing *Agaricus bisporus* mycelium, comprising sugar cane extract of 10-30 g/l and sodium nitrate of 1-10 g/l.

13. The medium of claim 12, further comprising yeast extract in a concentration of 1-10 g/l.

14. A medium for pre-culturing *Agaricus bisporus* mycelium or spores thereof, comprising potato dextrose broth of 15-25 g/l, yeast extract of 1-10 g/l, malt extract of 2-5 g/l, and soytone of 2-5 g/l.

* * * * *

Research Article

Received: 21 July 2010

Revised: 12 January 2011

Accepted: 20 January 2011

Published online in Wiley Online Library: 28 March 2011

(wileyonlinelibrary.com) DOI 10.1002/jsfa.4348

Bioproduction of mushroom mycelium of *Agaricus bisporus* by commercial submerged fermentation for the production of meat analogue

Kyoungju Kim, Byungsun Choi, Inhee Lee, Hyeyoung Lee, Soonhyang Kwon, Kyoungyoung Oh and Augustine Yonghwi Kim*

Abstract

BACKGROUND: As worldwide interest in healthy and delicious meat analogues increases, the texture of these products has become an important indicator of quality. Mycoprotein as fungal mycelium could provide a distinctive chewing sensation; however, the unfavorable consumer perception of fungal mycelium demands the production of meat analogues with true mushroom mycelium.

RESULTS: The industrial and economical bioprocess was developed using an inexpensive medium (30 g L⁻¹ sugar cane extract (SCE), 10 g L⁻¹ NaNO₃ and 5 g L⁻¹ yeast extract) and *A. bisporus* Suksung. The SCE was maintained at around 10 g L⁻¹ to minimize osmotic shock. The maximum mycelium production of 15.0 g L⁻¹ (dry weight) was reached within 4 days. Scanning electron microscopic analysis showed fibrous and directional structure rather than a more typical pellet structure. Meat analogues with mushroom mycelium had better textural properties, being higher in hardness, springiness, and chewiness and with preferable umami characteristics compared to meat analogues utilizing soy protein. The overall acceptance of meat analogues prepared with mycelium and soy protein, and a ground beef patty, were 5, 2 and 10, respectively.

CONCLUSION: The development of an industrial bioprocess for *A. bisporus* mycelium allowed the production of a highly acceptable meat analogue having not only superior textural properties but also umami characteristics when compared to that of soy protein.

© 2011 Society of Chemical Industry

Keywords: *Agaricus bisporus*; meat analogue; mushroom mycelium; submerged fermentation

INTRODUCTION

There is worldwide interest in the production of healthy and delicious foods with high protein content that are also meat free. Such meat analogues not only satisfy vegetarians but also promote personal well-being. Furthermore, meat analogues have bypassed environmental concerns associated with meat and milk production (i.e. CO₂ emission) in recent years.¹ Recently an increasing number of non-vegetarians have been willing to pay more for safe and eco-friendly foods as growing health and nutrition concerns such as chronic disease prevention become increasingly common; thus the market for meat analogues is expected to continue to expand. Various meat analogues have been made, mostly using plant derived proteins such as soy, soya and wheat protein isolates with texturing agents and shearing processes to form the fibrous characteristics of meat analogues.² Unfortunately, such efforts have so far been largely unsuccessful as the texture of these products is very elastic, rubbery and tough, and result in a poor mouthfeel – an extremely important quality indicator of meat analogues. In order to solve this problem of textured plant protein-derived meat analogues, it has been suggested that products should be tenderized to enhance mouthfeel by using a matrix

of fibers having inclusion bodies.³ Furthermore, meat analogues produced using plant-derived proteins usually have an off-flavor originating from the plants and may cause allergic reactions due to wheat gluten added for texturing.

Alternatively, natural mycoprotein in the form of mushroom mycelia that have fibrous structures that produce a distinctive chewing sensation have been used.^{4,5} The first commercial meat analogues such as burger patties and sausages with mycelia were made from the edible filamentous fungi *Fusarium graminearum* and successfully passed safety evaluation by the UK Food Standard Committee in 1994. These meat analogues naturally had a meaty flavor since they possess high sulfur content amino acids and glutamic acid, suggesting the characteristic umami flavor.⁶ Although meat analogues derived from mycelium of *Fusarium*

* Correspondence to: Augustine Yonghwi Kim, Department of Food Science and Technology, Sejong University, Seoul 143-747, South Korea. E-mail: kimyh@sejong.ac.kr

Department of Food Science and Technology, Sejong University, Seoul 143-747, South Korea

have been successful for 20 years in Europe, the consumption of fungal mycelium-based foodstuffs has been limited due to consumer perception that *Fusarium* is a 'pathogenic mold' and not true 'mycelium from mushroom'.⁷ As a result, there have been demands to produce meat analogues with 'true mushroom mycelium' to overcome consumer perceptions.

Edible mushrooms have been consumed by many cultures for centuries because of their taste. Unlike negative perceptions against fungi, mushrooms are considered to be health-supporting and functional foods. Mushrooms are generally low in saturated fats and high in fiber and protein, and may reduce harmful cholesterol in blood and act as an appetite suppressant.⁸ It is also well known that meat analogues with mushroom mycelia possess a superior taste when compared with plant-derived proteins.⁹ It is expected that meat analogues based on mushroom mycoprotein in the form of mycelium have more potential than plant-derived proteins or fungal mycoprotein in the commercial marketplace. Industrial applications of the production of edible mushroom mycelium for human and animal consumption have been investigated for a long time.^{10,11} However, the growing of edible mushrooms using normal mushroom cultivation methods and producing edible fruiting bodies is a relatively lengthy process, with a cultivation time of over 6 months and requiring tedious cultivation processes. As an alternative, a submerged fermentation processes for mushroom mycelium growth for human diet sources has been developed.¹² Unfortunately, the development of an economically viable process for the production of mushroom mycelium using submerged fermentation has been limited owing to the slow growth of most species (15–30 days), requirements of rich media, and the threat of microbial contamination. Specifically, the development of an economically viable submerged fermentation process using conventional fermentation equipment is a major hurdle to producing large quantities for industrial applications within a reasonable timeframe.

Agaricus bisporus belongs to the Agaricaceae family and is an edible mushroom mostly consumed in the Western world. It has spread to Asia because of its characteristic flavoring properties in many dishes, and is being intensively investigated for the production of mycelium by submerged fermentation. Mycelium of *A. bisporus* can be produced by either solid or liquid culture methods. Solid culturing has certain disadvantages, including a long culture time, a high probability of contamination, and difficulty in automating a recovery process following cell culture. In contrast, liquid culturing has a relatively lower probability of contamination and relatively high mass production in a limited space, although the development of an industrial bioprocess using submerged fermentation is still hampered by relatively longer culture times and high costs for media components, particularly carbon sources.

The main purpose of this research was to study an industrial, as well as economically viable bioprocess and to develop a method for the production of mycelium of *A. bisporus* by submerged fermentation, and to characterize mycelium for the production of lower-calorie meat analogues.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals and reagents

All chemicals and reagents used in this research were ACS analytical grade and were purchased from either Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA) or Daejung Chemical (Seoul, Korea) unless otherwise

indicated. For the preparation of meat analogues, all food-grade ingredients were used and obtained from CJ Food Inc. (Seoul, Korea).

A. bisporus stock culture preparation and storage

Commercial cultures of *A. bisporus* were obtained from the mushroom culture collection of Korea Agricultural College and the Suksung mushroom farm (Buyeo, Korea). For the preparation of stock cultures, fruiting bodies of each mushroom were washed with 75% alcohol and aseptically cut into blocks of $5 \times 5 \times 5$ mm. A block of mushroom was transferred to a potato dextrose agar (PDA, Difco, MN, USA) plate and incubated for 3 weeks at 25°C. Mycelial mats on the PDA plates were aseptically transferred to a pre-sterilized blend jar (250 mL, Sunbeam, Boca Raton, FL, USA), and mixed with 100 mL sterilized deionized water (D-water). The mixed cell cultures were blended with a blender (Waring, New Hartford, CT, USA) for 3 min with 10 s intervals at the highest blending speed. The homogenized cell cultures were transferred to flasks containing 100 mL potato dextrose medium (PDB, Difco) and incubated for 2–3 days at 25°C. Following incubation, 100 mL of cultured mycelia were transferred to a blender jar and chopped with a Waring blender, and 15 mL of sterilized glycerol was added. A 2 mL aliquot of chopped mycelia was dispensed to 2 mL cryo vials (Nalgene, Rochester, NY, USA) and stored at -80°C .

Growth of *A. bisporus* mycelium in liquid medium

Following screening of *A. bisporus* cultures, all experiments for the determination of optimal growth conditions were carried out using *A. bisporus* Suksung (Buyeo, Korea), which showed fast growth in a defined medium. For liquid culturing in flasks, 2 mL stock culture of mushroom mycelium was inoculated into 100 mL PDB supplemented with 5 g L^{-1} yeast extract (YE), 5 g L^{-1} malt extract (ME) and 5 g L^{-1} soytone (PDBYMS medium, pH 6.0). The inoculated culture was incubated at 25°C and subjected to stirring at 200 rpm for 2 days. Following mycelium culture, a complete mycelium culture was homogenized as described above and used as inocula for subsequent culturing. In order to determine environmental growth conditions, a PDBYMS medium was used. 1% (v/v) of a homogenized inoculum of mycelium was inoculated into 100 mL PDBYMS medium in a 500 mL flask while shaking at 200 rpm during incubation using a rotary shaker (Korea Shaker Model KSL-201, Seoul, Korea). Following incubation for 4 days, all mycelia were recovered by centrifugation at $10000 \times g$ for 10 min using an ultracentrifuge. Recovered mushroom mycelium from 100 mL of cell culture was dried in a drying oven at 60°C for 24 h before measuring the dry weight of the mycelium mass. In order to examine the nutritional requirements for mycelium growth of *A. bisporus* Suksung, 1% (v/v) of a homogenized inoculum of mycelium was inoculated into 100 mL of media containing various nutritional components in a 500 mL flask. The nutritional requirements for *A. bisporus* Suksung were determined by comparing each dry weight of mycelium with that of mycelium produced in PDBYMS.

Growth of *A. bisporus* mycelium in bioreactors

For the development of an industrial and economical bioprocess using a conventional fermenter, a 2.5 L stirred-tank fermenter (BioFlow LLC, New Brunswick Scientific, Edison, NJ, USA) with a working volume of 2 L and a 20 L *in situ* sterilization bioreactor with a working volume of 15 L (Biotron 20, Bupyoung, Korea) were used. Following extensive investigation of the nutritional requirements

for industrial production of *A. bisporus* mycelium, a medium containing 20 g L⁻¹ sugar cane extract (SCE, CJ Food Co., Seoul, Korea), 10 g L⁻¹ NaNO₃ (Sigma, St Louis, MO, USA) and 5 g L⁻¹ YE was used for the growth of mycelium in bioreactors. Inoculum was prepared using PDBYMS medium as described above. Inoculum as homogenized mycelium was added to bioreactors at a level of 1% (v/v). All bioreactors were equipped with a pH electrode for pH monitoring and a dissolved oxygen (DO) probe for monitoring of dissolved oxygen in the cell culture, and the cell cultures were maintained at pH 6.5 with 50% NaOH solution during fermentation. Unless otherwise specified, fermentation was carried out under the following conditions: a temperature of 28 °C and aeration rate of 0.25 v/v/m for 3–4 days with an agitation speed of 200 and 150 rpm for 2 L and 20 L fermenters, respectively. The residual glucose concentration of cell cultures in bioreactors was continuously measured using a Biochemical Analyzer (YSI 2000, Yellow Springs, OH, USA). Following termination of fermentation without sterilization, mycelium was harvested using a continuous bucket centrifuge (Hanil, Seoul, Korea) lined with Whatman 41 filter papers (Whatman, Florham Park, NJ, USA). For freeze-drying, the recovered mushroom mycelium was frozen at -80 °C and dried in a freeze drier (Model ISE, Ilsin Engr. Co., Seoul, Korea). After freeze-drying, all mycelium were packed in polyethylene bags and stored at -80 °C until used.

Analysis of physical and chemical properties of *A. bisporus* mycelium

Scanning electron microscopy (SEM)

To determine the structure of *A. bisporus* mycelium, a scanning electron microscope was used. A culture containing *A. bisporus* mycelium was quickly frozen at -80 °C, dried in a freeze dryer, and cut into thin slices. The samples were attached to an SEM stub using double-sided cellophane tape. The stub and sample were then coated with gold-palladium and examined and photographed under a scanning electron microscope (Philips SEM515, Eindhoven, Netherlands) at 600× magnification.

Nutritional composition

All nutritional components of *A. bisporus* mycelium, such as lipid, crude protein, carbohydrate, salts and ash, were determined using standard methods described in the AOAC manual. Total carbohydrate was determined by the difference. For the analysis of β -glucan content, a mushroom and yeast β -glucan assay system (Megazyme Inc., Wicklow, Ireland) was used following AOAC methodology. Following hydrolysis of β -glucan with both lichenase and β -glucosidase, the concentration of released glucose was measured by biochemical analyzer (YSI Model 2700). The crude proteins as total nitrogen content of *A. bisporus* mycelium was determined by the Kjeldahl method¹³ using freeze-dried mycelium (protein constant was 6.25). For the determination of the total amino acid content of mycoprotein, *A. bisporus* mycelium was hydrolyzed with 6 mol L⁻¹ HCl at 110 °C for 24 h and then was analyzed using a Waters AccQ tag system (Millipore Co., Billerica, MA, USA) and a high-performance liquid chromatographic system (Agilent 1200 detector, Agilent, Santa Clara, CA, USA). For the determination of free amino acid content, the same method was used following sonication for 60 min of *A. bisporus* mycelium without acid hydrolysis. If necessary, samples were prepared in duplicate and the data obtained were analyzed using a logistic curve model.

Preparation of meat analogues using *A. bisporus* mycelium

Two different types of meat analogues in the form of a patty and a ground beef patty were prepared. The control patty (T1), soybean meat analogue, consisted of 27% soybean, 62% water, 5.6% wheat gluten, 5.6% corn starch and 0.1% NaCl. The mushroom mycelium patty (T2) consisted of approximately 27% freeze-dried mushroom mycelium, 7.3% soybean, 62% water, 1.5% wheat gluten, 1.5% corn starch and 0.1% NaCl. For the preparation of ground beef patty, ground beef was purchased at a local supermarket. The beef patty (T3) consisted of approximately 100% ground beef and 0.1% NaCl. All ingredients were mixed by hand and processed into patties (10 mm thick and 40 mm diameter). Patties were cooked in a preheated (150 °C) electric oven (Samsung Electronics Inc., Seoul, Korea). The patties were cooked at 150 °C for 15 min.

Evaluation of meat analogues prepared with *A. bisporus* mycelium

Texture profile analysis (TPA) was conducted on T1, T2 and T3 patties (six samples of each). The cooked patties were prepared as describe above and cooled to room temperature before texture analysis. TPA was carried out using a texture analyzer (TMS-Pro, Food Technology Co., Sterling, VA, USA) with a 100 N load cell. Patties were placed in the middle of the platform of the texture analyzer, and the calibrated probe (10 mm), which has a smaller diameter than the patties, was pressed down on to the patties twice at a cross-head speed of 100 mm min⁻¹. The first time fractures and the second time hardness were recorded. The parameters 'instrumental fracturability' and 'instrumental hardness' were calculated using Texture Lab Pro (version 1.13-002). If necessary, samples were prepared in duplicate and the data obtained were analyzed using a logistic curve model. Overall acceptance of meat analogues prepared with *A. bisporus* mycelium was evaluated by a sensory panel consisting of 10 trained graduate students at Sejong University. The relative acceptance was determined by comparison with ground patties using a 1–10 scale analysis (taking ground beef patty as 10).

RESULTS AND DISCUSSIONS

Screening of *A. bisporus* strains for commercial bioprocess development

A total of 10 commercially available *A. bisporus* mushrooms obtained from both Korea Agricultural University and the Suksung mushroom farm in Korea were screened for commercial bioprocess development. All mushrooms except *A. bisporus* Suksung required at least 15–30 days of incubation time to obtain sufficient mycelium masses in submerged flask cultures because of mycelial pellet formation (data not shown). *A. bisporus* Suksung, a variety of the commercially known 'white button' mushroom (i.e. Sylvan and Amycel), was the only economically feasible choice to develop a commercial bioprocess for mycelium production. The maximum mycelium production of 15.3 g L⁻¹ (dry weight basis) was reached after 4 days' incubation using PDBYMS medium. Extended incubation time did not increase mycelium mass of *A. bisporus* Suksung, while using additional glucose for the production of extracellular biopolymers, such as β -glucans, was responsible for the viscosity of the cell cultures. It was expected that *A. bisporus* Suksung grew relatively fast in liquid culture since this strain is a main mushroom culture that has been extensively selected for higher productivity (i.e. total mushrooms and larger

cap) and shorter cultivation time to improve economic value to the Suksung mushroom farm (personal communication). In this study, its genetic characteristics were not carried out owing to limited information on breeding history at the Suksung mushroom farm.

Growth of *A. bisporus* Suksung in liquid medium

Complex sources of nutrients, preferably agricultural waste materials, were most often used in the large-scale cultivation of mycelia of fungi and mushrooms to improve cost effectiveness. The growth of *A. bisporus* also required various nutritional components, such as growth factors, in addition to carbon and nitrogen sources.⁹ Although mycelium of *A. bisporus* Suksung could be obtained using a rich complex medium such as PDBYMS, this medium was too expensive to be used as a commercial medium. An optimal but inexpensive medium for the production of *A. bisporus* Suksung mycelium in submerged culture was developed following extensive examinations of the effect of carbon and nitrogen sources on the production of mycelium biomass (data not shown). The highest level of mycelium biomass was obtained when relatively cheap raw sugar cane extract (SCE) was used as a carbon source instead of expensive glucose. Bulk SCE, as raw material for refined sugar production, was prepared from unrefined sugar extract by crystallizing sugarcane juice. *A. bisporus* Suksung produced an extracellular invertase to enable use of sugar as a carbon source. It was also presumed that raw SCE provided undefined growth factors for *A. bisporus* Suksung. This variety consistently grew better on spent sugarcane beds at the Suksung mushroom farm. As a nitrogen source, organic soypeptone gave a slightly higher mycelium yield than any other organic or inorganic nitrogen source; however, inorganic NaNO_3 was used as a nitrogen source to replace expensive organic nitrogen sources such as soypeptone. It seems that *A. bisporus* Suksung possesses nitrate reductase activity to assimilate NO_3^- via NH_4^+ . The addition of yeast extract resulted in higher mycelium yield comparable to that with rich complex media. Maximum mycelial mass was obtained with a medium containing 20 g L^{-1} SCE, 10 g L^{-1} NaNO_3 and 5 g L^{-1} YE.

According to the literature, the optimal temperature for mycelial growth of *A. bisporus* is $23\text{--}25^\circ\text{C}$. While *A. bisporus* Suksung grew well between 20 and 30°C , the optimal temperature was 28°C in flask-submerged culture (Fig. 1(a)). *A. bisporus* Suksung could grow in an initial pH range of $4.5\text{--}9.0$ (data not shown). The pH of mycelium culture was gradually decreased to pH 4.5 in flask-submerged culture. However, the highest growth of mycelium of *A. bisporus* Suksung was found when the initial pH of the medium was set at 6.0 (Fig. 1(b)) in flask-submerged culture. *A. bisporus* Suksung mycelium growth required aeration to supply oxygen. When aeration was provided by agitation of flask-submerged cultures, agitation speed affected the pellet size of mycelium and eventually affected total mycelium production. The mycelium grew as small pellets at lower agitation speed below 100 rpm. If the pellet size of mycelium increased, total mycelium production decreased due to an anoxic condition of the inner parts of the mycelium that prevented growth, as previously reported.¹⁴ An agitation speed of 200 rpm was resulted in reduced pellet size and increased total mycelium production (data not shown). However, the increased agitation caused excessive foaming and ring growth of mycelium known, as the 'washing-out' phenomenon. Optimal growth conditions were at a temperature of 28°C , initial pH of 6.0 and agitation speed of 200 rpm for the flask-submerged culture (Table 1).

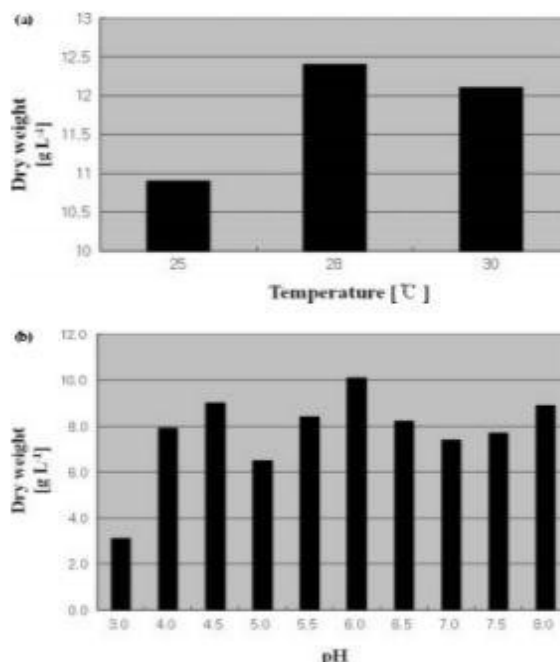


Figure 1. Effects of temperature and initial pH of medium on the growth of *A. bisporus* Suksung mycelium in a basal media. (a) Effect of temperature on the growth of mycelium. (b) Effect initial pH of the medium on the growth of mycelium. All cultures were grown in PDBYMS medium and at pH 6.0 and 200 rpm for 4 days.

Development of an industrial bioprocess using *A. bisporus* Suksung

Based on the results from the experiment with flask-submerged cultures, an industrially applicable bioprocess for *A. bisporus* Suksung was developed using a 2.5 L stirred-tank fermenter and a 20 L *in situ* sterilization bioreactor. The optimal conditions for each bioreactor are summarized in Table 1.

The successful growth of *A. bisporus* Suksung mycelium in bioreactors was possible because of good inoculum preparation, and good aeration using relatively high-speed agitation and sufficient air supply in addition to lower-cost medium formulation using SCE and NaNO_3 . In previous studies, inocula for submerged fermentation of mushrooms or fungi were prepared using a homogenizer to uniformly break mycelial pellets in flasks before inoculating to fermenters. However, the chopped pellets became too stressed and/or injured following homogenization, and were continuously stressed by shear pressure of the impellers during agitation, thereby resulting in inefficient growth in the cultures. For this reason, mycelial growth of mushrooms and fungi usually ended up as 'pellet growth' with minimal or no agitation, resulting in poor mycelia mass production. In this study, the inoculum of *A. bisporus* Suksung was prepared by chopping mycelial pellets from flask cultures using a blender to minimize cell injury, but sufficient to grow efficiently in fermenters. *A. bisporus* Suksung grew well as linear mycelia that did not aggregate to form pellets in fermenters. During subsequent transfer of mycelial cultures to fermenters, linear mycelial growth was maintained without forming mycelial pellets. This was most likely due to an optimized level of shear pressure coupled with a relatively high agitation

Table 1. Growth conditions for *A. bisporus* Suksung mycelium in the submerged bioreactors

Conditions	500 mL flask	2.5 L fermenter	20 L fermenter
Inocula	1% (v/v)	1% (v/v)	1% (v/v)
Working volume	100 mL	2 L	15 L
Temperature	28 °C	28 °C	28 °C
pH	6.0 (initial pH)	Controlled at 6.5 with 25% NaOH	Controlled at 6.5 with 25% NaOH
Aeration	(Shaking at 200 rpm)	0.25 v/v/m	0.25 v/v/m
Agitation	200 rpm	200 rpm	150 rpm
Media composition (g L ⁻¹)	PDBYMS medium	20 of SE, 10 of NaNO ₃ , 5 of YE	20 of SE, 10 of NaNO ₃ , 5 of YE
Cultivation time	3 days	4 days	4 days
Total mycelium ^a	15.3 g L ⁻¹	13.0 g L ⁻¹	15.0 g L ⁻¹

^a Dry weight basis.

speed. The submerged mycelial culture inoculated with chopped mycelium also showed less viscosity, resulting in lower formation during high aeration.

Furthermore, the development of a cost-effective industrial bioprocess was possible using inexpensive SCE and NaNO₃ as carbon and nitrogen sources, respectively. Initially 20 g L⁻¹ of SCE was added to the fermenter. *A. bisporus* Suksung mycelium grew well for the 2-day incubation period, but growth ceased due to the absence of a carbon source (no residual glucose present). It was interesting to note that *A. bisporus* Suksung mycelium did not grow well when 30 g L⁻¹ of SCE was added to fermenters, most likely due to osmotic pressure and when the concentration of glucose was below 5 g L⁻¹ (data not shown). For these reasons, the concentration of glucose was maintained at greater than 5 g L⁻¹ during fermentation by the periodic addition of pre-sterilized SCE solution (50% w/w). Additional NaNO₃ or YE did not affect *A. bisporus* Suksung mycelial growth in fermenters.

Another advantage of *A. bisporus* Suksung was the fast growth rate. Mycelial growth required at least 2 and preferably 3 days incubation time to obtain sufficient mycelial mass (13 g L⁻¹). The mycelial mass could be increased up to 10 days fermentation. However, the extended fermentation time did not significantly increase mycelial mass beyond 3 days (Fig. 2). It was neither desirable nor cost effective to have a long fermentation time since the major cost of fermentation was related to fermentation time because of increased utility cost. The maximum mycelial production of 15.0 g L⁻¹ (dry weight basis) was reached after 4 days of incubation. In order to maximize both mycelium yield and economical efficiency, this bioprocess should be carried out for 3–4 days. This was far shorter than the 12–30 days typically taken for the submerged fermentation of mushroom mycelium because of aggregated pellet formation.¹⁵

Nutritional quality of *A. bisporus* Suksung mycelium

The proximate composition of *A. bisporus* Suksung mycelium is listed in Table 2. The major components were carbohydrates (44.35%), which made up the mycelial cell wall. β -Glucan forms part of the cell wall material of fungi, including mushrooms, molds and yeasts, and has β -1,3-, 1,4-, and 1,6-glycosidic linkages and the sugar constituents arabinose, galactose, gluconic acid, mannose, ribose or xylose in side chains.¹⁶ β -Glucan is a fiber having a functional component with various physiological activities including anticancer, anticholesterol, antioxidation, immune boosting and skin rejuvenation.^{17–20} Mycelium of *A. bisporus* Suksung contained a total of 0.4 g kg⁻¹ of glucan,

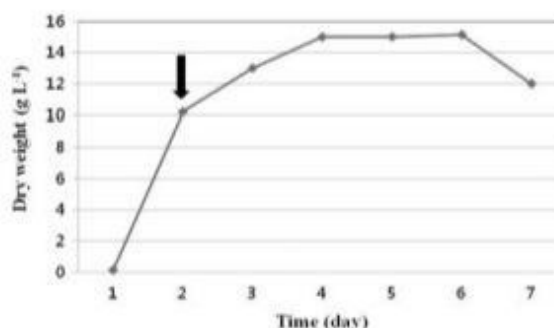


Figure 2. Typical cell mass production of *A. bisporus* Suksung mycelium grown in submerged culture. The medium was initially prepared with 20 g L⁻¹ SCE, 10 g L⁻¹ NaNO₃, and 5 g L⁻¹ YE at pH 6.0 in a 20 L fermenter. The arrow indicates additional SE addition. Concentration of glucose was maintained at the minimum 5 g L⁻¹.

consisting of 0.1 g kg⁻¹ α -glucan and 0.3 g kg⁻¹ β -glucan. The total fat content of *A. bisporus* Suksung mycelium was around 15%, probably providing soft textural properties, but far less fat in comparison to meat. Mycoprotein is a rich source of dietary protein.²¹ In order to evaluate the nutritional value of *A. bisporus* Suksung mycelium as a source of protein, crude protein content was measured using the Kjeldahl method (N $\times$ 6.25) in this study. On average, *A. bisporus* Suksung mycelium produced by submerged fermentation contained around 32% (dry weight base) crude proteins regardless of fermentation conditions. The crude protein contents of mycelium of *A. bisporus* Suksung was slightly less than that of mature *A. bisporus* mushroom (32% versus 38%), and less than that of mycelium produced by *Fusarium* sp. (32% versus 48%).^{22,23} Additional nutritional supplements, such as organic nitrogen sources, did not increase the crude protein content of *A. bisporus* Suksung. The total amino acid composition of *A. bisporus* Suksung mycelium is given in Table 3. Relatively high contents of lysine, considered one of the limiting amino acids in plant-derived proteins, could be used for supplementation to vegetarians. The results showed higher aspartic acid (as asparagine and aspartic acid) and glutamic acid (as glutamine and glutamic acid) contents that are presumed to produce the excellent umami characteristics of mycelium-based meat analogues in addition to nucleotides of mushroom mycelium. It was expected that mycelium of *A. bisporus* Suksung can be used as a good protein source with various additional health benefits from lower fat and

Table 2. Proximate composition of *A. bisporus* Suksung mycelium grown in submerged culture (dry weight basis, %)

Sample	Fat	Ash	Crude Protein	Carbohydrate (β -glucan)
Mushroom mycelium	14.91	8.28	32.46	44.35 (0.04)

Table 3. Free and total amino acid composition (g kg^{-1}) of *A. bisporus* Suksung mycelium grown in submerged culture

Mushroom mycelium Total	Amino acid	Mushroom mycelium Free
18.382	Alanine	5.277
12.341	Arginine	5.142
17.258 (+ asparagine) ^a	Aspartic acid	2.853
2.001	Cysteine	0.547
12.166 (+ glutamine) ^a	Glutamic acid	2.278
11.386	Glycine	1.684
4.068	Histidine	1.931 (+ glutamine) ^b
11.410	Isoleucine	3.184
21.772	Leucine	4.843
28.027	Lysine	5.107
4.117	Methionine	1.427
12.748	Phenylalanine	3.852
20.669	Proline	7.947
10.404	Serine	4.794 (+ asparagine) ^b
15.435	Threonine	3.819
4.762	Tyrosine	3.095
15.039	Valine	4.100
5.302	Tryptophan	1.336
227.289	Total (g kg^{-1} DW)	63.217

Data are expressed in g kg^{-1} dry weight (DW). The measurement was performed in duplicate.

^a Asparagine and glutamine were hydrolyzed to aspartic acid and glutamic acid during acid hydrolysis.

^b Amino acids without acid hydrolysis were not separated in this experimental condition.

higher carbohydrate contents, making it suitable for lower-calorie meat analogues with excellent flavor qualities when compared to soy proteins.²⁴

Characterization of meat analogues prepared with mycelium of *A. bisporus* Suksung

It is important that meat analogues should have a fibrous structure giving desirable textural properties.²⁵ Meat analogues prepared from plant-derived proteins, especially soy and/or wheat proteins, were very elastic, rubbery and tough, with poor mouthfeel due to their agglomeration properties. Kelly et al.³ suggested that using a matrix of fibers having inclusion bodies would enhance the textural properties. According to structure studies and sensory evaluation, the products that were higher in hardness or chewiness had a more orderly directional structure.²⁶

Alternatively, fungal mycelium was used for the production of meat analogues giving fibrous structural properties, but fungal cultures appear to exhibit highly branched mycelium growth requiring an extended fermentation process for cell

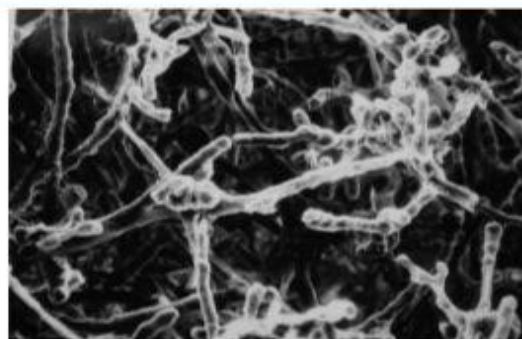


Figure 3. SEM analysis of *A. bisporus* Suksung mycelium grown in submerged culture. SEM (Philips SEM 515, Eindhoven Netherlands) at 600-fold magnification.

biomass production.⁸ The fibrous and directional structure of *A. bisporus* Suksung could be observed and the SEM picture of *A. bisporus* Suksung mycelium is shown in Fig. 3. This was a major distinctive structural property of *A. bisporus* Suksung grown by submerged fermentation in this study, whereas mycelium grown by typical submerged fermentation usually showed aggregated pellet formation. It is desirable in order to produce meat analogues that are attractive in terms of mouthfeel²⁷ that mushroom cultures should show little branching during submerged fermentation conditions. The prepared and cooked meat analogues with soy protein and *A. bisporus* Suksung mycelium, and a ground beef patty, are shown in Fig. 4. The meat analogue with *A. bisporus* Suksung retained its original shape and tenderness after cooking. The textural properties of meat analogues prepared with *A. bisporus* Suksung mycelium, soy protein, and a ground beef patty are summarized in Table 4. Moisture content of the beef samples obtained from chemical analysis typically ranged from 69% to 77%.²⁸ Meat analogues were prepared with a water content of 64%. As moisture content decreased, hardness, chewiness, gumminess, and cohesiveness increased. Moisture content might be significant in regard to the texture characteristics of meat analogues.²⁶ Although meat analogues with *A. bisporus* Suksung mycelium did not have the same textural properties as the ground beef patty, they had desirable textural properties, and rated comparatively higher in hardness, springiness, and chewiness than that of soy protein. The overall acceptance of meat analogues prepared with *A. bisporus* Suksung mycelium, soy protein, and ground beef by the sensory panel were 5, 2 and 10, respectively. The higher acceptance of the meat analogue with *A. bisporus* Suksung mycelium than that of soy protein was due not just to superior textural properties, but also to the umami characteristics of cooked meat analogue with *A. bisporus* Suksung mycelium. It is known that meat analogues produced using plant-derived proteins usually have an off-flavor originating from plants, such as a 'beany' note following cooking. In order to improve the textural properties of *A. bisporus* Suksung mycelium, the formulation of ingredients, especially the selection of additional binding agents and methods for meat analogue preparation and cooking, such as extrusion, are currently being investigated.

CONCLUSIONS

In this study, a commercial and economically viable fermentation process for the production of *A. bisporus* Suksung mycelium in

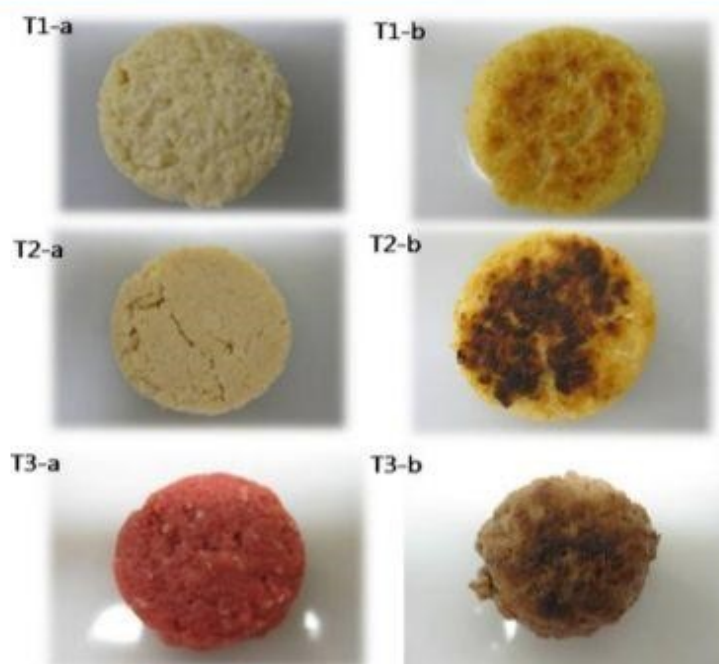


Figure 4. Preparation of meat analogues with soy protein and *A. bisporus* Suksung mycelium grown in submerged culture, and a ground beef patty. T1, meat analogue prepared with soy proteins; T2, meat analogue prepared with *A. bisporus* Suksung mycelium grown in submerged culture; T3, ground beef patty; a, prepared patties; b, cooked patties.

Table 4. Texture profile analysis of cooked patties

Sample	Hardness	Adhesion	Cohesiveness	Springiness	Gumminess	Chewiness	OA ^a
T1	12.00	2.14	0.08	1.22	1.05	1.28	2
T2	17.73	2.01	0.06	2.26	0.98	2.22	5
T3	29.31	1.31	0.35	6.75	10.27	69.96	10

^a Overall acceptance score.
T1, meat analogue prepared with soy proteins; T2, meat analogue prepared with *A. bisporus* Suksung mycelium grown in submerged culture; T3, ground beef patty.

submerged fermenters was developed. The successful production of *A. bisporus* mycelium could have several applications in the food industry, such as in the production of an alternative protein, functional foods and supplements, and flavor enhancers utilizing its nutritional contents: mycoprotein and β -glucan, with high amino acid content and nucleotides, respectively. For the production of meat analogues, health and nutritional benefits such as lower calorie and fat content, as well as physiological reactions and safety, must be considered. Technically, flavors and textures of meat analogues should be matched with consumer preferences in terms of good mouthfeel and juiciness resulting from moisture and fat retained in meat. *A. bisporus* Suksung mycelium grown using a submerged fermentation process could be used for the production of a superior edible meat analogue, because of its meat-like fibrous microstructure. However, it comes with the caveat that the most texturized product may not necessarily be the one that consumers like best. It is expected that consumers may prefer meat analogues that have natural umami flavor characteristics

with fewer textural properties when compared to beef itself. Thus a consumer evaluation of this kind of product is recommended for the future. It is expected that mycelium of *A. bisporus* Suksung can be used as a good protein source in addition to the various health benefits that are expected from lower fat and higher carbohydrate contents, including β -glucan, making it suitable for lower calorie meat analogues possessing excellent flavor quality when compared to those made with soy proteins.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was partly supported by an industrial research grant from CJ Food Inc. and a research grant from Sejong University.

REFERENCES

- 1 Cuellar AD and Webber ME, Cow power: the energy and emissions benefits of converting manure to biogas. *Environ Res Lett* 3:1–8 (2008).

- 2 Gutcho M, Textured foods and allied products, in *Food Technology Review No. 1*. Noyes Data Corp., Park Ridge, NJ, pp. 15–17 (1973).
- 3 Kelly L, Frazier PJ and Candy MJ, Textured proteic fiber matrix with included solid, liquid or gaseous particles. US Patent 5922392 (1999).
- 4 Finnigan TJA and Stephens JA, Texturized foodstuffs. US Patent 5904943 (1999).
- 5 Naylor TW, Williamson T, Trinci APJ, Robson GD and Wiebe MG, Fungus. US Patent 6270816 (2001).
- 6 Trinci APJ, Evolution of the quorn registered myco-protein fungus, *Fusarium graminearum* A3/5. *Microbiology* **140**:2181–2188 (1994).
- 7 Booth C, The *Fusarium* problem: historical, economic and taxonomic aspects, in *The Applied Mycology of Fusarium*, ed. by Moss MO and Smith JE. British Mycological Society, London, pp. 1–14 (1984).
- 8 Moore D and Chiu SW, Fungal products as food, in *Bio-Exploitation of Filamentous Fungi*, ed. by Pointing SB and Hyde KD. Fungal Diversity Press, Hong Kong, pp. 223–251 (2001).
- 9 Sadler MJ, Myco-protein, Food Technology and nutrition, in *Encyclopedia of Food Science*, ed. by Macrae R. Academic Press, New York, pp. 3191–3196 (1993).
- 10 Gray WD, *The Use of Fungi as Food and in Food Processing*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 19–20 (1970).
- 11 Worgan JT, Culture of the higher fungi. *Prog Ind Microbiol* **8**:24–139 (1968).
- 12 Yitzhak H and Ephraim CA, Chemical composition of the edible mushroom *Pleurotus ostreatus* produced by fermentation. *Appl Environ Microbiol* **51**:1352–1354 (1986).
- 13 AOAC, *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists* (15th edn). AOAC, Washington, DC (1990).
- 14 Harry H, The production of mushroom mycelium (*Agaricus campestris*) in submerged culture. *Science* **107**:373 (1948).
- 15 Lee JS, Lee SR and Yu TJ, Production of mushroom mycelium (*Agaricus campestris*) in shaking culture. *Hanguk Sikpum Kwahahoe Chi* **7**:22–29 (1975).
- 16 Manzi P and Pizzoferrato L, β -Glucans in edible mushrooms. *Food Chem* **68**:315–318 (2000).
- 17 Nicolosi R, Bell RS, Bistran BR, Greenberg L, Forse RA and Blackburn GL, Plasmic lipid changes after supplementation with beta-glucan fiber from yeast. *Am J Clin Nutr* **70**:208–212 (1999).
- 18 Bobek P and Galbavy S, Effect of pleuran (beta-glucan from *Pleurotus ostreatus*) on the antioxidant status of the organism and on dimethylhydrazine-induced precancerous lesions in rat colon. *Br J Biomed Sci* **58**:164–168 (2001).
- 19 Sandula J, Korgan KM and Machova E, Microbial (1–3)- β -glucans, their preparation, physico-chemical characterization and immunomodulatory activity. *Carbohydr Polymers* **38**:247–253 (1999).
- 20 Delatte SJ, Evans J, Hebra A, Admson W, Othersen HB and Tagge P, Effectiveness of beta-glucan collagen for treatment of partial-thickness burns in children. *J Pediatr Surg* **36**:113–118 (2001).
- 21 Donald AW, Paula JG, Jennifer L, Frank G, Julia V, Corby K, et al, Effect of consuming mycoprotein, tofu or chicken upon subsequent eating behavior, hunger and safety. *Appetite* **46**:11–48 (2006).
- 22 Dikeman CL, Bauer LL, Flickinger EA and Fahey GC Jr, Effects of stage of maturity and cooking on the chemical composition of selected mushroom varieties. *J Agric Food Chem* **53**:1130–1138 (2005).
- 23 Turnbull WH, Leeds AR and Edwards DG, Myco-protein reduces blood lipids in free-living subjects. *Am J Clin Nutr* **55**:415–419 (1992).
- 24 Lilesh BL, Rahul MS and Raymond RM, Formation of dialyzable iron during *in vitro* digestion and extraction of mycoprotein. *Food Chem* **105**:1630–1635 (2007).
- 25 Miri T, Barigou Please ensure that the author names are in the order forename, Fryer PJ and Cox PW, Flow induced fibre alignment in mycoprotein paste. *Food Res Int* **38**:1151–1160 (2005).
- 26 Lin S, Huff HE and Hsieh F, Texture and chemical characteristics of soy protein meat analog extruded at high moisture. *J Food Sci* **65**:264–269 (2000).
- 27 Chabot RJ and Jones SB, Some examples of scanning electron microscopy in food science, in *Studies of Food Microstructure*, ed. by Johari O. Scanning Electron Microscopy Inc., Chicago, IL, pp. 1–8 (1981).
- 28 Zheng C, Sun D-W and Zheng L, Correlating colour to moisture content of large cooked beef joints by computer vision. *J Food Eng* **77**:856–863 (2006).



Production of *Agaricus bisporus* (JE Lange) Imbach Biomass under Submerged Cultivation by Using *Citrus reticulata* Blanco Waste as an Alternative Carbon Source

Thomas M. Schmidt¹, Michele Hoeltz^{1,2*}, Ana P. Müller², Jennifer Julich³, Yuri G. Kappenberg³, Guilherme G. Silva³, Angela R. Lazzari⁴, Lisianne B. Benitez^{1,2}, Rosana C. S. Schneider^{1,3} and Valeriano A. Corbellini^{1,3}

¹Graduate Program in Environmental Technology, University of Santa Cruz do Sul, Av. Independência, 2293, CEP 96815-900, Rio Grande do Sul, Brazil.

²Department of Biology and Pharmacy, University of Santa Cruz do Sul, Av. Independência, 2293, CEP 96815-900, Rio Grande do Sul, Brazil.

³Department of Chemistry and Physics, University of Santa Cruz do Sul, Av. Independência, 2293, CEP 96815-900, Rio Grande do Sul, Brazil.

⁴Department of Mathematics, University of Santa Cruz do Sul, Av. Independência, 2293, CEP 96815-900, Rio Grande do Sul, Brazil.

Authors' contributions

This work was carried out in collaboration between all authors. Authors TMS and MH designed the study, wrote the protocol and wrote the first draft of the manuscript. Authors ARL and VAC performed the statistical analysis. Authors APM, JJ, YGK, GGS and RCSS managed the analyses of the study. Authors TMS, LBB and MH managed the literature searches. All authors read and approved the final manuscript.

Article Information

DOI: 10.9734/CJAST/2017/38197

Editor(s):

(1) Hamid El Bilali, Centre for Development Research, University of Natural Resources and Life Sciences (BOKU), Vienna, Austria.

Reviewers:

(1) Krishnaveni Balasubramanian, Arts and Science College, India.

(2) Shaiful Azuar Mohamad, Malaysia.

Complete Peer review History: <http://www.sciedomains.org/review-history/22269>

Received 17th November 2017 Accepted 8th December 2017 Published 13th December 2017

ABSTRACT

Aims: To evaluate the influence of different parameters in the biomass production of *Agaricus bisporus* by submerged cultivation using *Citrus reticulata* B. waste as an alternative carbon source. **Place and Duration of Study:** University of Santa Cruz do Sul.

*Corresponding author: E-mail: michelehoeltz@gmail.com; hoeltz@unisc.br;

Methodology: Fruit juice was extracted from the *C. reticulata* B. waste in a manual juicer. To determine the initial available amount of glucose and fructose in the liquid extract, high-performance liquid chromatography analysis was used. Temperature, pH and fermentation time were selected for the study of response surface methodology in a central composite design. Pectinolytic activity, reducing sugars and total proteins were used for bioprocess monitoring, and visible molecular absorption spectroscopy was used as the monitoring method.

Results: The highest amount of biomass was (47.06 g/L) obtained at 28°C, a pH of 6 and 8 days of culture. The application FT-IR spectroscopy associated with partial least squares regression enabled simultaneous quantification of the parameters of submerged cultivation, with a root mean square error prediction and a coefficient of determination of 0.0012 U/L and 0.9760, 0.23 mmol/L and 0.9956, and 0.03 g/d/L and 0.9957, respectively.

Conclusion: This is the first work that has monitored the biomass production of *A. bisporus* through FT-IR using the response surface methodology. The data showed that the liquid extract from *C. reticulata* B. waste is an excellent source of carbon for the mycelial production of *A. bisporus* and this may be an interesting alternative use of this residue.

Keywords: Mandarin; edible mushroom; mycelium; response surface methodology; bioconversion; FT-IR.

1. INTRODUCTION

Millions of tons of *Citrus* sp. waste are generated annually worldwide [1]. The production of juices generates waste in the form of peels, pulp and seeds, which represent 50% of the initial mass of the fruit [2]. Another example of generating such waste comes from the extraction of essential oils from the fruit peel of the green mandarin (*Citrus reticulata*); after this process, the entire fruit is practically discarded. The most commonly used method for the recovery of waste from *Citrus* sp. in the agro-industry is to transform it into pelletized meal for animal feed [1,2]. However, the drying cost is a limiting factor in these processes, and the amount of untreated waste released into the environment poses a serious environmental problem [3,4].

One of the main characteristics of this waste is the high content of soluble and insoluble carbohydrates and moisture, making it a potential energy source for biological conversion into higher value-added products—for example, as microbial biomass [1,5]. Several biopolymers, such as enzymes (invertase, glucosidases), nucleotides, proteins (mannoproteins) and especially polysaccharides (glucans, mannans, galactans), as well as lipids such as phospholipids and ergosterol [6] can be extracted from fungal biomass.

The most common method of obtaining microbial biomass is through submerged fermentation (SmF) or submerged cultivation (SmC) because

it is a faster alternative to the cultivation of filamentous fungi [7-9]. Using agro-industrial waste in SmC has been successfully employed for the cultivation of *A. bisporus* mycelium. This species has nutraceutical potential for the production of food for human and animal consumption because its biomass contains bioactive substances with antimicrobial, anti-tumor, anti-carcinogenic, and antioxidant properties as well as immune system activators and liver protectors, making it a functional food [10-12].

The study of microbial behavior on the substrate and growth conditions is critical to achieve optimum conditions to obtain the desired bioproduct. In this context, response surface methodology (RSM) has been increasingly used to understand and optimize fermentation processes [13,14]. It is a powerful technique to test multiple variables because fewer experimental trials are needed compared to the study of one variable at a time. In addition, this technique can identify and quantify interactions among variables [15].

Among the various classes pertaining to the RSM, planning by Central Composite Design (CCD) is the most accepted because it offers a great deal of information about the model studied, revealing the experimental error of the model with a relatively small number of experiments [16]. This methodology has enabled the optimization of macromycete bioproducts for industrial use, such as *A. blazei* and *A. bisporus* [15-17].

The monitoring of the bioconversion is essential to control and ensure maximum efficiency of the fermentation process. The search for sensitive analytical techniques that are efficient and have a low environmental impact, in this context, has been achieved by Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR), wherein compound identification and analysis of mixtures is based on vibrational movements [13]. This analytical technique is constantly developing because it provides fast analysis with a high yield without destruction of the sample [18,19]. Moreover, its use in the fermentation processes is being increasingly exploited because it allows for the monitoring of complex biological processes in real time [20-22].

The purpose of this research study was to use the liquid waste of *C. reticulata* B. to obtain a biomass of *A. bisporus* by employing the RSM and to monitor its efficiency with diffuse reflectance infrared Fourier transform spectroscopy (DRIFTS).

2. MATERIALS AND METHODS

The microorganism used in this study was a commercial strain of *A. bisporus*, and the mycelium was maintained on potato dextrose agar (PDA) with subculturing. Samples of *C. reticulata* B. waste were kindly provided by the cooperative of Ecological Citrus Growers of the Vale do Caí - Ecocitrus, located in southern Brazil.

2.1 Inoculum Preparation

The inoculum was obtained according to the methodology proposed by Carvajal and Koehnlein [23]. Samples of five, 5-mm disks of mycelial agar BDA (7 days, 28°C) were transferred to Erlenmeyer flasks (250 mL) containing 50 mL of sterile broth (121°C, 15 min) composed of the following: 40 g/L glucose, 3 g/L yeast extract, 3 g/L bacteriological peptone, 0.5 g/L K₂HPO₄, 0.3 g/L MgSO₄·7H₂O, and 1 L of deionized water. Incubation was performed with stirring at 150 rpm in a shaking/rotating incubator, at a temperature of 28°C, for a period of seven days.

2.2 *C. reticulata* Waste as a Carbon Source

Fruit juice was extracted from the *C. reticulata* waste in a manual juicer. To determine the initial available amount of glucose and fructose in the

liquid extract, high-performance liquid chromatography analysis was used. The analysis was conducted in Shimadzu equipment with an isocratic pump, model LC-20AT, and a diode array detector, DAD - M 20A, with a 30 cm Rezex™ RHM monosaccharide H+ column, at a temperature of 85°C, a flow of 0.6 mL/min of mobile phase milli-Q water, and an injected sample volume of 20 µL.

2.3 Submerged Cultivation (SmC)

The means for SmC preparation were similar to the stock preparation for preparing the inoculum but without the addition of glucose, and the liquid extract of *C. reticulata* was used in place of water. Erlenmeyer flasks (250 mL, triplicate) containing 50 mL of this sterile broth (121°C, 15 min) were inoculated with the mycelial suspension (inoculum) to 5% (v/v). The incubation was performed under continuous stirring at 150 rpm. The control was carried out without the addition of inoculum.

After the incubation period, the mycelium was dried at 45°C and was weighed to a constant weight, thus determining whether it reached biomass yield (g/L). A fraction of the liquid medium was analyzed for the final concentration of glucose and fructose through HPLC. Another liquid fraction was withdrawn and kept cool for subsequent monitoring analysis.

2.4 Experimental Design

The study of the optimization of the most significant variables of SmC was carried out using a statistical design (Table 1). Using Minitab software (version 17), a 23 factorial design was elaborated using the Central Composite Design (CCD) with eight factorial points, six axial points and six central points, totaling 20 trials.

The main effects of the variables and their interactions as well as data on the Analysis of Variance (ANOVA) were calculated. Response surface methodology was used to infer the best SmC conditions and provide an appropriate mathematical model for the biomass production process.

2.5 Monitoring

2.5.1 Determination of the content of reducing sugars (RS)

The method for determining the concentration of reducing sugars used in this study was adapted

from the method proposed by Miller [24], which uses DNS reagent (3,5-dinitrosalicylic acid) with a sensitivity range of 0.1 to 1.0 g/L for reducing sugars expressed as glucose.

2.5.2 Determination of the pectinolytic activity

For the determination of enzyme activities, the study used 100 μ L of each sample suspended in 900 μ L of a solution containing pectin extract at 5 mg/mL in a McIlvaine buffer with a pH level of 5.0, and the samples were incubated for 4 hours at 37°C for later analysis [25]. The enzymatic activities were determined as the amount of reducing sugar released, and a dinitrosalicylic acid method (DNS) was used for the analysis.

A pectinase unit (U) is defined as the number of micromoles of reducing sugars released per minute per ml of the sample under test conditions (U = μ mol RS/min).

2.5.3 Determination of total protein

The determination of total protein in the submerged cultivation was carried out by the Biuret method (Labtest Diagnostica SA, Lagoa Santa, Minas Gerais, Brazil).

2.5.4 Monitoring by FT-IR

Triplicate 10 μ L samples were diluted (at a 1:5 ratio of gross substrate: deionized water), added

to 10 μ L of potassium ferricyanide 10 g/L (internal standard) and scattered in stainless steel probes to uniformly cover the entire surface. Next, the samples were dried (60-65°C, 15 min) and then analyzed by DRIFTS in the range of 4000-450 cm^{-1} using 8 scan pulses and 4 cm^{-1} of resolution. An infrared Spectrum spectrophotometer 400 FT-IR/FT-NIR Spectrometer Perkin Elmer with a HeNe, 633-nm laser equipped with accessory diffuse reflectance (Pike Technologies, Madison USA) was used. The spectra were normalized by the amplitude of the vCN band, pre-processed by the sample via multiplicative light scattering and by variable via centering means in the medium and analyzed by partial least squares regression (PLS) together with the respective RS, PA and TP values, with cross-validation of one-by-one mutual exclusion using Pirouette 4.0 software.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1 *C. reticulata* Waste as Carbon Source

The initial glucose concentration in the control sample for SmC was 31.69 g/L. For fructose, the value was 37.33 g/L. The glucose value at the beginning of the process was close to that used by Carvajal and Koehnlein [23] in the cultivation of *Agaricus brasiliense* (40 g/L). In general, there was preferential utilization of glucose during SmC, which is consumed in its entirety in almost

Table 1. Observed and predicted responses obtained for the central composite design

Run	X_1	X_2	X_3	Biomass (g/L)	
	temperature (C°)	pH	time (days)	Actual value	Predict value
1	33	7.5	4	5.80	3.21
2	23	7.5	4	3.85	2.85
3	28	6	8	34.56	39.52
4	28	6	12	37.19	34.70
5	23	7.5	12	21.71	25.76
6	28	6	8	44.95	39.52
7	23	4.5	4	35.30	31.58
8	28	4.5	8	44.39	47.02
9	33	7.5	12	28.91	26.12
10	33	6	8	31.44	32.22
11	23	4.5	12	29.07	27.06
12	28	6	8	45.85	39.52
13	23	6	8	29.05	31.86
14	33	4.5	4	31.18	31.94
15	33	4.5	12	23.53	27.42
16	28	6	8	34.38	39.52
17	28	6	4	18.15	24.87
18	28	6	8	47.06	39.52
19	28	6	8	40.19	39.52
20	28	7.5	8	28.13	32.01

all experiments. Regarding fructose, the average consumption by *A. bisporus* during the submersion process was 13%.

Glucose is considered the best source of carbohydrate for the production of exopolysaccharides associated with fungal biomass in SmC [26,27]. However, variations in the type of carbohydrates assimilated may occur as the studied microorganism [28].

3.2 Submerged Cultivation (SmC)

The CCD was used to identify the optimum levels and interaction of the selected factors. The results are shown in Table 1. Experiment 18 showed the highest biomass response, with 47.60 g/L. The lowest value was found in experiment 2. Multiple regression analysis was used to analyze the data; thus, the polynomial equation was derived from regression analysis as follows:

$$\text{Biomass (g/L)} = -160.4 + 16.78 X_1 - 14.15 X_2 + 4.34 X_3 - 0.299 X_1^2 - 0.628 X_2^2 + 1.143 X_1 X_3 \quad (1)$$

As observed in Table 1, the highest results for fungal biomass production were obtained in experiments related to the central point, which corresponds to 8 days of fermentation at a pH level of 6 and at 28°C. The greatest amount of biomass obtained was 47.06 g/L, and the lowest

value was 3.85 g/L. In considering the central points, the average yield of biomass reached was 41.17 ± 5.68 g/L. These values were highest than those reached by Kim et al. [12] who used sugar cane extract as a source of carbohydrate at a concentration of 30 g/L and obtained 15.0 g/L (dry weight) of biomass of *A. bisporus*. This

was also higher than the results found by Liu and Wang [15], who evaluated the biomass production of *A. blazei* according to different concentrations of glucose, yeast extract and peptone through response surface methodology. Their best result for biomass was 10.86 g/L, with the consumption of 26.30 g/L of glucose.

Thus, the availability of glucose and fructose in the liquid extract of *C. reticulata* demonstrates the potential use of this waste as a source of carbohydrates because it is easily assimilated for the biological conversion by *A. bisporus* and does not need pretreatment for providing these sugars.

Using ANOVA, the model for biomass response was verified, and the results are represented in Table 2. The R^2 value closer to unity, significant model F value, insignificant lack-of-fit F value, and a standard deviation less than 10 in all cases implied that the model was significant. The calculated R^2 value of 0.897 for biomass production showed improved correlation between the observed and predicted response. The R^2 value was always between 0 and 1. The closer the R^2 is to 1, the stronger the model and better it predicts the response. The P values represent the significance of the coefficients and are also helpful in understanding the pattern of the mutual interactions between the variables. The value of Prob>F less than 0.05 indicates that the model terms are significant. X_2 , X_3 , X_1^2 and X_2X_3 are

significant models in this case.

In Fig. 1, it is possible to determine the influence of pH versus time in the growth of *A. bisporus* in the liquid extract of *C. reticulata* waste at the time intervals of 4, 8 and 12 days. After four days of the process, the analysis reveals a more

Table 2. Analysis of variance for the response of biomass

Source	Sum of square	DF*	Mean square	F value	Prob>F
Model	2436.35	9	270.70	9.68	0.001
X_1	776.70	1	0.353	0.01	0.913
X_2	563.55	1	563.55	20.15	0.001
X_3	212.80	1	212.79	7.61	0.020
X_1^2	911.39	1	137.65	4.92	0.051
X_2^2	70.05	1	3.09	0.11	0.746
X_3^2	256.09	1	256.08	9.16	0.013
X_1X_2	44.23	1	44.22	1.58	0.237
X_1X_3	1.83	1	1.83	0.07	0.803
X_2X_3	376.07	1	376.06	13.45	0.004
Residual	279.69	10	27.97		
Lack of fit	118.05	5	23.61	0.73	0.631

* Degrees of freedom

Significant decrease in biomass production as opposed to the increase in pH. The highest values of the biomass are given after 8 days of the process. After 12 days, the influence of pH on the biomass production decreases considerably. This is possibly due to the adaptation of *A. bisporus* to the conditions of the medium and long process time (12 days). However, this condition showed the worst performance in the production of biomass through submerged cultivation.

To produce biomass for subsequent isolation of the chitin synthase enzyme contained in the cell walls of *A. bisporus*, Hänslér et al. [9] employed submerged fermentation for 6 days, corresponding to the log phase of the microorganism at a temperature of 28°C and used a more acidic medium, with a pH level of 5.3. Kim et al. [12] obtained the best growth results of *A. bisporus* in the liquid phase at a temperature of 28°C and at an initial pH of 6.0. However, these authors used *A. bisporus* Suksung, a strain adapted for submerged fermentation that produces a high biomass yield in a specific medium.

The response surfaces for biomass are shown in Fig. 2. These surfaces provide a visual interpretation of the interaction between the two variables being a variable maintained at the central point and facilitating the location of the optimal conditions of the experiment. Fig. 2A shows the effect of temperature and time for producing biomass. It is possible to observe the small and not significant influence of the quadratic effect of the temperature and time on the response surface. Fig. 2B shows the effect of pH and time on biomass production,

demonstrating the reduction of biomass with increasing pH. The quadratic and linear effects can be observed simultaneously. Fig. 2C shows the effect of temperature and pH on the biomass response. The interaction of these two factors was not significant, although the response surface shows an increasingly negative effect on biomass production as the pH rises.

Thus, the response surface results once again show that the use of a culture medium with a more acidic initial pH (4.5) favors the production of the biomass of *A. bisporus* under the conditions tested. This information is important because it suggests that amounts of biomass can be obtained without significant losses in a 4- day cultivation period, favoring the applicability of SmC.

3.3 Monitoring of SmC

Fig. 3 shows the means of the two submerged culture FT-IR spectra with potassium ferricyanide ($K_3[Fe(CN)_6]$) as the internal standard. The multivariate model predicts the substrate and biomass correlation of the concentrations based on NIR spectra. The utility of the FT-IR spectroscopic technique in this work was the combination of chemometric methodology in rapidly classifying the liquid extract and confirmation of the measurement of its chemical constituents, as performed by Giordano, et al. [21] from biomass spectra and chemical constituent results. These data can be used to optimize the process for an industrial scale according to Liu and Wang [15] and Mao et al. [17] to obtain higher value-added products from the biomass [6].

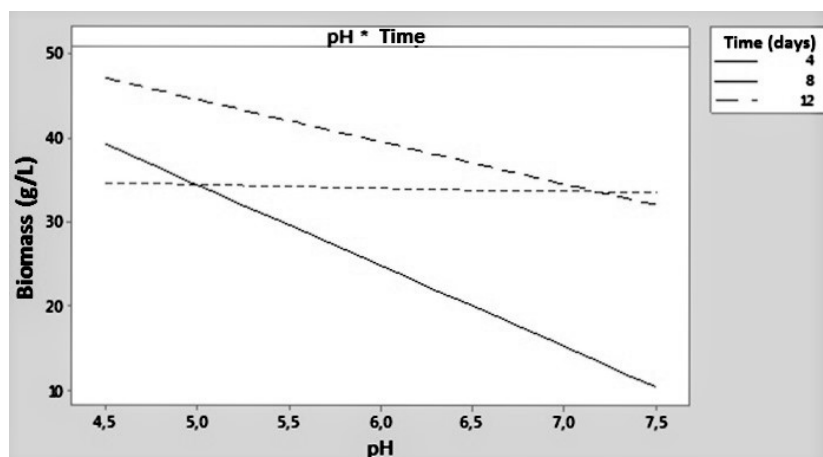


Fig. 1. *A. bisporus* biomass production as function of pH and time

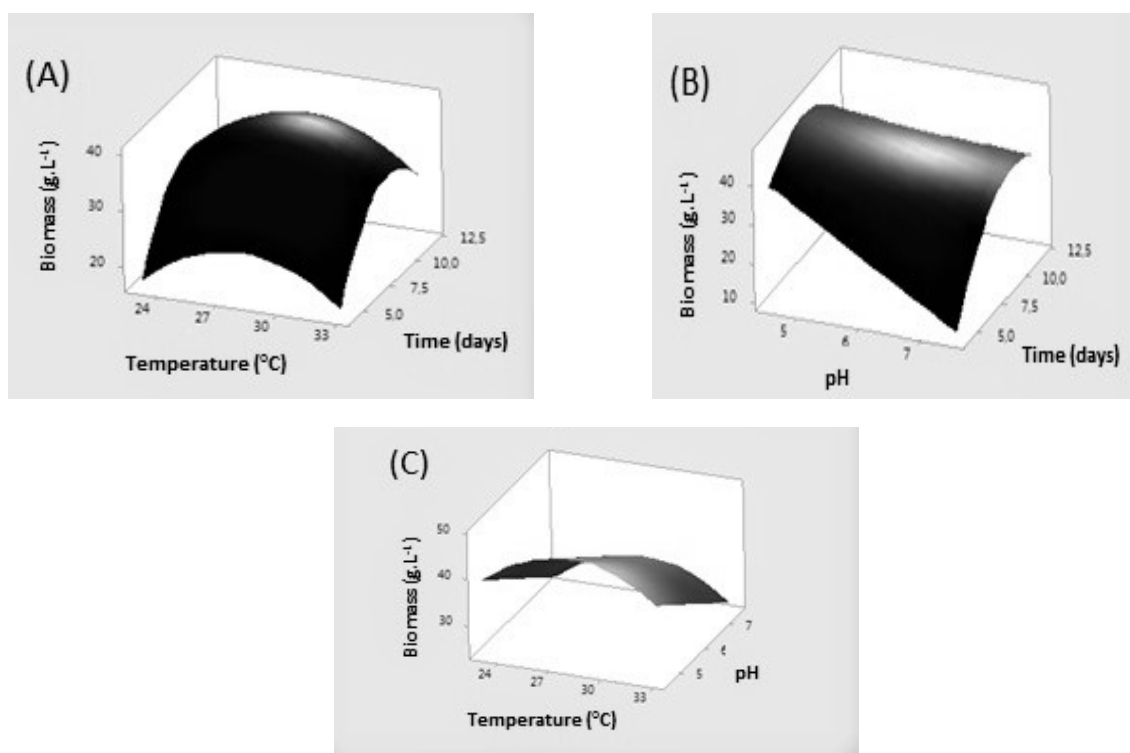


Fig. 2. Response surfaces of biomass through submerged fermentation of *A. bisporus* extract liquid waste of *C. reticulata* (LMW) as a function of (a) temperature and time, (b) pH and time and (c) temperature and pH. The factors that were not included in the axes were set at their optimum level

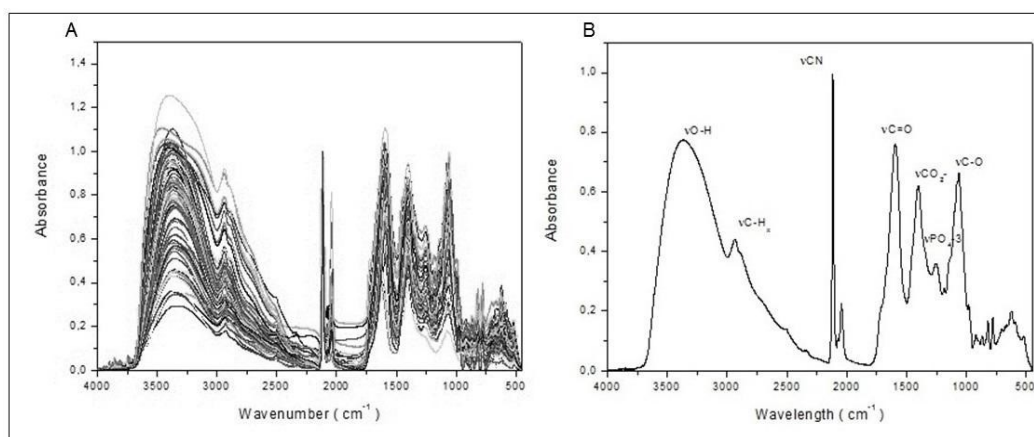


Fig. 3. The normalized spectrum DRIFTS of the submerged cultures containing the set of spectra (a) and the average SmC spectrum (b), both with the internal pattern of potassium ferricyanide in the region of 4000-450 cm⁻¹

The first spectrum shows the set of spectra obtained for SmC. Fig. 3B presents the average value of all these spectra analyzed as well as the average value of all the analyzed spectra. In Fig. 3A, it is possible to view the set of spectra

obtained for SmC. Fig. 3B presents the average value of all these spectra analyzed as well as the average value of all the analyzed spectra. In Fig. 3A, it is possible to view the set of spectra

characterized by the presence of two protein bands, one at 1650 cm⁻¹ (νC=O called band amide I) and another at 1398 cm⁻¹ (νC-O, characteristic of peptidic groups in proteins), a phospholipid band at 1250 cm⁻¹ (νas P=O), and a polysaccharide band at 1200 cm⁻¹ (νC-O-C) since it is possible to determine the presence of sugar bands, which are present in regions between 2500 cm⁻¹ and 3300 cm⁻¹ (νC-H e νC- OH) [22].

The region between 2000 and 2200 cm⁻¹ is assigned to the CN stretch present in potassium ferricyanide, presenting a complex set of bands, two being more intense (2000 and 2200 cm⁻¹). The FT-IR spectra reflect a complex mixture of wavelengths and absorption intensities. It is often difficult to find a single absorption band that can serve as a basis for quantifying a single component.

Based on the spectra, DRIFTS-PLS models were developed for the quantification of pectinolytic atividate (PA), reducing sugars (RS) and total proteins (TP) present in the submerged liquid culture using *C. reticulata* extract. Table 3 shows that it was possible to obtain prediction models for the concentration of PA, RS and TP through FT-IR with good statistical quality. The values obtained for the root mean square error of prediction (RMSEP) and coefficients of determination (R²) for PA, RS and TP were 0.0012 U/mL and 0.9760, 0.23 mmol/L and 0.9956 and 0.03 g/dL and 0.9957, respectively. These values are within the acceptance criteria compared with those obtained in other studies of biological systems.

The liquid extracts had their compositions changed due to the production of biomass. With more biomass produced, there was a greater change in culture medium. This was identified by

spectra analysis, confirming the negative influence of pH on the production of biomass. The RMSe indicated the highest biomass yield at eight days of fermentation in the liquid extract. Additionally, a reduction of the substrate can be observed when analyzing the reducing sugars and correlating them with the FT-IR spectra, thus corroborating the results found in the analysis.

These data support the analysis conducted with the liquid extract and demonstrate that the complex composition of the samples analyzed by FT-IR correspond to the compositions shown by chemical methods. Although monitoring the fermentation processes through FT-IR using bacteria or filamentous fungi is analytically more difficult than monitoring unicellular microorganisms, the basis of these processes are subjected to vigorous agitation and aeration and also possess a highly viscous culture medium, with a fluid that presents non-Newtonian rheological behavior, even of those that have been increasingly studied. The analysis of parameters that can be consumed (carbohydrate sources such as glucose, fructose, and lactate) or produced (protein sources, such as ammonia, glutamate, amino acids, and enzymes) during the SmC are used in industrial level bioprocesses, especially when the objective is real-time monitoring [20].

The combination of two well-known techniques leads to improved online applications using FT-IR, even if the two methods show large uncertainty when applied separately [19]. In this sense, the results shown demonstrated an excellent correlation between the spectral data and presence of reducing sugars and total proteins, confirming that the PLS technique aided in the recognition of the substrate composition compared with biomass formation.

Table 3. Model figures of merit PLS / FT-IR submerged culture parameters

	Range	RMSECV/REP	R ^{2**}
PA			
Cal	0.001-0.032	0.0025	0.9122
Val	0.002-0.031	0.0012	0.9760
RS*			
Cal	1.21-18.89	0.11	0.9997
Val	2.48-15.38	0.23	0.9956
TP*			
Cal	0.06-5.65	0.08	0.9979
Val	0.08-1.51	0.03	0.9957

RMSECV = root mean square error of cross-validation; *with baseline correction; R² = calibration coefficient of correlation and cross-validation

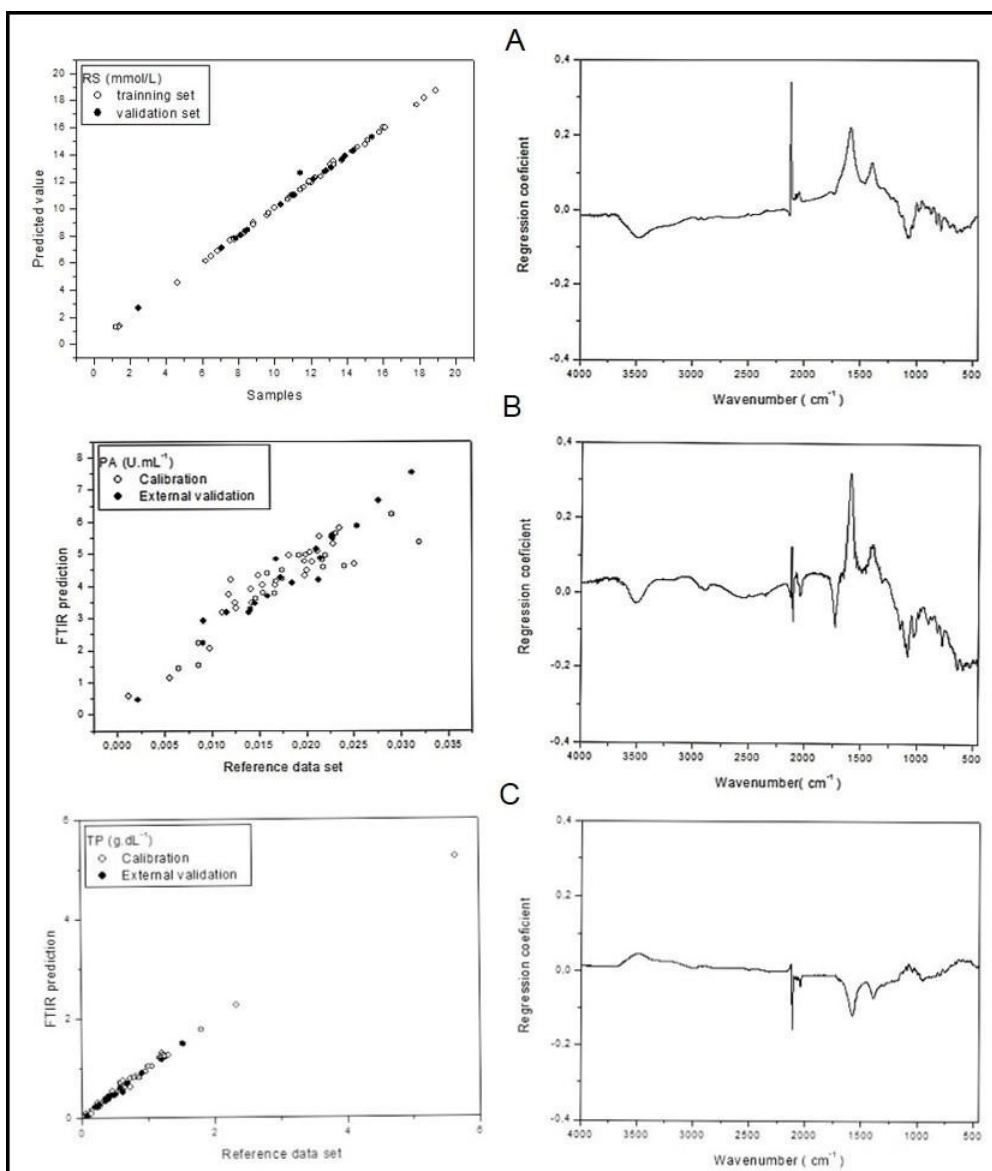


Fig. 4. Shows the correlation curves between the samples for the calibration and validation for RS (Fig. 4A) PA (Fig. 4B) and TP (Fig. 4C) values tabulated with the values predicted by the PLS model, and also with their respective regression vectors

4. CONCLUSION

The use of liquid extract from *C. reticulata* waste proved to be an excellent source of carbon for the biomass production of *A. bisporus*, obtaining the maximum value of 47.06 g/L. SmC optimization using the liquid extract of *C. reticulata* waste was statistically validated for predictive purposes, and response surfaces indicated the interaction between the pH and time, demonstrating that the use of the pH level

of 4.5 can produce more biomass than the pH level of 6, and the maximum biomass yield was achieved under the conditions of 28°C, an initial pH of 6 and an 8-day cultivation period. Employing FT-IR for monitoring the bioprocess was effective; however, it is understood that the analysis should be further optimized for this purpose. This opens the opportunity for mycelial production of *A. bisporus* and products derived from the liquid waste of *C. reticulata* as well as faster, eco-friendlier monitoring with FT-IR.

Available online at www.sciencedirect.com

SCIENCE @ DIRECT®

Industrial Crops and Products 19 (2004) 225–230

INDUSTRIAL CROPS
AND PRODUCTS
AN INTERNATIONAL JOURNALwww.elsevier.com/locate/indcrop

Submerged production of edible mushroom *Agaricus bisporus* mycelium in ram horn hydrolysate

E.B. Kurbanoglu^{a,*}, O.F. Algur^a, A. Zulkadir^b^a Department of Biology, Science and Letters Faculty, Atatürk University, 25240 Erzurum, Turkey^b Department of Horticulture, Agriculture Faculty, Atatürk University, 25240 Erzurum, Turkey

Received 23 January 2002; accepted 16 October 2003

Abstract

The production of the fungus *Agaricus bisporus* ATTC 10893 was studied in submerged fermentation with horn hydrolysate as the main substrate source. First, horns were ground and 35 g of the horn powder were chemically hydrolyzed (acid hydrolysis). As a result of this process, 30 of the 35 g horn powder (85.7%) could be hydrolyzed. Hydrolyzed material was completed to 400 ml with deionized water and this resulting solution was termed as crude horn hydrolysate (CHH). The contents of protein, nitrogen, ash, some minerals, total sugars, total lipids and amino acids of CHH were determined. It was found that it has both organic and inorganic materials sufficient for use as a substrate in the production of *Agaricus bisporus* mycelium. The CHH was enriched by addition of glucose and KH_2PO_4 . The effects of different concentrations (1–7% v/v) of CHH on the growth of *A. bisporus* were investigated and 2% of the CHH (Horn Broth = HB) was found to be optimal. The HB contains 20 g of glucose, 20 ml of CHH and 1 g of KH_2PO_4 per liter of laboratory quality water. The optimum growth conditions for the *A. bisporus* in HB were as follows: Initial pH: 6; temperature: 26°C; fermentation time: 8 days and agitation: 150 rpm. Under these optimal conditions, initial carbohydrate content of HB was reduced from 2.02 to 0.2% and the biomass yield was 10.8 g l^{-1} . The biomass contained about 47.1% of protein, 5.8% of fat and 7.9% of ash (on a dry-weight basis). Amino acid content of biomass was compared with both the FAO standard and fruiting body. The biomass contained all of the essential amino acids but the amounts of the essential amino acids were somewhat lower than that of the FAO standard, while it was comparable with that of fruiting body. The results with HB were also compared with previously reported data on edible mushroom mycelium grown on some substrates. It was found that HB could be used as a substrate for the production of *Agaricus bisporus* mycelium.

© 2003 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: *Agaricus* spp.; Submerged production; Ram horn; Fibrous proteins; Edible mushrooms

1. Introduction

Edible mushrooms, especially the *Basidiomycetes*, are widely utilized as human foods (Chang, 1980).

Traditionally, nutritional studies on edible mushrooms have focused on their fruiting bodies (Litchfield, 1967; El-Kattan et al., 1991). However, the growth of an edible mushroom is a lengthy and complex process involving the use of composts or lignocellulosic wastes such as straws followed by a long cultivation period (Solomons, 1975). The potential of mushroom as fungal protein, source of spawn or flavoring

* Corresponding author. Tel.: +90-442-2314342;

fax: +90-442-2360948.

E-mail address: ekurbanoglu@yahoo.com (E.B. Kurbanoglu).

agents makes the production of fungal mycelium in submerged liquid culture a most attractive prospect. Mushroom mycelia cultivated by submerged fermentation also have the potential to be used in human diet (Yitzhak and Ephraim, 1986).

In recent years, cheap substrates such as cheese whey and peat extract are preferred in the production of edible mushroom mycelium (Kosaric and Miyata, 1981; Martin, 1982). Ram horns make up a large amount of the waste products of the meat industry in Turkey. For example, horns from slaughterhouses in Turkey are about 600 tons per year. Increasing concern about pollution that occurs from agricultural and industrial wastes has stimulated interest in converting waste materials into commercially valuable products, especially SCP (Leman et al., 1990). Furthermore, it was noted that fibrous proteins such as horn, feather, nail and hair are abundant waste products and these waste products can be converted to biomass, protein concentrate or amino acids using proteases derived from certain microorganisms (Atalo and Gashe, 1993). Ram horns consist of keratin and this keratin is relatively rich in cysteine. In addition, they contain most of the common amino acids (Lehninger, 1975; Baden and Kubilus, 1983a,b; Atalo and Gashe, 1993).

Until now, ram horn hydrolysate has not been investigated as substrate for fungi, and its use in industrial processes is poor. It was assumed that horn material could be used as a raw material for the production of mycelium. For this reason, we investigated the possibility of growing *A. bisporus* in submerged fermentation, comparing the chemical compositions of mycelium and fruiting bodies.

2. Materials and methods

2.1. Organism and horn

Agaricus bisporus ATTC 10893 was obtained from Dr. A. Zülkadir (Faculty of Agriculture, Atatürk University, Erzurum, Turkey). Ram horns were obtained from Erzurum slaughterhouse in Turkey.

2.2. Hydrolysis procedures of horn and preparation of medium

Ram horns were washed with deionized water and dried in an oven at 100 °C. The dry horns were cut into

smaller pieces and ground with a grinder (Wiley-mill, Arthur, USA). The material was termed horn powder (HP). Thirty-five grams of the HP were impregnated with 50 ml of 6N HCl. The mixture was incubated at 80 °C for 24 h. At the end of this period, 100 ml deionized water was added and the mixture was incubated at 130 °C for 1 h. The solution was then cooled to room temperature and pH adjusted to 7 with 10N NaOH. It was filtered twice through Whatman no. 1 filter paper. The volume was completed to 400 ml with deionized water. The final clear filtrate was termed as crude horn hydrolysate (CHH) and stored at 4 °C. As a result of this procedure, thirty grams of 35 g HP could be hydrolyzed. The various concentrations (1–7%) of the CHH was enriched by adding 2% glucose (Oxoid, UK) and 0.1% $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$ (Difco, USA). The pHs of the media were adjusted with 1N HCl and 1N NaOH. They were autoclaved at 121 °C for 15 min and tested for growth of *A. bisporus* mycelium.

2.3. Inoculum and cultivation

The inocula for shake-flask cultures were always prepared from fresh trypticase soy agar (Oxoid, UK) slopes. The entire growth three slopes were blended with 50 ml sterile distilled water for 30 s in a waring blender under aseptic conditions. An inoculum ratio of 5% (v/v) was used in all the processes. Three hundred milliliter erlenmeyer flasks containing 100 ml of broth media were placed in orbital shaking incubator (ROSI-1000 thermolyne). On the other hand, fruiting bodies were produced on sterilized wheat straw.

2.4. Analytical methods

Mycelial pellets and fruiting bodies were washed with distilled water, lyophilized, and ground. Amino acid analysis of CHH, fruiting bodies and biomass were carried out after hydrolysis with 6N HCl for 24 h in Biotronic LC-5001 Amino Acid Analyser (Germany). Total sugar content, dry matter and ash analysis were estimated by AOAC methods (1980). The total nitrogen content was calculated by the Kjeldahl method, and the percent protein content was determined by using the nitrogen content ($\text{N} \times 6.25$). Total lipids were estimated according to Folch et al. (1963). Ash was determined by combustion in a muffle furnace at 600 °C. The mycelial dry weight was calculated by

filtering the culture medium through Whatman no. 1 filter paper and washed twice with distilled water and then dried in an oven at 105 °C and weighed. The total carbohydrate concentration was determined by the anthrone reagent method (Morris, 1948). The element composition was measured by atomic absorption spectrophotometer (UV HS-360, Germany).

Analytical grade chemicals were used in the experiments. All reported results are the averages of at least three determinations.

3. Results and discussion

3.1. Chemical composition and optimal concentration of CHH

The main chemical composition of CHH is shown in Table 1. These data show that CHH to be rich in both organic and inorganic materials. Notably, it contains the substances required in microbial media such as the sources of carbon, nitrogen and minerals. The detailed amino acid composition of CHH is also given in Table 1. CHH is rich in amino acids. The essential amino acids are present and among them arginine is the highest (4.66 mg ml⁻¹). However, of all the amino acids considered, glutamic acid was the most abundant (8.17 mg ml⁻¹). The absence of tryptophan and

proline was probably due to their degradation during the acid hydrolysis of the proteins, because the hydrolysis procedures did not allow the determination of the secondary amino acids such as proline (Lehninger, 1975).

The chemical composition of CHH is in accordance with the findings obtained from the investigations on the elemental and amino acid composition of the various fibrous proteins such as nail (Pruzanski and Armon, 1966; Vellar, 1970; Alexiou et al., 1980; Bank et al., 1981), fish epidermis (Baden and Kubilus, 1983a) and bovine hoofs (Baden and Kubilus, 1983b). On the other hand, protein hydrolysates are made either by using acid hydrolysis or enzymatic digestion of proteins. Acid hydrolysis allows high yields, however, this process results in high ash content in the final products as neutralisation step cannot be avoided (Dufosse et al., 1997).

First, we investigated the effect of CHH in various concentrations (1–7% v/v) on the growth of mycelium of *A. bisporus* and the highest yield (9.8 g l⁻¹) was obtained from 2% of the CHH (Fig. 1). The biomass yields decreased with increasing concentrations of CHH and an inhibition effect was observed above 2.5%. The inhibitory effect may be due to the high biological oxygen demand (BOD) load of CHH and presence of cell wall cations and some toxic materials.

Table 1
The main chemical composition of CHH

Components (g/100 ml CHH)		Amino acids (mg ml ⁻¹)	
Nitrogen	0.881	Aspartic acid	3.90
Protein	5.500	Threonine	2.00
Dry matter	12.80	Serine	2.87
Ash	4.98	Glutamic acid	8.17
Total sugar	0.500	Glycine	5.19
Total lipids	0.300	Alanine	3.19
Mg	0.160	Cysteine	0.21
Ca	0.164	Valine	2.56
Cu	0.017	Methionine	0.41
Mn	0.036	Isoleucine	1.63
Zn	0.064	Leucine	4.02
Fe	0.123	Tyrosine	1.61
K	0.113	Phenylalanine	1.67
		Histidine	0.72
		Lysine	2.21
		Arginine	4.66
		Proline	0.0

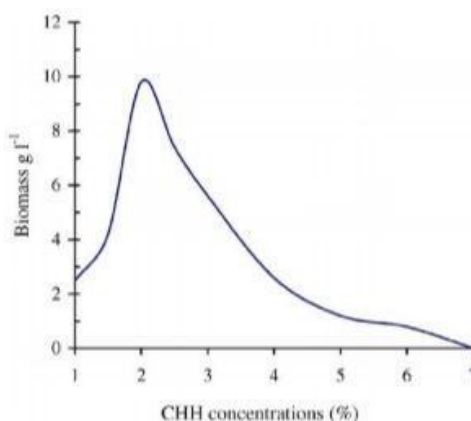


Fig. 1. Effect of different CHH concentrations on the growth of *A. bisporus*. Fermentation conditions: temperature 25 °C; agitation 150 rpm; incubation time 8 days; pH 5.

Similar effects have been observed from effluents with high loads of organic and inorganic materials (Kadioglu and Algur, 1992). Therefore, 2% concentration of CHH was termed as horn broth (HB) and used in all experiments. HB contains (l^{-1}): 20 g of glucose, 20 ml of CHH and 1 g of KH_2PO_4 per liter of laboratory quality water. The amount of HP that is used is 35 g and the amount of HP that is hydrolyzed is 30 g. According to these results, 85.7% of horn can be evaluated as a substrate source in the production of *Agaricus bisporus* mycelium.

3.2. Optimal pH and temperature

Fig. 2 shows effect of initial pH and temperature on growth of fungal mycelium. The highest biomass yields were obtained from the applications of pH 6 and 26 °C. The biomass yields for these applications were found to be 10.2–10.8 $g\ l^{-1}$, respectively. Similarly, some workers have reported that different initial pH and temperature have an important effect on the yield of mushroom mycelium and these effects are to be depend on species, culture medium and particular fermentation conditions (Litchfield et al., 1963; Kosaric and Miyata, 1981). On the other hand, investigations on *Agaricus* spp. showed that optimal temperature and

initial pH for the growth of mycelium ranged 15–35 °C and 4–7, respectively (Litchfield, 1967; Peter and Cheung, 1996). These results are in accordance with our findings.

3.3. Fermentation time and agitation

Using the best values previously observed for pH and temperature, experiments were conducted to determine biomass yields at different agitation rates and fermentation times. Fig. 3 shows the biomass yields obtained from three different agitation rates for different times. The highest biomass yield (10.8 $g\ l^{-1}$) was obtained from 150 rpm for 8 days. This yield is similar to that of Shannon and Stevenson (1975). However, about the same biomass value (10.1 $g\ l^{-1}$) was observed at 100 rpm for 12 days. The biomass yields for 200 rpm was lower. This result may be caused from the detrimental effect of increased oxygen and shear stress on the mycelium. Under obtained optimal fermentation conditions, initial carbohydrate content was reduced from 2.02 to 0.2%. As a result, *A. bisporus* used about 90% of carbon source. Per liter HB contains 1.5 g of hydrolyzed HP (20 ml CHH) and this material could be converted to 10.8 g biomass.

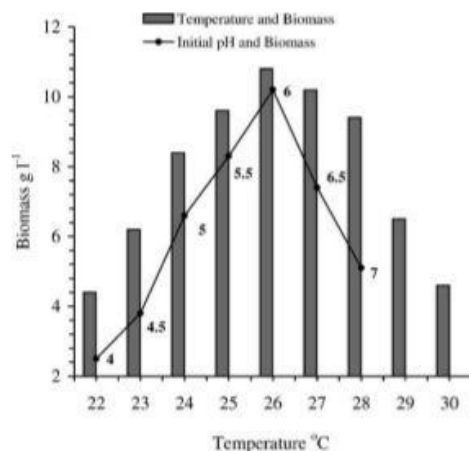


Fig. 2. Effect of initial pH and temperature on the growth of mycelium in HB.

Table 2
General composition of several edible mushroom myceliums grown on various substrates

Amino acids	Mycelium ($mg\ g^{-1}$)	Fruiting bodies ($mg\ g^{-1}$)	FAO ($mg\ g^{-1}$)
Aspartic acid	29.8	22.6	–
Threonine	23.6	26.6	40
Serine	16.8	14.8	–
Glutamic acid	30.1	28.4	–
Glycine	18.4	16.6	–
Alanine	18.6	13.6	–
Cysteine	23.4	18.4	20
Valine	28.5	33.5	42
Methionine	17.6	10.6	22
Isoleucine	24.8	26.8	42
Leucine	8.4	7.1	48
Tyrosine	14.4	12.2	–
Phenylalanine	22.6	16.6	28
Histidine	38.1	33.3	–
Lysine	36.2	32.2	42
Arginine	23.4	26.4	–
Proline	16.4	19.4	–

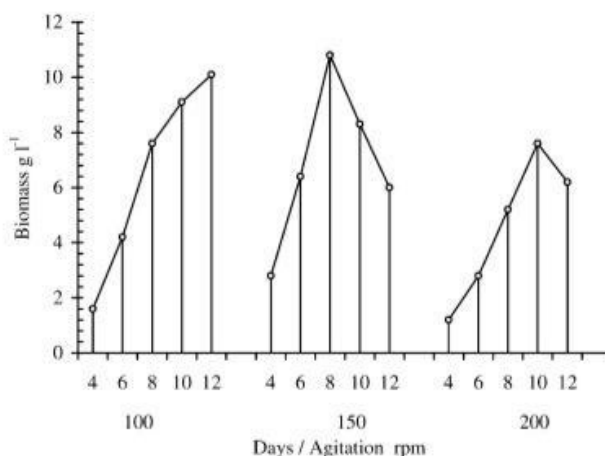


Fig. 3. Effect of fermentation time and agitation on the biomass yield of *A. bisporus* in HB. Fermentation conditions: temperature 26°C; pH 6.

3.4. The chemical composition of mycelium

For comparison, the general composition of the mycelium and fruiting bodies are presented in Table 2 together with data of other workers. The protein content of *A. bisporus* mycelium was 47.1% of dry matter. Compared with the fruiting body, a few higher proteins content was obtained when HB was used as a substrate for growth of mycelium. Also, the rate of protein content of mycelium obtained from HB was high compared with that of other sources. Kosaric and Miyata

(1981) reported that protein content varies depending on the substrate and *Morchella hybridia* contains only 10.5% protein when grown in synthetic glucose medium, but 34.8 and 37.5% when grown in molasses and waste sulphite liquors, respectively. These suggestions are in accordance with our findings. According to these results, HB represents a good potential for the production of *A. bisporus* mycelium.

If the biomass might be used for human or animal feeding, the ash content of mycelium is important (Kosaric and Miyata, 1981). So, the ash content

Table 3
Amino acid composition of mycelium and fruiting bodies of *A. bisporus*

Species and growth stage	Substrates	% content (dry weight basis) of:			Reference
		Protein	Fat	Ash	
<i>Morchella crassipes</i> (Mycelium)	Glucose (synthetic)	30.6	3.07	— ^a	^b
<i>A. campestris</i> (Fruiting bodies)		46.3	2.8	7.8	^c
<i>Morchella crassipes</i> (Mycelium)	Cheese whey base	45.1	5.13	8.53	^d
<i>A. campestris</i> (Mycelium)	Peat extract medium	44.4	2.8	9	^e
<i>A. bisporus</i> (Fruiting bodies)		45.9	2.7	7.6	This work
<i>A. bisporus</i> (Mycelium)	Horn hydrolysate base	47.1 ± 1.5	5.8 ± 0.7	7.9 ± 0.6	This work

^a Data not reported; Mean ± S.D.

^b Litchfield et al. (1963).

^c Kosaric et al. (1973).

^d Kosaric and Miyata (1981).

^e Martin and Bailey (1985).

of mycelium was determined and it was observed that this value is similar to that of other substrates except for peat extract medium (Table 2).

The amino acid compositions of mycelium and fruiting bodies of *A. bisporus* are presented in Table 3. FAO protein reference is provided alongside. The mycelium contains all of the essential amino acids, but essential amino acids are somewhat lower than of FAO reference protein. However, the amino acid composition of mycelium was better than that of fruiting body. Notably, some essential amino acids (leucine, phenylalanine, histidine and lysine) and sulphur containing amino acids (methionine, cysteine) were higher than that of fruiting bodies. It was reported that the essential and sulphur containing amino acid composition of a protein determines its potential nutritional value (Nigam, 1998; Shojaosadati et al., 1999). Therefore, it is possible to produce mycelium of *A. bisporus* on HB medium in a short time by fermentation. Because of the abundance and availability of ram horns and problems of disposal associated with environment pollution, it is of economic interest to convert the organic materials.

Acknowledgements

This work was supported by the Department of Biotechnology, Science and Letters Faculty, Atatürk University.

References

- Alexiou, D., Koutselinis, A., Manolidis, C., 1980. The content of trace elements (Cu, Zn, Fe, Mg) in fingernails of children. *Dermatologica* 160, 380–382.
- AOAC., 1980. Official Methods of Analysis, 13th ed. Association of Official Agricultural Chemist, Washington, DC.
- Atalo, K., Gashe, B.A., 1993. Protease production by a thermophilic *Bacillus species* which degrades various kinds of fibrous proteins. *Biotechnology Lett.* 15, 1151–1156.
- Baden, H.B., Kubilus, J., 1983a. The fibrous protein of fish epidermis. *J. Invest. Dermatol.* 80, 36–38.
- Baden, H.B., Kubilus, J., 1983b. Fibrous proteins of bovine hoof. *J. Invest. Dermatol.* 81, 220–224.
- Bank, H.L., Robson, J.B., Bigelow, J.B., Morrison, J., Spell, L.H., Kantor, R., 1981. Preparation of fingernails for trace element analysis. *Clin. Chim. Acta* 116, 179–190.
- Chang, S.T., 1980. Mushrooms as human food. *Bioscience* 30, 399–401.
- Dufosse, L., De La Broisse, D., Guerard, F., 1997. Fish protein hydrolysates as nitrogen sources for microbial growth and metabolite production. *Recent Res. Dev. Microbiol.* 1, 365–381.
- El-Kattan, M.H., Afify, A.S., Aly, A., Z.M., 1991. Evaluation of *Pleurotus sajor-caju* fungal pellets as food. *Mushrooms J. Trop.* 11, 13–22.
- Folch, J., Less, M., Sloane-Stanley, M., 1963. Isolation and purification of total lipids from tissues. *Biol. Chem.* 226, 497–509.
- Kadioglu, A., Algur, O.F., 1992. Tests of media with vinasse for *Chlamydomonas reinhardtii* for possible reduction in vinasse pollution. *Bioresource Technol.* 42, 1–5.
- Kosaric, N., Miyata, N., 1981. Growth of morel mushroom mycelium in cheese whey. *J. Dairy Res.* 48, 149–162.
- Kosaric, N., LeDuy, A., Zajic, J.E., 1973. Submerged culture growth of edible mushrooms on waste sulphite liquors. *Can. J. Chem. Eng.* 51, 186–190.
- Lehninger, A.L., 1975. *Biochemistry*, second edition. Worth Publishers Inc., 444 Park Avenue South, New York, p. 1104.
- Leman, J., Bednarski, W., Grewal, H.S., 1990. Single-cell protein: current status. *Indian J. Microbiol.* 30, 13–28.
- Litchfield, J.H., Overbeck, R.C., Davidson, R.S., 1963. Factors effecting the growth of morel mushroom mycelium in submerged culture. *J. Agric. Food Chem.* 11, 158–162.
- Litchfield, J.H., 1967. Submerged culture of mushroom mycelium. In: Pepler, H.J. (Ed.), *Microbial Technology*. Reinhold, New York, pp. 107–144.
- Martin, A.M., Bailey, V.I., 1985. Growth of *Agaricus campestris* NRRL 2334 in the form of pellets. *Appl. Environ. Microbiol.* 49, 1502–1506.
- Martin, A.M., 1982. Submerged growth of *Monchella esculenta* in peat hydrolysates. *Biotechnol. Lett.* 4, 13–18.
- Morris, D.L., 1948. Quantitative determination of carbohydrates with Dreyword's anthrone reagent. *Science* 107, 254–255.
- Nigam, J.N., 1998. Single cell protein from pineapple cannery effluent. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 14 (5), 693–696.
- Peter, C., Cheung, K., 1996. Dietary fiber content and composition of some cultivated edible mushroom fruiting bodies and mycelia. *J. Agric. Food Chem.* 44, 468–471.
- Pruzanski, W., Arnon, R., 1966. Determination of cystine and other amino acids in the fingernails of members of various ethnic groups in Israel. *J. Med. Sci.* 2, 465–467.
- Shannon, L.J., Stevenson, K.E., 1975. Growth of fungi and BOD reduction in selected brewery wastes. *J. Food Sci.* 40, 826–829.
- Shojaosadati, S.A., Khalilzadeh, R., Jalilzadeh, A., Sanaei, H.R., 1999. Bioconversion of molasses stillage to protein as an economic treatment of this effluent. *Resources Conserv. Recycl.* 27 (1/2), 125–138.
- Solomons, G.L., 1975. Submerged culture production of mycelial biomass. *Filamentous Fungi* 1, 249–264.
- Vellar, O.D., 1970. Composition of human nail substance. *Am. J. Clin. Nutr.* 23, 1272–1274.
- Yitzhak, H., Ephraim, C.A., 1986. Chemical composition of the edible mushroom *Pleurotus ostreatus* produced by fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* 51, 1352–1354.

Effects of supplementation on the mycelial ergosterol content of *Agaricus bisporus* grown on media formulated with olive oil subproducts.

Gonzalo Falcón-García¹, Pilar Carbonero-Aguilar², Olga Cremades³, Juan Bautista^{4*}

¹Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Pharmacy, Universidad de Sevilla, 41012-Sevilla, (Spain)

²Escuela Universitaria de Osuna, Osuna, 41640-Sevilla, (Spain)

Abstract— Supplementation is one of the most relevant procedures for mushroom growth modulation. Little is known about the influence of supplementation on the concentrations of metabolites with potential health benefits. Experiments on compost require long cultivation times. Similar composition has been detected in fruiting bodies and mycelia. Therefore, the mycelial composition can be assumed to be similar to that of the fruiting bodies. This study examines the effect of supplementing a minimal defined growth medium with components derived from olive oil industry subproducts on *A. bisporus* mycelial composition, primarily ergosterol, when grown on minimal defined liquid and solid media in an attempt to obtain a higher concentration of ergosterol (pro-vitamin D2).

A. bisporus supplemented with alperujo meal (ALPM) and olive leaf meal (OLM) led to higher ergosterol content than that of the fungi grown in non-supplemented media (5.64 ± 0.47 , 6.60 ± 0.86 and 4.08 ± 0.53 mg/g p.s. in MDLm and 5.36 ± 0.39 , 6.79 ± 0.41 and 4.22 ± 0.43 mg/g p.s. in MDSm). Western blotting was used to validate the cultivation results. Three proteins (ERG2, ERG6, and EGR11) involved in the ergosterol biosynthetic pathway were significantly upregulated, indicating the importance of supplementation to ergosterol biosynthesis.

This report represents the first comprehensive study on the protein expression profiling of supplementation studies directed to improve metabolites with potential health benefits in *A. bisporus*. It provides new insights and a better understanding of the development of cultivation processes directed to increase ergosterol biosynthesis. These results could be used to obtain mycelia with higher vitamin D2 content after irradiation with UVB light.

Keywords— *Agaricus bisporus*, cultivation medium supplementation, ergosterol, olive leaf meal, two-phase pomace.

I. INTRODUCTION

Until the last decades of the XX century, the growth of mushrooms on an industrial scale was based more on an art of cultivation than on scientific knowledge. It is known that mushroom growth is influenced by the composition of the growth media [1]. Supplementation is one of the most relevant of the different procedures used to modulate mushroom growth. This practice consists of adding specific substances to compost, during composting to increase nutrient availability and/or active substances, which, when consumed, improve performance and/or quality and probably increase the production of metabolites with health benefits. This technique was introduced in the 1960s [2]; [3]; [4], and from a practical point of view, some important aspects should be considered prior to its application, such as the types of nutrients required, the most suitable application time and economic costs and profits [5]. Most of the relatively few studies published on this topic focused on the productivity of the process. These processes result in yields that generally increase by 10–20% and occasionally by more [6], but little is known about the influence of supplementation on the concentration of metabolites with health benefits, such as ergosterol, ergothioneine, glucans, and chitin. Among the different raw materials that can be used for these purposes are agroindustrial subproducts such as cereal grain brands and meals, oilseed meals, cottonseed meal, and peanut oil and its derivatives, which contain varying amounts of the basic nutritional biomolecules, including carbohydrates, proteins, and lipids. In this study, we examined two agroindustrial subproducts of the olive oil industry that are highly abundant in southern Spain: two-phase pomace or alperujo (ALP) and olive leaf (OL), and its derivatives: alperujo meal (ALPM), olive leaf meal (OLM) and olive leaf hydroalcoholic extract (OLHAE).

Experiments leading to fructification (mushrooms) with edible fungi grown on compost require long cultivation times, and since the same components and metabolites with health benefits have been detected in the fruiting bodies and the mycelia

[1], the mycelial composition can be assumed to be similar to that of the fruiting bodies. Therefore, in this study, we examined the effect of supplementing minimal defined growth medium with different compounds derived from olive oil industry subproducts, ALPM, OLM and OLHAE, on *Agaricus bisporus* (*A. bisporus*) mycelial composition, primarily ergosterol. *A. bisporus* was grown on liquid and solid media as a preliminary step to the study on fruiting bodies after growth on compost supplemented with the same supplement, in an attempt to obtain mushrooms with higher ergosterol (pro-vitamin D2) concentration.

II. MATERIAL AND METHOD

2.1 Mushroom

The mushroom species used in this study was *A. bisporus* (J.E Lange) Imbach strain CBS 57166, obtained from Colección Española de Cultivos Tipo (CECT), Universidad de Valencia (Spain). The mycelia were grown and maintained on potato dextrose agar (PDA) plates at 28°C. *A. bisporus* was maintained by replication onto new media once a week to keep the mycelia actively growing.

2.2 Agroindustrial subproducts and chemicals

The raw materials or agroindustrial subproducts and the supplements used in this study are shown in **Table-1**. ALP, the solid liquid waste or two-phase pomace generated by the two-phase method of olive oil extraction [7] and OL from Arbequina olive trees were supplied by the Instituto de la Grasa of Seville (Spain). ALPM, OLM and OLHAE were prepared in our laboratory using standard procedures. Briefly, ALP was dried by recirculating air at 50°C in a drying tunnel until the weight was constant, and dried ALP was milled in a cutting mill (Retsch SM 100, Haan, Germany) and sieved through a 0.25 mm mesh to obtain the ALPM. Similarly, the OL was dried and ground and contained OLM.

2.3 Cultivation media

A. bisporus was grown in two types of cultivation media: minimal defined liquid medium (MDLm) and minimal defined solid medium (MDSm). The composition of MDLm was as follows: 0.5 g/L dextrose, 2.5 g/L potato extract, 0.45 g/L urea, $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 590 mg/L, $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, 602 mg/L and 20 mg/L of mineral solution, pH 5.6. The mineral solution composition was as follows: $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 250 mg/L, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 80 mg/L, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 70 mg/L, and $\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ 100 mg/L. The composition of the MDSm was similar but contained 15 g/L of agar. The cultivation media supplemented with ALPM, OLM and OLHAE used in this study is shown in **Table-3** and **Table-4**. Cultivation in MDLm was conducted in 500 mL flasks with 200 mL culture media at 28°C, pH 5.6 and 120 rpm in a shaker for 7 days. Five millilitre samples were removed every day and analysed for biomass and ergosterol. Cultivation in MDSm was carried out in Petri dishes of 9 cm in diameter containing 20 mL culture media at 28°C and pH 5.6 in a cultivation oven for 7 days. Samples (one Petri dish) were removed each day and analysed for biomass and ergosterol. The physical and chemical characteristics of the supplements used in this study are shown in **Table-2**.

TABLE 1
RAW MATERIALS AND SUPPLEMENTS USED ON MUSHROOM (*A. BISPORUS*) GROWTH MEDIA FORMULATION.

Agroindustrial subproduct	Supplement
Alperujo (ALP)	Alperujo meal (ALPM)
Olive leaf (OL)	Olive leaf meal (OLM)
Olive leaf (OL)	Olive leaf hydroalcoholic extract(OLHAE)

TABLE 2
PHYSICAL AND CHEMICAL CHARACTERISTICS OF THE SUPPLEMENTS ASSAYED IN THIS STUDY.

	ALP	OLM	OLHAE
Dry matter [Ⓢ] (%)	88.7±3.8	93.2±1.1	22.3±3.7
Moisture [Ⓢ] (%)	11.3±3.8	6.8±1.1	77.7±3.7
Ash [Ⓢ] (% , d.w)	11.4±1.2	9.4±3.1	5.2±0.8
Organic matter [Ⓢ] (% , d.w.)	88.6±1.2	90.6±3.1	94.8±0.8
Total-N [Ⓢ] (% , d.w.)	1.5±0.2	1.9±0.3	3.4±0.4
Protein [Ⓢ] (N _t x 5.5) (% , d.w.)	8.3±0.9	10.5±1.3	18.7±1.8
Carbohydrates [Ⓢ] (% , d.w.)	50.2±3.6	46.6±4.2	59.4±3.8
Lignin (% , d.w.)	21.7±3.2	17.2±1.9	-
Fat [Ⓢ] (% , d.w.)	6.8±0.8	5.3±0.6	13.8±1.6
Others [Ⓢ] (% , d.w.)	1.6±	3.8±	2.9±
Polyphenols (mg/g, d.w.)*	12.4±3.7	23.7±3.6	240.1±15.1
C/N [Ⓢ]	9.7±2.4	15.3±3.1	4.1±0.7
pH [Ⓢ]	5.7±0.3	6.9±0.2	7.1±0.2

**Experimental data are the mean of at least three experiments; [Ⓢ]calculated data.*

2.4 Proximate composition of supplements

The moisture content was measured using a moisture analyser (Mettler Toledo, Barcelona, Spain). The total nitrogen content was determined using an AOAC 920.87 semi-micro Kjeldahl method [8] with a conversion factor of 5.5 to transform nitrogen into protein. The ash content was determined using the direct ashing method of AOAC [9]. The fat content was measured using an automated Soxhlet extraction apparatus (Soxtec™ 2050 FOSS, Hillerød, Denmark). Fat was extracted from 3 g of sample with 100 mL of petroleum ether at 90 °C for 180 min, and the defatted sample was collected and dried under nitrogen gas.

2.5 Carbohydrate determinations

The total carbohydrate content of the mycelial samples was determined using the phenol-sulfuric acid method [10], adapted to microplate analysis. Briefly, 1 mg samples were mixed with 1 mL of MilliQ water and stirred for 2 min. Twenty-five microlitres of the mixtures were added to a 96-well plate along with 25 µL of 5% phenol solution (w/v) and 125 µL of concentrated H₂SO₄. The plate was sealed and incubated in a water bath at 80 °C for 30 min. Sample absorbance was determined using a microplate reader (Biorad Model 680) at 595 nm. A standard curve of D-glucose (0.03 to 1.0 mg/mL) was used for quantification.

2.6 Total phenol content

The total phenol concentration was determined using the Folin-Ciocalteu method according to standard procedures [11]. Gallic acid was used as the standard for quantification.

2.7 Soluble protein determination

Total soluble protein concentration was determined using the Bradford method according to standard procedures using bovine serum albumin as the standard [12].

2.8 Ergosterol determination

2.8.1 Sample extraction

The extraction method used is a modification of the direct hexane extraction method proposed by Shao et al. [13]. Briefly, 2.5 mg of mushroom powder sample was vortexed with 6 mL of hexane for 2 min, centrifuged at 4000 rpm for 15 min, and the supernatant was transferred to a 25 ml beaker. The mushroom residue was then extracted twice using 6 mL hexane each time.

The three hexane phases obtained were pooled and dried under a nitrogen stream. The extract was dissolved in 1.5 mL of methanol. This solution was homogenised in an ultrasonic bath and then filtered through 0.22 µm PVDF filters (VWR, Spain) before chromatographic analysis. To carry out the internal standard (I.S.) calibration method, adequate volumes (µL) of 100 mg L⁻¹ standard solution of vitamin D3 was added to the mushroom powder before extraction, so that the final concentration of the I.S. was 1 mg L⁻¹.

2.8.2 Liquid chromatography-mass spectrometry analysis

The analysis of ergosterol and ergocalciferol, using cholecalciferol as an internal standard, was performed in an Acquity ultra-performance liquid chromatography (UPLC) system (Waters, Milford, MA, USA) coupled to a Xevo G2S QTOF mass spectrometer (Waters, Micromass, Manchester, UK) with a dual electro spray chemical ionisation (ESCI) in positive mode. The LC separation was performed using a conditioned autosampler at 5°C and a Synergi Hydro-RP column (100 mm x 3.00 mm id, 2.5 µm particle size), (Phenomenex, CA, USA), thermostated at 35°C. The mobile phase consisted of aqueous formic acid solution 0.1% (solvent A) and methanol (solvent B). The gradient elution starts at 1% A, maintaining these conditions for 4 min and then, increasing % A from 1% to 10% in 1 min maintaining conditions for 5 min at a flow rate of 0.5 mL min⁻¹. The injection volume was 5 µL. To avoid cross-contamination, pre and post-inject washes were conducted. MS conditions were as follows: nebulisation gas (nitrogen) 700 Lh, cone gas (nitrogen) 29 L h⁻¹, desolvation temperature 500 °C, source temperature 150 °C, corona current was set at 5 mA and sample cone voltage at 40 V. MS spectra were collected in a continuum between 50 and 750 Da with a scan time of 1.55. Ergosterol, ergocalciferol and cholecalciferol were identified using retention times of 9.13 min for ergosterol; 4.68 min for ergocalciferol and 5.06 min for cholecalciferol, as well as the accurate mass of each compound (379.3377 for ergosterol; 397.3462 for ergocalciferol and 385.3463 for cholecalciferol).

2.9 Western blot analysis

Total soluble protein was resolved on 12.5% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels (SDS-PAGE) as described by Laemmli [14] and electro-transferred to nitrocellulose membranes. Western blot analysis was performed as described by Haid and Suissa [15]. Key enzymes related to ergosterol biosynthesis were detected using rabbit antisera as the primary antibodies directed against ERG2, ERG4, ERG6 and ERG11 (Figure 1). The primary antibodies were detected using peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG as a second antibody and SuperSignal® West Pico Chemiluminescent substrate solution.

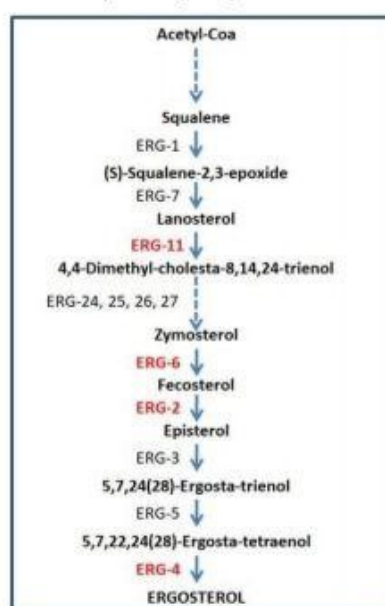


FIGURE 1: REPRESENTATIVE ENZYMES IMPLICATED IN ERGOSTEROL BIOSYNTHESIS IN FUNGI.

(ERG1 – squalene epoxidase; ERG2 – sterol C-8 isomerase; ERG3 – sterol C-5 desaturase; ERG4 – sterol C-24 reductase; ERG5 – sterol C-22 desaturase; ERG6 – sterol C-24 methyltransferase; ERG7 – lanosterol synthase; ERG11 (CYP51) – lanosterol C-14 demethylase; ERG24 – sterol C-14 reductase; ERG25 – sterol C-4 methyl oxidase; ERG26 – sterol C-3 dehydrogenase (C4-decarboxylase); ERG27 – sterol C-3 ketoreductase).

2.10 Statistical analysis

The results are presented as the mean value $\pm$ standard deviation (SD). Statistical analyses were performed using a 2-way analysis of variance (ANOVA) with a subsequent Bonferroni post hoc test for pairwise comparisons between various combinations of two groups. A p -value of < 0.05 was considered statistically significant. Statistical analyses were performed using the SPSS 16.0 software.

III. RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Preparation and characterisation of supplements

The first objective of this study was to collect enough raw materials (agroindustrial subproducts) to obtain supplements for all experiments planned. These included growth on liquid- and solid-minimal medium and, in the future, in compost. Using this strategy reduced the variability in the raw material composition, which can occur when subproducts obtained at different periods of times were used. The agroindustrial subproducts used in this study were ALP and OL, and the supplements derived from them were ALPM, OLM and OLHAE (**Table-1**). These subproducts were selected because they are highly abundant in southern Spain, cheap, and their composition can influence the growth of *A. bisporus* [16]. Although available seasonally, further processing can provide enough supplements to use for a long period of time, such as an entire year. For example, ALPM and OLM can be processed to a stable dry form or into a liquid form or syrup, such as OLHAE, that remains stable for long periods.

The physical and chemical characteristics of the supplements used in this study are shown in **Table-2**. As these results show, the properties and composition of the supplements vary from each other in their stabilised forms, while ALPM and OLM are solids (meals), and OLHAE is liquid. Thus, its composition depends on the components of the raw materials (ALP and OL). Stabilisation is required to keep these supplements from degrading for one year. Therefore, the water content was reduced by air drying and constitutes the primary cost of the process.

ALP is a subproduct from the olive oil industry, generated by oil centrifugation, with a high water content of approximately 60%. After drying, the moisture is reduced to $11.3 \pm 3.8\%$. The dry matter that constitutes $88.7 \pm 3.8\%$ of the ALPM is comprised primarily of carbohydrates ($50.2 \pm 3.6\%$), lignin ($21.7 \pm 3.2\%$), proteins ($8.3 \pm 0.9\%$), fat ($6.8 \pm 0.8\%$) and ash ($11.4 \pm 1.2\%$). OL provides similar results. The fresh leaves contain approximately 15% of water, and after air drying and milling, it can be stabilised as OLM with a moisture content of $6.8 \pm 1.1\%$. The dry matter that constitutes $93.2 \pm 1.1\%$ of the OLM is comprised primarily of carbohydrates ($46.6 \pm 4.2\%$), lignin ($17.2 \pm 1.9\%$), proteins ($10.5 \pm 1.3\%$), fat ($5.3 \pm 0.6\%$) and ash ($9.4 \pm 3.1\%$). OL milling to a fine powder (OLM) allows the hydroalcoholic extraction of bioactive compounds. The extract that occurs after ten-fold concentration by vacuum is a syrup containing a high water content ($77.7 \pm 3.7\%$) and, consequently, a lower percentage of dry matter ($22.3 \pm 3.7\%$), comprised primarily of carbohydrates ($59.4 \pm 3.8\%$), proteins ($18.7 \pm 1.8\%$), fat ($13.8 \pm 1.6\%$) and ash ($8.8 \pm 2.3\%$).

The analysis of the organic matter shows that the level in ALPM ($88.6 \pm 1.2\%$) is lower than that in OLM and OLHAE ($90.6 \pm 3.1\%$ and $94.8 \pm 0.8\%$, respectively) due to its higher ash content.

The fat contents of the three supplements are $6.8 \pm 0.8\%$, $5.3 \pm 0.6\%$ and $13.8 \pm 1.6\%$ in ALPM, OLM and OLHAE, respectively. The relatively low fat content in ALP ($6.8 \pm 0.8\%$) can be explained because developing fats is the primary objective during olive oil production, and minimal fat loss is desired during the oil recovery process. OLM shows the lowest fat content ($5.3 \pm 0.6\%$) since the fat content is low in the OL. However, the highest lipid concentration ($13.8 \pm 1.6\%$) was found in the OLHAE, since a lipophilic solvent (ethanol) was used in the hydroalcoholic extraction medium.

The protein contents in the ALPM, OLM and OLHAE supplements are $8.3 \pm 0.9\%$, $10.5 \pm 1.3\%$ and 18.7 ± 1.8 , respectively. These values were obtained by multiplying the respective total nitrogen (N_t) value by the more convenient conversion factor 5.5 for vegetable proteins, rather than by 6.25, which is appropriated for animal proteins [17].

The carbohydrate content was $50.2 \pm 3.6\%$, $46.6 \pm 4.2\%$ and $59.4 \pm 3.8\%$ in ALPM, OLM and OLHAE, respectively. The primary carbohydrates present in the supplements contain cellulose and hemicellulose with a low concentration of low molecular weight saccharides. The lignin content was $21.7 \pm 3.2\%$ and $17.2 \pm 1.9\%$ in ALPM and OLM, respectively. OLHAE, due to the nature of its preparation process, does not contain lignin.

The C/N ratio is an important factor for mycelial growth, and fungi grow well when its values are approximately 10 to 12 [18]. Thus, our supplements result in the following values: $9.7 \pm 3.4\%$, $15.3 \pm 3.1\%$ and $4.1 \pm 1.3\%$ for ALPM, OLM and

OLHAE, respectively. Supplementation with OLHAE could explain the faster growth and higher productivity that *A. bisporus* shows in media supplemented with OLM and ALPM (data not shown). However, the objective of the supplementation in this study was not nutritionally related but instead examined the utilisation of stress-inducing factors that could potentiate the increase in metabolites such as ergosterol and ergothioneine. Thus, substances such as polyphenols and other non-identified metabolites present in the supplements could be of special interest for those purposes. The concentration of polyphenols in the supplements varies from 12.4 ± 3.7 mg/g, 23.7 ± 3.6 mg/g and 240.1 ± 15.1 mg/g in ALPM, OLM and OLHAE, respectively. The higher value observed in OLHAE is related to the extraction and concentration processes that facilitate the extraction of such types of compounds. As we will demonstrate, a relatively high polyphenol content, as shown in ALPM and OLM, induces ergosterol biosynthesis; however, very high content, as is the case with OLHAE, could be less effective, probably due to its action as pro-oxidants rather than as antioxidants [19].

3.2 Effects of supplementation on *A. bisporus* growth and mycelial composition

The modification of MDLm and MDSm was conducted once the supplements had been prepared and characterised (see **Tables-3** and **-4**). Although the primary objective of this study was to examine the effect on the biosynthesis of some components with health benefits, such as ergosterol, the precursor of vitamin D2, and ergothioneine, the effects on biomass production were also considered.

Methods for increasing the productivity of any one metabolite of interest, such as ergosterol, are generally based on two approaches: i) engineering metabolic pathways [20], and ii) utilising a physiological approach to exploit knowledge about the physiology of the mushroom strain and its response to changing environmental conditions [21]. Since the genetics and biochemistry of *A. bisporus* have not been fully developed, we used the physiological approach to study the effect of a group of supplements derived from the olive oil industry (ALPM, OLM and OLHAE) on the synthesis of ergosterol, in an attempt to obtain *A. bisporus* with higher ergosterol concentration.

A. bisporus mycelia were grown on MDLm supplemented with different amounts of ALPM, OLM and OLHAE as shown in **Table-3** at pH 5.5, 28°C and gentle agitation (120 rpm) for 7 days. As observed from these results, supplementation with ALPM, OLM and OLHAE at 0.1%, 0.5%, 1% and 2% significantly increased the biomass and ergosterol content compared to the non-supplemented control culture. Although the increase in the biomass was more significant in ALPM and OLM, probably due to their higher C/N rates of 9.7 ± 2.4 and 15.3 ± 3.1 , with an increased amount of supplementation, the ergosterol concentration reaches its maximum at 1% supplementation. A higher concentration does not lead to the production of more ergosterol, and it reached a plateau at 1% supplementation. Therefore, we selected 1% supplementation for further studies.

TABLE 3

***A. BISPORUS* GROWTH ON MDLM SUPPLEMENTED WITH DIFFERENT SUBSTRATES AND CONCENTRATIONS.**

Culture media	Biomass (mg/L)	Ergosterol (mg/g, d.w.)	n
MDLm (control)	7.8 ± 0.6	4.08 ± 0.53	4
MDLm + ALPM (0.1%)	9.7 ± 0.7	4.86 ± 0.93	4
MDLm + ALPM (0.5%)	11.9 ± 1.1	5.61 ± 0.89	6
MDLm + ALPM (1.0%)	12.2 ± 0.9	5.64 ± 0.47	6
MDLm + ALPM (2.0%)	12.7 ± 1.4	5.59 ± 0.35	4
MDLm + OLM (0.1%)	10.2 ± 0.8	5.14 ± 0.53	4
MDLm + OLM (0.5%)	12.1 ± 1.3	6.23 ± 0.47	6
MDLm + OLM (1.0%)	12.6 ± 0.5	6.60 ± 0.86	6
MDLm + OLM (2.0%)	12.9 ± 2.1	6.62 ± 0.56	4
MDLm + OLHAE (0.1%)	8.8 ± 0.9	4.92 ± 1.33	4
MDLm + OLHAE (0.5%)	9.3 ± 1.2	5.31 ± 0.61	4
MDLm + OLHAE (1.0%)	9.6 ± 1.1	5.87 ± 0.91	4
MDLm + OLHAE (2.0%)	9.9 ± 2.2	5.85 ± 0.78	4

A. bisporus mycelia were grown on MDSm supplemented with different amounts of ALPM, OLM and OLHAE, as shown in **Table-4**, at pH 5.5, 28°C without agitation and in darkness for 7 days. The results of this experiment were similar. These results show that supplementation with ALPM, OLM and OLHAE at 0.1%, 0.5%, 1% and 2% significantly increase the biomass and ergosterol content in comparison with the non-supplemented control culture. In this case, the biomass also increases more significantly in ALPM and OLM than in OLHAE, probably due to its higher C/N rate, 9.7 ± 2.4 and 15.3 ± 3.1 , respectively, which increased with the degree of supplementation. Ergosterol concentration reaches its maximum at 1% supplementation, and a higher concentration of supplements did not result in higher ergosterol content, which reached a plateau at 1% supplementation. Therefore, in this case, we also selected 1% supplementation for further studies.

The expression of several enzymes implicated in ergosterol biosynthesis was studied to investigate the reason for the observed increase in ergosterol biosynthesis and/or accumulation in *A. bisporus* grown in media supplemented with OLM and ALP. For this purpose, we prepared antibodies against four of the key enzymes (**Figure 1**) implicated in ergosterol biosynthesis, ERG2, ERG4, ERG6 and ERG11, to use for a Western blot analysis. Due to the difficulty of purifying these enzymes implicated in the biosynthesis of this phytosterol, we choose a procedure to produce the antibodies based on antibody preparations against synthetic peptides with high immunogenicity [22] towards the different enzymes.

TABLE 4
A. BISPORUS GROWTH ON MDSM SUPPLEMENTED WITH DIFFERENT SUBSTRATES AND CONCENTRATIONS.

Culture media	Biomass (mg/L)	Ergosterol (mg/g, d.w.)	n
MDSm (control)	6.6 ± 0.4	4.22 ± 0.43	3
MDSm + ALPM (0.1%)	8.7 ± 0.8	5.07 ± 0.71	4
MDSm + ALPM (0.5%)	8.9 ± 0.6	5.21 ± 0.33	4
MDSm + ALPM (1.0%)	9.2 ± 0.2	5.36 ± 0.39	4
MDSm + ALPM (2.0%)	9.5 ± 0.5	5.42 ± 0.41	3
MDSm + OLM (0.1%)	8.6 ± 0.6	5.22 ± 0.34	4
MDSm + OLM (0.5%)	8.9 ± 0.5	6.45 ± 0.55	4
MDSm + OLM (1.0%)	9.4 ± 0.7	6.79 ± 0.42	4
MDSm + OLM (2.0%)	9.7 ± 0.3	6.83 ± 0.65	3
MDSm + OLHAE (0.1%)	7.1 ± 0.2	4.53 ± 0.81	4
MDSm + OLHAE (0.5%)	7.3 ± 0.3	4.72 ± 0.65	4
MDSm + OLHAE (1.0%)	7.6 ± 0.5	4.93 ± 1.01	4
MDSm + OLHAE (2.0%)	7.8 ± 0.4	5.13 ± 0.32	3

Our results show that all of the antibodies produced recognised the synthetic peptide by a dot analysis, even at a level of 5 ng (**Figure 2**). However, when we assayed the antibodies against the *A. bisporus* enzymes, only three of them recognised any protein using Western blot analysis, anti-ERG4, anti-ERG6 and anti-ERG11, (**Figure-3**), probably due to the localisation of the immunogenic peptides at the molecular surface. In contrast, the selected anti-ERG4 peptide could be occluded in the interior of the molecule and thus not recognised by anti-ERG-2.

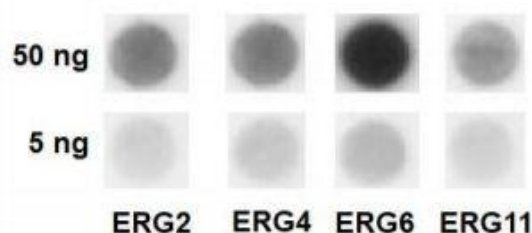


FIGURE 2: DOT ANALYSIS USING 5 AND 50 NG OF SYNTHETIC PEPTIDES AND DETECTION BY THEIR ANTIBODIES (ANTI-ERG2, ANTI-ERG4, ANTI-ERG6 AND ANTI-ERG11).

Western blot analysis also showed that ERG6 (C-24 sterol methyltransferase) and ERG11 (cytochrome P450 lanosterol C-14 α -demethylase) were expressed at a higher level than in the control (2.75-fold and 3.52-fold, respectively) in all three supplemented culture media assayed, both in MDLm (Figure-3) and MDSm (data not shown) than ERG2 (sterol C-8 isomerase). Although the ERG2 expression level was 1.85-fold higher than that in the control, it is lower than that observed for the other two enzymes analysed. From these results, we concluded that at least three proteins (ERG2, ERG6 and ERG11) involved in the ergosterol biosynthesis pathway were significantly upregulated, indicating the importance of activating ergosterol biosynthesis by supplementation with ALPM, OLM and OLHAE.

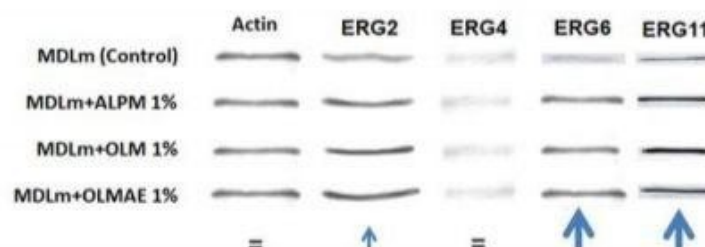


FIGURE 3: WESTERN BLOT ANALYSIS OF *A. BISPORUS* KEY ENZYMES (ERG2, ERG4, ERG6 AND ERG11) IMPLICATED IN ERGOSTEROL BIOSYNTHESIS

IV. CONCLUSION

From these results, we can conclude that supplementation with ALPM, OLM and OLHAE upregulate some of the key enzymes implicated in ergosterol biosynthesis (ERG2, ERG6 and ERG11), but we do not know what compound is responsible for this upregulation and the subsequent increase in ergosterol production. Therefore, more research is necessary to increase our knowledge in this field. To the best of our knowledge, this report represents the first comprehensive study on the protein expression profiling of supplementation studies directed to improve the production of metabolites with potential health benefits. It provides new insights into a better understanding of the development of cultivation processes directed to increase ergosterol biosynthesis, which is a prerequisite for obtaining mushrooms with high vitamin D2 levels, sufficient for a daily dose (15 μ g) in one portion (100 g w/w.).

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to the Spanish Ministry of Science and Innovation for the financial support of this work (project RTC-2015-4039-2), which has partial financial support from the FEDER funds of the European Union. The authors are grateful to the Centro de Innovación, Tecnología e Innovación de la Universidad de Sevilla (CITIUS, Servicio de Biología and Servicio de Microanálisis) for providing instrumental and technical support. The authors thank Paula Bautista for assistance in the preparation of the manuscript.

REFERENCES

- [1] Y. Chen, B. Chefetz, R. Rosario, J. D. H. van Heemst, C. P. Romaine, and P. G. Hatcher, "Chemical nature and composition of compost during mushroom growth", *Compost Science & Utilization*, 2000, 8(4): 347-359.
- [2] G. Lemke, "Champignon kultur auf nicht kompostiertem Stroh substrat mit Startddungung", *Die Deutsche Gartenbauwirtschaft*, 1963, 11: 167-169.
- [3] J. W. Sinden, and L. C. Schisler, "Nutrient supplementation of mushroom compost at spawning", *Mushroom Sci*, 1962a 5: 150-164.
- [4] J. W. Sinden, and L. C. Schisler, "Nutrient supplementation of mushroom compost at casing", *Mushroom Sci*, 1962b, 5: 267-280.
- [5] P.E. Randle, "Supplementation of mushroom composts – A review", *Mushroom J*, 1985, 151: 241-249.
- [6] A. Pardo-Giménez, D.C. Zied, M. Álvarez-Ortí, M. Rubio, and J.E. Pardo, "Effect of supplementing compost with grapeseed meal on *Agaricus bisporus* production", *J Sci Food Agric*, 2012, 92: 1665-1671.
- [7] J.A. Alburquerque, J. González, D. García, and J. Cegarra, "Agrochemical characterization of 'alperujo', a solid by-product of the two-phase centrifugation method for olive oil extraction", *Bioresource Technology*, 2004, 91: 195-200.
- [8] AOAC, 1995. Method 920.87. Protein (total) in flour, final action. Official Methods of Analysis of AOAC International, AOAC International, Maryland, USA, p. 32.1.22.
- [9] AOAC, 2000. Method 923.03. Ash of flour. Official Methods of Analysis of AOAC International. AOAC International, Maryland, USA, p. 32.1.05.

- [10] M. DuBois, K.A. Gilles, J. K. Hamilton, P. A. Rebers, and F. Smith, "Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances", *Anal Chem*, 1956, 28: 350–356.
- [11] R. Prior, X. Wu, and K. Schaich, "Standardised Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements", *J Agric Food Chem*, 2005, 53: 4290–4302.
- [12] M. A. Bradford, "Rapid and Sensitive Method for the Quantification of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding", *Analytical Biochemistry*, 1976, 72: 248–254.
- [13] S. Shao, M. Hernandez, J. K. G. Kramer, D. L. Rinker, and R. Tsag, "Ergosterol profiles, fatty acid composition and antioxidant activities of button mushrooms as affected by tissue part and developmental stage", *J Agric Food Chem*, 2010, 58: 11616-11625.
- [14] U. K. Laemmli, "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4", *Nature*, 1970, 227: 680–685.
- [15] A. Haid, M. Suissa, "Immunochemical identification of membrane proteins after sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis", *Methods Enzymol*, 1983, 96: 192–205.
- [16] R. Altier, A. Esposito, F. Parati, A. Lobianco, and M. Pepi, "Performance of olive mill solid waste as a constituent of the substrate in commercial cultivation of *Agaricus bisporus*", *Int Biodeter Biodegradation*, 2009, 63: 993–997.
- [17] F. Mariotti, D. Tomé, and P. P. Mirand, "Converting Nitrogen into Protein—Beyond 6.25 and Jones' Factors", *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2008, 48: 177–184.
- [18] A. Pardo-Giménez, D.C. Zied, M. Álvarez-Ortí, M. Rubio, and J. E. Pardo, "Effect of supplementing compost with grapeseed meal on *Agaricus bisporus* production", *J Sci Food Agric*, 2012, 92: 1665–1671.
- [19] L. R. Fukumoto, and G. Mazza, "Assessing Antioxidant and Prooxidant Activities of Phenolic Compounds", *J Agric Food Chem*, 2000, 48: 3597–3604.
- [20] E. Nevoigt, "Progress in Metabolic Engineering of *Saccharomyces cerevisiae*", *Microbiol Mol Biol Rev*, 2008, 72: 379–412.
- [21] B. Sonnleitner, O. Kläppeli, "Growth of *Saccharomyces cerevisiae* is controlled by its limited respiratory capacity: formulation and verification of a hypothesis", *Biotechnol Bioeng*, 1986, 28: 927–937.
- [22] F. Araujo, S. Tan, D. Ruano, H. Schoemaker, J. Benavides, and J. Vitorica, "Molecular and Pharmacological Characterization of Native Cortical γ -Aminobutyric Acid_A Receptors Containing Both $\alpha 1$ and $\alpha 3$ Subunits", *J Biol Chem*, 1996, 271: 27902–27911.



Effect of physicochemical components on mycelial growth of *Agaricus bisporus* - a popular edible mushroom

M. Ismail, G. Kibriya, J. Hossain, M. Nasiruddin and A. Imtiaj*

Department of Botany, University of Rajshahi, Rajshahi-6205, Bangladesh

*Corresponding author: Mobile: 01714-118546, e-mail: imtiaz269@yahoo.com

Abstract

In this investigation, the effect of physicochemical components on mycelial growth of 11 strains of *Agaricus bisporus* was studied to provide more credible references for successful artificial cultivation. The suitable temperature for mycelial growth (22.8 mm) was 25°C after 10 days of incubation. In terms of total average growth (15.5 mm), the minimum mycelial growth was found 11.8 mm at 15°C. Among the tested fungi, *A. bisporus* str. 1955 and str. 2178 showed the highest (19.5 mm) and lowest (8.9 mm) average mycelial growth, respectively. In case of pH, the most remarkable growth was found 21.5 mm at pH 6 whereas, the lowest growth was recorded 8.4 mm at pH 4 in comparison with total average growth (16.9 mm). Considering growth phenotype of mycelia, Lilly and YM media were the most suitable and Hennerberg and Hoppkins media were the most worst among the tested media for the mycelial growth of *A. bisporus* strains. Out of the tested carbon sources; sucrose and dextrin were the most suitable, whereas galactose and lactose were the most unfavorable for the fungal mycelial growth. Among the used nitrogen sources, glycine and arginine were the best supplement as nitrogen sources and histidine, alanine and urea showed the lowest performance on mycelial growth of the tested fungi. These results may be useful for commercial farming of *A. bisporus* mushroom in Bangladesh.

Keywords: *Agaricus bisporus*, artificial cultivation, phenotypic growth, physicochemical parameters.

INTRODUCTION

Agaricus bisporus is one of the very popular edible mushrooms in the world, usually known as white button mushroom. The mycelial mass and fruiting bodies of the mushroom have been used as foods and food-flavoring materials in many centuries due to their unique and delicate flavors. The morphological bunches have also become attractive as functional foods and as a source of bioactive components. Apart from this, it has been reported that *Agaricus* spp. have many therapeutic properties which are significant for human health (Kim *et al.*, 2005; Kimura *et al.*, 2004; Souza-Paccola *et al.*, 2004; Rodrigues *et al.*, 2003; Mizuno, 2002; Oshiman *et al.*, 2002).

The success and feasibility of commercial cultivation of mushroom is mainly depending on the success of mycelial culturing. The substrates colonized with mushroom mycelia called spawns are used for mushroom farming to inoculate the suitable compost used. After colonization with mycelia, compost covered with the supplemented peat and CaCO₃ on top of the colonized compost in a 5 cm thick casing layer. This casing layer is invaded by mushroom mycelia and then developed fruit bodies by lowering the temperature and CO₂ concentration in the growing room. Duration of mycelial growth is not only of direct economic importance, but also non-fully colonized compost and casing compost are

Table 1. Effect of temperature on the mycelial growth of the selected *A. bisporus* strains on PDA medium at pH 6 after 10 days of incubation

Strain number	Mycelial growth (mm)					Mean
	15°C	20°C	25°C	30°C	35°C	
<i>A. bisporus</i> str. 1946	10.3	20.3	26.7	21.7	0	15.8
<i>A. bisporus</i> str. 1947	9.3	12.7	16.7	15.3	0	10.8
<i>A. bisporus</i> str. 1948	10.3	21.7	25.3	22.3	0	15.9
<i>A. bisporus</i> str. 1955	16.7	24.7	30.3	25.7	0	19.5
<i>A. bisporus</i> str. 1956	10.0	17.3	21.3	16.7	0	13.1
<i>A. bisporus</i> str. 2029	13.3	19.0	29.7	22.3	0	16.9
<i>A. bisporus</i> str. 2097	9.0	14.3	21.3	14.7	0	11.9
<i>A. bisporus</i> str. 2102	19.7	23.7	16.0	8.0	0	13.5
<i>A. bisporus</i> str. 2107	21.7	20.0	23.7	8.0	0	14.7
<i>A. bisporus</i> str. 2177	13.0	17.0	24.7	21.7	0	15.3
<i>A. bisporus</i> str. 2178	8.0	10.7	14.7	11.3	0	8.9
Mean	12.8	18.3	22.8	17.1	0	

Effect of pH on the mycelial growth:

Among the selected strains of *A. bisporus*, the best mycelial growth was found 21.5 mm at pH 6 whereas, the lowest vegetative growth was recorded 8.4 mm at pH 4 compared to total average growth of 16.9 mm. Among the strains, *A. bisporus* str. 1955 and str. 2107 showed the best and worst total average mycelial growth at pH 6 (Table 2). Ma *et al.* (2014) revealed that the biological characteristic for mycelial growth of *A. bisporus* was good at pH 7.0-7.5. This result does not support the present findings. Hur (2008) studied the cultural characteristics and log-mediated cultivation of *Phellinus linteus* and found that the pH value 6 was the best for the mycelial growth. Chi *et al.* (1996) also reported that mycelial growth of *P. linteus* was the best at pH 6 which corroborates the present findings.

Table 2. Effect of pH on the mycelial growth of the selected *A. bisporus* strains on PDA medium at 25°C after 10 days of incubation

Strain number	Mycelial growth (mm)					Mean
	pH 4	pH 5	pH 6	pH 7	pH 8	
<i>A. bisporus</i> str. 1946	9.3	13.7	14.7	13.3	11.7	12.5
<i>A. bisporus</i> str. 1947	9.3	22.0	18.3	14.0	12.3	15.2
<i>A. bisporus</i> str. 1948	8.7	13.7	14.7	12.7	11.3	12.2
<i>A. bisporus</i> str. 1955	11.3	22.0	21.0	18.7	14.0	17.4
<i>A. bisporus</i> str. 1956	11.0	22.0	19.7	17.0	14.0	16.7
<i>A. bisporus</i> str. 2029	9.0	22.7	17.0	14.7	14.0	15.5
<i>A. bisporus</i> str. 2097	8.7	22.7	17.0	14.7	13.3	15.3
<i>A. bisporus</i> str. 2102	8.7	21.0	16.0	12.0	10.0	13.5
<i>A. bisporus</i> str. 2107	0	15.7	13.7	11.7	10.3	10.3
<i>A. bisporus</i> str. 2177	16.3	33.3	64.0	61.7	54.0	45.9
<i>A. bisporus</i> str. 2178	0	10.3	20.7	16.0	12.3	11.9
Mean	8.4	19.9	21.5	18.8	16.1	

Effect of various media on the mycelial growth:

The role of solid media on the mycelial growth of the selected strains of *A. bisporus* was also studied. Considering growth phenotype of mycelia of 11 strains, Lilly and YM media were the most suitable media and Hennerberg and Hopkins media were not favorable among the tested media for the mycelial growth of *A. bisporus* mushroom. *A. bisporus* str. 2177 showed the exceptionally highest growth of mycelium (59.3 mm) whereas, rest of the strains showed the moderate mycelial growth ranging 15.5-25 mm (Table 3). Hur (2008) reported that the excellent mycelial growth of *P. linteus* was not similar to the present findings. In case of *Herichium erinaceus*, the highest mycelial growth was observed on PDA, YM, Hamada and glucose peptone media whereas, the lowest mycelial growth was observed on Czapek Dox, Hopkins, Lilly and Hennerberg media (Imtiaj *et al.*, 2008).

Effect of carbon sources on the mycelial growth:

The mycelial growth of the tested strains of *A. bisporus* varied with different carbon sources. Among the tested carbon sources, sucrose and dextrin were the most suitable while, galactose and lactose were favorable for the mycelial growth of *A. bisporus* strains. The *A. bisporus* str. 2177 showed the highest total average growth (31.6 mm) among the tested strains (Table 4). Ma *et al.* (2014) studied the biological characteristics of *A. bisporus* and found glucose as the best carbon source for the mycelial growth of the tested fungus. This result is not in conformity to the present findings that could be because of different strains or isolates as well as different sources of carbon.

Effect of nitrogen sources on the mycelial growth:

Among the used nitrogen sources, glycine and arginine were the best as supplemented nitrogen sources and histidine, alanine and urea were worst for the growth of mycelia. The *A. bisporus* str. 2177 and str. 2178 showed the highest and lowest mycelial growth, respectively in terms of total average growth (Table 5). According to the report by Ma *et al.* (2014) on biological characteristics, they focused that yeast extract was the best nitrogen source for the mycelial growth of *A. bisporus*. Shim *et al.* (2005) clarified that glycine was the most favorable and histidine, arginine and ammonium oxalate were the most unfavorable nitrogen sources for the mycelial growth of *M. procera*.

In conclusion, it may be concluded that moderate temperature and acidic medium was favorable for the mycelial growth of *A. bisporus*. Considering the growth phenotype, it was also noticed that disaccharide like

sucrose and dextrin were favorable C-sources; and glycine and arginine were the best N-sources that can be supplemented with the medium for better growth of mycelia of the fungus. So, these findings may be helpful

for researchers and mushroom farmers to mass scale production of mushroom that contributes to enhance food security.

Table 3. Effect of culture media on the mycelial growth of the selected strains of *A. bisporus*

Strain number	Mycelial growth (mm) on culture media										Mean
	Cza	Ham	Hen	Hop	GP	GT	Lil	MC	PDA	YM	
<i>A. bisporus</i> str. 1946	11.7	14.0	9.0	12.3	12.0	19.3	27.7	21.7	26.7	23.3	17.8
<i>A. bisporus</i> str. 1947	8.3	12.0	9.3	11.0	14.3	18.7	17.0	14.7	16.7	16.7	13.9
<i>A. bisporus</i> str. 1948	19.3	18.7	8.0	11.3	11.3	15.3	23.3	19.3	25.3	23.3	17.5
<i>A. bisporus</i> str. 1955	30.3	28.7	10.0	19.3	15.3	17.3	47.3	27.3	30.3	24.0	25.0
<i>A. bisporus</i> str. 1956	20.7	19.7	9.0	12.3	11.7	14.3	21.0	20.3	21.3	20.3	17.1
<i>A. bisporus</i> str. 2029	20.7	20.0	10.3	11.7	13.3	16.7	23.0	20.7	29.7	24.3	19.0
<i>A. bisporus</i> str. 2097	18.3	18.3	9.7	12.3	12.3	15.7	22.0	20.7	21.3	20.7	17.1
<i>A. bisporus</i> str. 2102	29.3	34.3	12.3	19.7	20.3	12.3	21.3	17.0	16.0	20.3	20.3
<i>A. bisporus</i> str. 2107	18.3	23.3	9.3	14.7	15.7	14.0	21.0	15.7	23.7	17.0	17.3
<i>A. bisporus</i> str. 2177	82.3	42.7	55.0	51.3	62.3	28.3	87.0	77.3	24.7	82.0	59.3
<i>A. bisporus</i> str. 2178	13.3	18.3	13.7	15.0	15.0	13.7	17.3	14.7	14.7	19.0	15.5
Mean	24.8	22.7	14.2	17.4	18.5	16.9	29.8	24.5	22.8	26.5	

Cza: Czapek Dox, Ham: Hamada, Hen: Hennerberg, Hop: Hopkins, GP: Glucose peptone, GT: Glucose tryptone, Lil: Lilly, MC: Mushroom complete, PDA: Potato dextrose agar and YM: Yeast-malt extract agar.

Mycelial growth (mm) was calculated (n=3) after 10 days of incubation on potato dextrose agar (PDA) medium at 25°C and pH 6.

Table 4. Effect of carbon sources on the mycelial growth of the selected strains of *A. bisporus*

Strain number	Mycelial growth (mm) on carbon sources										Mean
	Dex	Fr	Ga	Gl	Lac	Mal	Man	Sor	Suc	Xy	
<i>A. bisporus</i> str. 1946	9.7	11.7	9.3	12.0	14.3	15.0	24.7	13.7	19.0	16.7	14.6
<i>A. bisporus</i> str. 1947	11.7	14.0	9.0	12.3	12.0	19.3	27.7	21.7	26.7	23.3	17.8
<i>A. bisporus</i> str. 1948	8.3	12.0	9.3	11.0	14.3	18.7	17.0	14.7	16.7	16.7	13.9
<i>A. bisporus</i> str. 1955	19.3	18.7	8.0	11.3	11.3	15.3	23.3	19.3	25.3	23.3	17.5
<i>A. bisporus</i> str. 1956	30.3	28.7	10.0	19.3	15.3	17.3	47.3	27.3	30.3	24.0	25.0
<i>A. bisporus</i> str. 2029	20.7	19.7	9.0	12.3	11.7	14.3	21.0	20.3	21.3	20.3	17.1
<i>A. bisporus</i> str. 2097	20.7	20.0	10.3	11.7	13.3	16.7	23.0	20.7	29.7	24.3	19.0
<i>A. bisporus</i> str. 2102	33.7	24.7	11.7	25.0	20.7	24.0	24.3	23.3	32.0	15.3	23.5
<i>A. bisporus</i> str. 2107	29.3	17.7	14.3	19.3	21.0	21.3	18.3	23.7	30.0	16.3	21.1
<i>A. bisporus</i> str. 2177	52.7	29.3	29.3	39.7	13.3	47.7	12.0	16.7	49.7	26.0	31.6
<i>A. bisporus</i> str. 2178	18.0	14.7	13.0	17.3	10.0	21.7	8.7	10.7	28.0	22.3	16.4
Mean	23.1	19.2	12.1	17.4	14.3	21.0	22.5	19.3	28.1	20.8	

D ex: Dextrin, Fr: Fructose, Ga: Galactose, Gl: Glucose, Lac: Lactose, Mal: Maltose, Man: Mannose, Sor: Sorbitol, Suc: Sucrose and Xy: Xylose. Each carbon source was added to the basal medium at the concentration of 0.1 M.

Mycelial growth (mm) was calculated (n=3) after 10 days of incubation on potato dextrose agar (PDA) medium at 25°C and pH 6.

Table 5. Effect of nitrogen sources on the mycelial growth of the selected strains of *A. bisporus*

Strain number	Mycelial growth (mm) on nitrogen sources										Mean
	Ala	AA	AP	Arg	CN	Gly	His	Met	PN	Ur	
<i>A. bisporus</i> str. 1946	10.3	19.0	19.3	20.3	17.7	26.3	15.3	20.0	16.0	10.7	17.5
<i>A. bisporus</i> str. 1947	11.0	18.7	20.0	21.0	18.7	27.3	16.3	21.0	17.0	10.3	18.1
<i>A. bisporus</i> str. 1948	8.7	15.3	20.0	21.7	19.7	24.0	14.7	18.3	17.7	10.7	17.1
<i>A. bisporus</i> str. 1955	12.3	19.3	20.3	20.7	18.0	27.3	16.3	20.3	17.3	11.7	18.4
<i>A. bisporus</i> str. 1956	10.3	16.7	20.0	22.0	19.0	25.3	15.3	19.7	19.0	10.3	17.8
<i>A. bisporus</i> str. 2029	10.7	17.3	19.7	20.3	19.0	25.7	15.3	19.7	16.7	11.0	17.5
<i>A. bisporus</i> str. 2097	10.7	17.7	19.3	20.3	19.0	25.7	15.3	19.7	16.7	10.7	17.5
<i>A. bisporus</i> str. 2102	33.0	10.7	14.0	20.7	19.3	19.0	0	16.7	12.3	19.0	16.5
<i>A. bisporus</i> str. 2107	8.0	8.3	11.7	15.0	14.7	18.7	0	13.7	13.0	19.0	12.2
<i>A. bisporus</i> str. 2177	11.3	65.7	31.7	48.7	47.0	51.7	0	19.7	40.3	23.7	34.0
<i>A. bisporus</i> str. 2178	8.3	11.0	8.0	12.7	12.3	10.0	0	10.7	8.7	8.0	9.0
Mean	12.2	20.0	18.5	22.1	20.4	25.5	9.9	18.1	17.7	13.2	

Ala: Alanine, AA: Ammonium acetate, AP: Ammonium phosphate, Arg: Arginine, CN: Calcium nitrate, Gly: Glycine, His: Histidine, Met: Methionine, PN: Potassium nitrate and Ur: Urea. Each nitrogen source was added to the basal medium at the concentration of 0.02 M.

Mycelial growth (mm) was calculated (n=3) after 10 days of incubation on potato dextrose agar (PDA) medium at 25°C and pH 6.

REFERENCES

- Chi, J.H., T.M., Ha, Y.H. Kim and Y.D. Rho. 1996. Studies on the main factors affecting the mycelial growth of *Phellinus linteus*. Korean J. Mycol. 24:214-222.
- Elliott, T.J. 1985. Spawn-making and spawns. In *The Biology and Technology of the Cultivated Mushroom*. Edited by P. B. Flegg, D. M. Spencer & D. A. Wood. Chichester: Wiley. pp. 131-139.
- Fritsche, G. 1966. Versuche zur frage der erhaltungszucht beim kulturchampignon. I. vermehrung durch teilung des mycels. Der Zuchterl Genetics and Breeding Research 36:66-79.
- Fritsche, G. 1970. Versuche zum problem der flauschbildung beim kulturchampignon. Theoretical and Applied Genetics 40:322-326.
- Hur, H. 2008. Cultural characteristics and log-mediated cultivation of the medicinal mushroom, *Phellinus linteus*. Mycobiol. 36:81-87.
- Intiaj, A., C. Jayasinghe, G.W. Lee, M.J. Shim, H.S. Rho, H.S. Lee, H. Hur, M.W. Lee, U.Y. Lee and T.S. Lee. 2008. Vegetative growth of four strains of *Hericium erinaceus* collected from different habitats. Mycobiol. 36:88-92.
- Kim, Y.W., K.H. Kim, H.J. Choi and D.S. Lee. 2005. Antidiabetic activity of β -glucans and their enzymatically hydrolyzed oligosaccharides from *Agaricus blazei*. Biotechnology Letters, 27(7):483-487.
- Kimura, Y., T. Kido, T. Takaku, M. Sumiyoshi and K. Baba. 2004. Isolation of an anti-angiogenic substance from *Agaricus blazei* Murill: its antitumor and antimetastatic actions. Cancer Science, 95(9):758-764.
- Ma, Y., C.Y. Guan and X.J. Meng. 2014. Biological characteristics for mycelial growth of *Agaricus bisporus*. Applied Mechanics and Materials, 508:297-302.
- Mizuno, T. 2002. Medicinal properties and clinical effects of culinary-medicinal mushroom *Agaricus blazei* Murrill (Agaricomycetideae). International Journal of Medicinal Mushrooms, 4(4):299-312.
- Oshiman, K., Y. Fujimiyu, T. Ebina, I. Suzuki and M. Noji. 2002. Orally administered beta-1,6-D-polyglucose extracted from *Agaricus blazei* results in tumor regression in tumor-bearing mice. Planta Medica, 68(7):610-614.
- Rodrigues, S.B., I.A.S. Jabor, G.G. Marques-Silva and C.L.M.S.C. Rocha. 2003. Avaliação do potencial antimutagênico do cogumelo do sol (*Agaricus blazei*) no sistema *methG1* em *Aspergillus* (*Emericella*). Acta Scientiarum. Agronomy, 25(2):513-517.
- Shim, I.O., S.G. Son, Y.H. Kim, Y.S. Lee, J.Y. Lee, T.S. Lee, S.S. Lee and M.W. Lee. 1997. The culture

conditions affecting the mycelial growth of *Grifola umbellata*. Kor. J. Mycol. 25:209-218.

Shim, S.M., Y.H. Oh, K.R. Lee, S.H. Kim, K.H. Im, J.W. Kim, U.Y. Lee, J.O. Shim, M.J. Shim, M.W. Lee, H.S. Ro, H.S. Lee and T.S. Lee. 2005. The characteristics of culture conditions for the mycelial growth of *Macrolepiota procera*. Mycobiol. 33:15-18.

Souza-Paccola, E.A., C.A. Bomfeti, L.C.L. Fávaro, I.C.B. Fonseca and L.D. Paccola-Meirelles. 2004.

Antimutagenic action of *Lentinula edodes* and *Agaricus blazei* on *Aspergillus nidulans* conidia. Brazilian Journal of Microbiology, 35(4):311-315.

Sung, J.M., C.H. Kim, K.J. Yang, H.K. Lee and Y.S. Kim. 1993. Studies on distribution and utilization of *Cordyceps militaris* and *C. nutans*. Kor. J. Mycol. 21:94-105.

Effect of Culture Media, pH and Temperature on Mycelial Growth of *Agaricus Bisporus* Strains

M.K. Yadav* and Ram Chandra

Department of Mycology and Plant Pathology, Institute of Agricultural Sciences,
Banaras Hindu University, Varanasi - 221005, India.

(Received: 13 November 2013; accepted: 20 January 2014)

The several fungi are edible mushrooms and are saprophytic basidiomycetes, which have been successfully cultivated at commercial level worldwide using lignocellulose wastes as substrates for their cultivation. In the present investigation that were the studies of effect of different culture media, pH and temperature on mycelia growth of strains (S-79, A-15 and Delta) of *A. bisporus*. Five culture media were tested for the radial growth and measured the mycelia growth on PDA of three strains S-79, A-15 and Delta were obtained fast and full growth (9 cm) completed in 8, 10 and 12 days respectively. The effect of different pH were tested for the radial growth and measured the mycelial growth on 9 pH of all three strains S-79, A-15 and Delta were obtained fast and full growth (9 cm) completed in 12, 12 and 14 days respectively. The growth of mycelial in 8pH was good performance in all strains of *A. bisporus* followed by 7 pH. Mycelial growth was much slow on 6 pH and full growth completed in 18 days. The effect of different temperature was evaluated on mycelia growth of strains of *A. bisporus*. Mycelial growth of all three strains on 25°C was obtained fast and full growth (9 cm) completed in 8, 10 and 14 days respectively, followed by growth of mycelial at 20°C and 30°C were similar performance in all strains of *A. bisporus* and the mycelial growth was much slow on 15°C and full growth completed in 18 days.

Key words: *A. bisporus* strains, mycelial growth, culture media, pH and temperature.

Agaricus bisporus (Lange) Sing is popularly known as the button mushroom. This mushroom is extensively cultivated throughout the world and contributes about 40% of the total world production of mushroom. Button mushroom is one of the largely growing mushrooms and has the good demand in the market and world trade too. By keeping this view in mind the choice of the farmers for growing of any crops variety depends upon its yielding ability. It means the cost-benefit (C: B) ratio should always be in favour of the farmer. Scientist are suggesting to farmers for growing

the high yielding mushroom strains. To make the farmer's aware about the best strains for the cultivation of mushroom although most of the farmer's using especially for edible mushroom so little effort has been made "to innovate the farmer's about the effect of best strains on the growth, number of sporophores and yield of button mushroom or obtained high output". Prakasam and Singh (2008), stated that investigate strains were studied on the basis of growth on MEA medium, the different characters of their fruiting body. S-130 showed maximum growth on MEA medium whereas NCB-13 produced higher fruit body weight and stipe width. Lesser stipe length and maximum pileus diameter were observed in strain Delta. Maximum pileus thickness was observed in CM-5.

* To whom all correspondence should be addressed.

Andrade, *et al.* (2010), the *in vitro* mycelium growth of *Agaricus bisporus* strains ABI-05/03, ABI-06/04, ABI-04/02, ABI-06/05 and ABI-01/01 was evaluated performed by means of measurements of four diameters of the colonies, every 48 hours, during 12 days of incubation in darkness under 20 and 25°C.

In mushroom cultivation, mushroom mycelium absorbs food from the natural or semi-synthetic composts on which they grow. The mycelium branches and produces enzymes that digest complex carbohydrate, lipids and protein, which are then easily absorbed by the hyphae. The mycelium penetrate the compost during spawn run stage, mushroom growth take place, and energy stored until fruiting bodies are formed. The fruiting stage is the formation of the primordial, formed from an aggregation of mycelium after casing soil. Therefore, present investigation was based on the

effect of different culture media, pH and temperature for the mycelia growth of three strains of button mushroom (*Agaricus bisporus*).

MATERIALS AND METHODS

Collection of mushroom culture

Three strains S-79, A-15 and Delta of *Agaricus bisporus* were obtained from GB.P.U.A.T, Pantnagar (Uttarakhand). These cultures were sub-cultured and maintained on PDA medium in a B.O.D. incubator at 25±2° C temperature.

Preparation of culture media

The pure culture of cultivated mushrooms can be obtained on the following media. These media generally used as substrate for isolation, sub-culture, maintenance and preservation of mushroom culture.

Contents of media	Medium				
	PDA	MEA	WEA	CEA	YPDA
Peeled potato	250g	-	-	-	250g
Malt extracts	-	25g	-	-	-
Wheat grain	-	-	100g	-	-
Ready synthetic compost	-	-	-	100g	-
Yeast extracts	-	-	-	-	1.0g
Dextrose	20g	-	-	-	20g
Agar agar	20g	20g	20g	20g	20g
Distilled water	1L	1L	1L	1L	1L

Whereas, PDA- Potato dextrose agar, MEA- Malt extract agar, WEA- Wheat extracts agar, CEA- Compost extract agar, YPDA-Yeast extract potato dextrose agar, g-Gram, L-Litre

Sliced potato was boiled in distilled water for 20-25 minutes till these become soft. Extract was filtered with a muslin cloth and add 20g dextrose and 20g agar powder to the filtrate over a hot plate by stirring. The final volume of the medium was adjusted to one liter by adding required amount of distilled water. The medium was taken in flask were plugged with non-absorbent cotton and sterilized in autoclave at 121°C (15lb/sq. inch pressure) for 30 minutes.

Wheat grains were boiled in 1 liter distilled water for one hour. Filter the extract after 24 hour. Agar was added to the supernatant by stirring with a glass rod over a hot plate. The final volume of

medium was adjusted to 1 liter by adding required amount of distilled water. The medium was then autoclaved as above.

Malt extract medium was prepared by malt extracts 25g and Agar 20g was dissolved in 1liter warm distilled water. Compost extract agar medium was prepared by same method of wheat grain extract agar medium. Yeast Extract Potato Dextrose Agar (YPDA) was also prepared by PDA medium.

Maintaining temperature

In case of temperature effect was different strains (S-79, A-15 & Delta) of *Agaricus bisporus*. The inoculums were transferred in Petri-plates which poured by PDA in laminar flow. Then the inoculated Petri-plates took in incubator where different temperature were 15°C, 20°C, 25°C and 30°C and then observing the radial growth of fungi or mushroom.

Maintaining pH in medium

The pH was maintaining in potato dextrose agar media with the help of base and acids. Firstly make the medium without agar and adjusted the pH (6, 7, 8 & 9) with the help of pH meter. After adjusting the pH mixed the agar-agar and then sterilized the medium in autoclave at 121°C (15lb/sq. inch pressure) for 25-30 minutes. After autoclaved melt medium pour in sterilized Petri-plates in laminar flow and took for the solidification of media. After solidifying of medium in laminar flow then inoculate culture in Petri-plates and kept in incubator where temperature was 25°C.

RESULTS AND DISCUSSION

Effect of culture media

The results presented in Table 1 revealed that the studies of effect of different culture media on mycelia growth of strains (S-79, A-15 and Delta) of *A. bisporus*. Five culture media were tested for the radial growth and measured two days interval. The result showed the mycelial growth on PDA of all three strains S-79, A-15 and Delta were obtained fast and full growth (9 cm) completed in 8, 10 and 12 days respectively. The growth of mycelial in YPDA medium was good performance in all strains of *A. bisporus* followed by the WGEA and SCA culture media. The mycelial growth was very slow on MEA medium and full growth completed in 18 days.

The similar works of Furlan *et al.* (1997) had been observed mycelial growth on different growth media and under different culture media conditions was investigated in 7 strains of edible fungi. Mycelial growth rates were investigated higher on WDA (wheat/dextrose/agar) medium than on PDA (potato/dextrose/agar) or MPA (malt/ Soya peptone/agar) media in all strains.

Effect of temperature

The results presented in Table 2 revealed that the studies of effect of different temperature on mycelia growth of strains (S-79, A-15 and Delta) of *A. bisporus*. Four different temperatures were tested for the radial growth and measured two days interval. The result showed the mycelial growth of all three strains S-79, A-15 and Delta on 25°C was obtained fast and full growth (9cm) completed in 8, 10 and 14 days respectively, followed by the growth of mycelial at 20°C and 30°C were similar

performance in all strains of *A. bisporus* and the mycelial growth was much slow on 15°C and full growth completed in 18 days. The data recorded was subjected to statistical analysis. The differences in data in the various experiments were tested for their significance by employing RBD. The temperature differs for mycelium growth on different strains of *A. bisporus*.

Similar result given by Andrade *et al.*

Table 1. Effect of different culture media on mycelial growth of strains of *Agaricus bisporus*

Culture media	Radial full growth (9cm) of strains in days		
	S-79	A-15	Delta
PDA	8	10	12
YPDA	10	12	14
WGEA	12	14	16
MEA	14	14	18
SCA	14	14	16
SE	1.79	1.49	1.46
CD (0.05%)	3.69	3.07	3.01

Table 2. Effect of different Temperature on mycelial growth of strains of *Agaricus bisporus*

Temperature (°C)	Radial full growth (9cm) of strains in days		
	S-79	A-15	Delta
15	12	14	18
20	10	12	16
25	8	10	14
30	10	12	16
SE	1.48	1.45	1.05
CD (0.05%)	3.10	3.04	2.20

Table 3. Effect of different Temperature on mycelial growth of strains of *Agaricus bisporus*

pH	Radial full growth (9cm) of strains in days		
	S-79	A-15	Delta
6	14	16	18
7	14	14	18
8	12	12	16
9	12	12	14
SE	1.25	1.56	1.16
CD (0.05%)	2.62	3.27	2.43

(2010), had been observed mycelium growth of *Agaricus bisporus* strains ABI-05/03, ABI-06/04, ABI-04/02, ABI-06/05 and ABI-01/01 was evaluated performed by means of measurements of four diameters of the colonies, every 48 hours, during 12 days of incubation in darkness under 20°C and 25°C, it was verified that: mycelium growth of *A. bisporus* is influenced by the temperature of incubation; temperature of 25°C was more favourable to the mycelium growth of all *A. bisporus* strains; under temperature of 20°C, strain ABI-01/01 showed significantly higher growth than all other strains.

Effect of pH

The results presented in Table 3 revealed that the studies of effect of different pH on mycelia growth of strains (S-79, A-15 and Delta) of *A. bisporus*. pH were tested for the radial growth and measured two days interval. The result showed the mycelial growth on 9 pH of all three strains S-79, A-15 and Delta were obtained fast and full

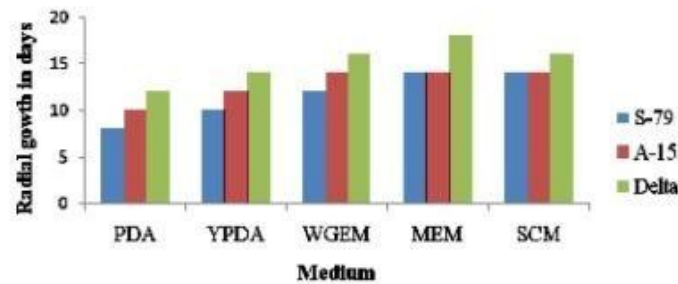


Fig. 1. Effect of culture media on different strains of *A. bisporus*

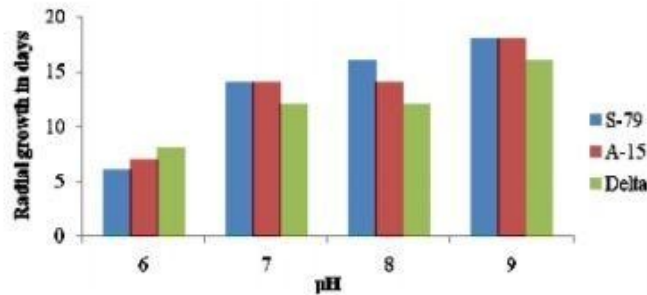


Fig. 2. Effect of pH on different strains of *A. bisporus*

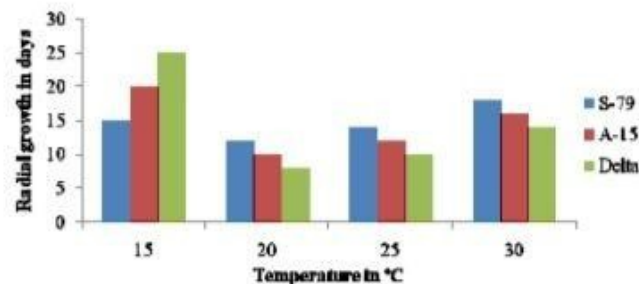


Fig. 3. Effect of Temperature on different strains of *A. bisporus*

growth (9 cm) completed in 12, 12 and 14 days respectively. The growth of mycelial in 8pH was good performance in all strains of *A. bisporus* followed by the 7 pH. The mycelial growth was much slow on 6 pH and full growth completed in 18 days.

Similar works giving by Shukla *et al.* (2003) had been observed mycelium growth on different pH, which investigated the suitable pH (3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0 and 8.5), for the growth of button mushroom. For studies on the suitable pH, the fungi were incubated at $24 \pm 1^\circ\text{C}$. The best pH level for fungal growth was 6.0. The maximum mycelial dry weight (100 mg) was obtained at pH 6.0, followed by pH 5.5 with 86.66 mg mycelial dry weight.

Experimental findings of comparative evaluation of culture media, pH and temperatures for mycelial growth of tree strains of *Agaricus bisporus* and concluded that PDA medium temperature 25°C and pH 9 gave the fast growth of mycelium and appeared to better in maintenance of culture and sub-culture. This investigation will help for selection of culture media, pH and temperature for the maintenance of genetic materials and cultivation at commercial level.

ACKNOWLEDGEMENTS

With immense pleasure and profound sense of gratitude, indeed, I take this opportunity to express my heartfelt and sincere thanks to my esteemed supervisor, Dr. Ram Chandra, Associate Professor, Department of Mycology & Plant Pathology, Institute of Agricultural Science, Banaras Hindu University, Varanasi, India.

REFERENCES

1. Andrade MCN, de Chavari JL, Minihoni MT and de A Zied DC 2010. In vitro mycelium growth of five *Agaricus bisporus* strains submitted to temperature condition. *Acta Scientiarum - Agronomy*. **32**: 1, 69-72.
2. Furlan SA, Vimond LJ, Miers DA, Bonatti M, Gern RMM and Jonas R 1997. Mushroom strains able to grow at high temperature a low pH value. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. **13**: 6, 689-692.
3. Prakasam V and Singh RP 2008. Studies on the basis of growth on MEA medium, Cultural and morphological characteristics of white button mushroom. *Annals of Plant Protection Sciences*. **16**: 2, 454-457.
4. Shukla HP, Pandey M and Ratan V 2003. Physiological studies on vegetative growth of button mushroom. *Farm Science Journal*. **12**: 1, 59-60.

Grateful acknowledgment is made to the Rockefeller Foundation for the award of a Fellowship (to W. M.) and to Dr. C. W. Crane, Queen Elizabeth Hospital, Birmingham, for ^{15}N analyses.

The Macaulay Institute for Soil Research
Craigiebuckler, Aberdeen

Received 18 April, 1963; amended manuscript 20 June, 1963

References

- ¹ Kojima, R. T., *Soil Sci.*, 1947, **64**, 157
- ² Bremner, J. M., (a) *J. Sci. Fd Agric.*, 1952, **3**, 497; (b) *J. Soil Sci.*, 1951, **2**, 67; 1954, **5**, 214; (c) *Soils & Fert.*, 1956, **19**, 115
- ³ Broadbent, F. E., & Norman, A. G., *Proc. Soil Sci. Soc. Amer.*, 1956, **11**, 264; Broadbent, F. E., *ibid.*, 1948, **12**, 246
- ⁴ Ziemiecka, J., & Kobus, J., *Trans. 7th Int. Congr. of Soil Sci.* (Madison), 1960, Vol. 3, 679
- ⁵ Winsor, G. W., *J. Sci. Fd Agric.*, 1958, **9**, 792
- ⁶ Waksman, S. A., & Tenney, F. G., *Soil Sci.*, 1927, **24**, 317
- ⁷ Parbery, M. H., & Swaby, A. J., *Agric. Gaz. N.S.W.*, 1942, **53**, 257
- ⁸ Myskow, W., *Pamiętnik Pulawski*, 1961, **4**, 25
- ⁹ (a) Wheeler, B. E. J., & Yemm, E. W., *Plant & Soil*, 1958, **10**, 49; (b) Putnam, D. H., & Schmidt, E. L., *Soil Sci.*, 1959, **87**, 22; (c) Paul, E. A., & Schmidt, E. L., *Proc. Soil Sci. Soc. Amer.*, 1961, **25**, 369
- ¹⁰ Wallace, R. H., & Lochhead, A. G., *Canad. J. Res.*, 1950, **28C**, 1
- ¹¹ Gosh, B. P., & Burris, R. H., *Soil Sci.*, 1950, **70**, 187
- ¹² (a) Stevenson, F. J., *Proc. Soil Sci. Soc. Amer.*, 1956, **20**, 204; (b) Rothwell, D. F., & Frederick, L. R., *Proc. Soil Sci. Soc. Fla.*, 1956, **16**, 157
- ¹³ Bremner, J. M., (a) *Biochem. J.*, 1950, **47**, 338; (b) *J. agric. Sci.*, 1955, **45**, 469
- ¹⁴ Stevenson, I. L., *Canad. J. Microbiol.*, 1962, **8**, 501
- ¹⁵ Van Slyke, D. D., & Folch, J., *J. biol. Chem.*, 1940, **136**, 509
- ¹⁶ Bremner, J. M., *Analyst*, 1949, **74**, 492
- ¹⁷ McKenzie, H. A., & Wallace, H. S., *Aust. J. Chem.*, 1954, **7**, 55
- ¹⁸ Hoskins, J. L., *Analyst*, 1944, **69**, 271
- ¹⁹ Bremner, J. M., & Shaw, K., *J. agric. Sci.*, 1955, **46**, 320
- ²⁰ DeKock, P. C., & Morrison, R. I., *Biochem. J.*, 1958, **70**, 266
- ²¹ Barrolier, J., Heilmann, J., & Watzke, E., *Hoppe-Seyl. Z.*, 1957, **309**, 219
- ²² Morgan, W. T. J., & Elson, L. A., *Biochem. J.*, 1934, **28**, 988
- ²³ Duff, R. B., & Eastwood, D. J., *Nature, Lond.*, 1950, **165**, 848
- ²⁴ Paech, K., & Tracey, M. Y., 'Modern Methods of Plant Analysis', 1955, Vol. 2, p. 22 (Berlin: Springer)
- ²⁵ Timell, T. E., *Svensk Papperstidn.*, 1960, **63**, 668
- ²⁶ Schneider, R., *Ber. Schweiz. bot. Ges.*, 1930, **60**, 244
- ²⁷ Stevenson, I. L., *Canad. J. Microbiol.*, 1959, **5**, 229
- ²⁸ Sumner, J. B., & Gjessing, E. C., *Arch. Biochem.*, 1943, **2**, 291
- ²⁹ Greenwood, D. J., & Lees, H., *Plant & Soil*, 1960, **12**, 175
- ³⁰ Meister, A., 'Biochemistry of the Amino Acids', 1957, p. 293 (New York: Academic Press)
- ³¹ Sowden, F. J., & Ivanson, K. C., *Plant & Soil*, 1959, **11**, 249
- ³² Stevenson, F. J., *Proc. Soil Sci. Soc. Amer.*, 1956, **20**, 201
- ³³ Cummins, C. S., & Harris, H., *J. gen. Microbiol.*, 1956, **14**, 583
- ³⁴ Work, E., *Nature, Lond.*, 1957, **179**, 841
- ³⁵ Barrow, N. J., & Jenkinson, D. S., *Plant & Soil*, 1962, **16**, 258
- ³⁶ Daji, J. A., *J. agric. Sci.*, 1934, **24**, 15
- ³⁷ Quastel, J. H., & Sholefield, P. G., *Bact. Rev.*, 1951, **15**, 1
- ³⁸ Waksman, S. A., 'Humus', 1936, p. 99 (London: Baillière, Tindall & Cox)
- ³⁹ Ghildyal, B. P., & Gupta, U. C., *Plant & Soil*, 1959, **11**, 312

DETERMINATION OF NITRATE IN FERMENTATION MEDIA BY A MODIFICATION OF THE NITRON METHOD

By A. C. RAE* and A. N. HALL†

A method is described which is suitable for the determination of nitrate in complex culture media. Nitrate is first precipitated as nitron nitrate and the precipitate reduced to ammonia by Devarda's alloy. The ammonia is distilled and determined colorimetrically by means of Nessler's reagent. Recoveries are in the range 98–102% for amounts of nitrate between 0.1 and 1.0 mg. per ml. of solution.

* Present address: Dept. of Nutrition, Queen Elizabeth College, London, W.8

† Present address: East African Industrial Research Organization, Dagenham Road, P.O. Box 1587, Nairobi, Kenya

Introduction

The principal chemical procedures available for the determination of nitrates can be broadly classified into methods depending (1) on reduction to ammonia or nitrite, (2) on nitration reactions, (3) on the oxidising power of nitrate in strongly acid media and (4) on precipitation with nitron (1,4-diphenyl-3,5-endoanilo-4,5-dihydro-1,2,4-triazole). Bearing in mind that many of these procedures are susceptible to interference by carbohydrates, by nitrogen in either organic or inorganic combinations, inorganic ions and coloured materials, the performance of the relatively specific nitron precipitation method was tested in the presence of yeast extract.

Gravimetric analysis for nitrate (Cooper & Yardley¹) in a solution of potassium nitrate containing 1% (w/v) of Difco yeast extract, by precipitation as nitron nitrate gave results which tended to be high: at nitrate concentrations lower than 0.3 mg. per ml. of test solution recoveries were in excess of 110%. This finding led to the development of a procedure for the reduction of the nitrate ion in nitron nitrate to ammonia which is finally determined colorimetrically with Nessler's reagent.

Experimental

Reagents

- (1) *Nitron*.—Dissolve 10 g. of nitron in 100 ml. of 5% (w/v) solution of acetic acid; store the reagent in a dark, airtight bottle.
- (2) *Devarda's alloy*.—Finely powdered alloy is washed successively with ether and water and then dried.
- (3) *Nessler's reagent*.²
- (4) *Potassium nitrate*.—Dry analytical grade material for 2 h. at 170° before use.
- (5) *Nitrogen-free water* is used for the preparation of all solutions and for washing all apparatus.

Procedure

Transfer a 10-ml. sample of test solution containing 0.1 to 1.0 mg./ml. of NO_3^- ion to a 6 × 1 in. Pyrex test tube. Add 1.5 ml. of A.R. conc. sulphuric acid dropwise with shaking. Heat the mixture to 70° on a water bath and add 1.5 ml. of nitron reagent. Cool and set aside at 0° for a few hours, preferably overnight, to allow crystallisation of nitron nitrate to proceed to completion (occasional shaking assists this process). Filter through an ice-cold filterstick (porosity grade No. 3) to collect the precipitate and wash with two 3-ml. portions of water at 0° (washing with a saturated solution of nitron nitrate was found to be unnecessary). Dissolve the precipitate in about 15 or 30 ml. of hot water by drawing the water through the filterstick in the direction opposite to that used in filtration. Transfer the cooled solution to a 50 ml. or 100 ml. volumetric flask and adjust the volume at 20°.

Transfer a sample of the aqueous solution of nitron nitrate, containing 0.2–0.5 mg. of NO_3^- ion or a 5- or 10-ml. sample if the approximate concentration of nitrate is unknown, to a 100-ml. bolt-head flask. Dilute to about 15 ml., mix with 15 ml. of 2N-sodium hydroxide and gently boil for a few minutes to remove any free ammonia present. Cool the solution, add about 0.1 g. of Devarda's alloy and immediately attach the flask to a distillation apparatus fitted with a receiver containing a few ml. of dilute hydrochloric acid sufficient to cover the tip of the delivery tube. Heat the flask gently for about 10 min., or until violent frothing has ceased, and then more strongly until about 15 ml. of distillate have been collected. Add 2.5 ml. of Nessler's reagent and adjust the volume to 25 ml. Measure the optical density immediately against a water blank. For this purpose a Hilger Spekker Photoelectric Absorptiometer (peak of maximum transmission 470 mμ was used). Make appropriate blank corrections and determine the amount of NO_3^- ion by reference to a standard curve prepared by submitting known amounts of potassium nitrate to the procedure. Nitron, itself, gives no ammonia under these conditions.

Results

A standard curve of mg. of NO_3^- ion plotted against optical density (O.D.) was constructed from results obtained using 10 ml. samples of standard potassium nitrate solutions. There was good linear relationship for amounts of NO_3^- ion in the range 0.1–0.7 mg./ml.

Table I shows the recovery of NO_3^- ion from solutions of known amounts of potassium nitrate

J. Sci. Fd Agric., 1963, Vol. 14, November

in a medium which contained per 100 ml., Difco yeast extract (1 g.), sucrose (5 g.), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (50 mg.), $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (36 mg.), K_2SO_4 (22 mg.), $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (16 mg.) and $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (5 mg.).

Table I

Recovery of added nitrate from a solution containing yeast extract, sucrose and inorganic salts

NO_3^- added, mg./10 ml.	NO_3^- recovered mean $\pm$ S.D., mg.	C.V. %	Recovery of added NO_3^- , %
10.45	10.41 $\pm$ 0.09	0.86	99.6
8.36	8.39 $\pm$ 0.04	0.48	100.4
6.27	6.36 $\pm$ 0.05	0.79	101.4
4.18	4.20 $\pm$ 0.06	1.43	100.5
2.09	2.07 $\pm$ 0.015	0.72	99.0
1.05	1.05 $\pm$ 0.010	0.95	100.0

S.D. = Standard Deviation

C.V. = Coefficient of variation

5 Replicates were analysed at each nitrate concentration

Table II presents analyses of solutions from cultures of the mould *Penicillium soppi* Zaleski to which known amounts of potassium nitrate were added after harvesting. Before inoculation with mould spores the culture medium contained, per 100 ml., sucrose 1.7 g., NH_4NO_3 0.15 g. and the five inorganic salts employed in the previous experiment.

Table II

Recovery of added nitrate from culture of *Penicillium soppi* Zaleski

NO_3^- present, mg./10 ml.	NO_3^- added, mg.	Total NO_3^- recovered, mean $\pm$ S.D., mg.	C.V. %	Recovery of added NO_3^- , %
2.37	6.03	8.46 $\pm$ 0.04	0.47	101.0
2.37	2.86	5.18 $\pm$ 0.02	0.39	98.2
0.95	0.46	1.42 $\pm$ 0.01	0.70	102.2
0.17	0.25	0.40 $\pm$ 0.02	5.00	92.0

5 Replicates were analysed at each nitrate concentration

Discussion

Although the procedure is rather lengthy when viewed in terms of the time which elapses between precipitation of the nitron nitrate and obtaining the final result, the actual working time is in fact small. The range of application of the method has not been studied, but in principle it should be suitable for the determination of nitrate in plant, soil and meat extracts. Certainly, the procedure has been most useful in studies which required many estimations of nitrate in mould culture solutions containing high concentrations of sucrose and appreciable amounts of organic nitrogen and inorganic salts. No preliminary decolorisation is necessary, and so far as is known only mercuric and nitrite ions interfere. Nitrites can, moreover, be readily removed by treatment with either hydrazine sulphate or aminosulphonic acid.¹

For the determination of nitrate in coloured solutions containing organic matter, such as sugars and protein, the method would appear to be more appropriate than some other procedures. Reducing sugars, for instance, in the presence of strong acid effect the reduction of nitrate to ammonia and hence interfere in the colorimetric method discussed by Chamot & Pratt² which is based on the nitration of phenoldisulphonic acid (cf. Barnes⁴) and in the procedure which determines nitrate in terms of the difference between two Kjeldahl analyses, one for total-N and one for non-nitrate-N (Elek & Sobotka⁵). In addition, sugars tend to char under the influence of strong mineral acid and thus exert an adverse effect on colorimetric methods such as that with phenoldisulphonic acid. Amino-N is recognised to interfere in the estimation of nitrate by methods depending upon reduction to ammonia by alloys or metals^{6, 7} or to nitrite.⁸

J. Sci. Fd Agric., 1963, Vol. 14, November

Acknowledgments

Thanks are due to Prof. T. K. Walker for his interest in this work, and to the Medical Research Council for a scholarship awarded to one of the authors (A. C. R.).

Dept. of Biochemistry
Manchester College of Science and Technology
Manchester, 1

Received 25 April, 1963

References

- ¹ Cooper, T. H., & Yardley, J. T., 'Organic Reagents for Metals', ed. Johnson, W. C., 1953, p. 119 (Chadwell Heath, Essex: Hopkin & Williams Ltd.)
- ² 'Handbook of Chemistry and Physics', 1956-1957, 38th Edn, p. 1553 (Cleveland, Ohio: Chemical Rubber Publishing Co.)
- ³ Chamot, E. M., & Pratt, D. S., *J. Amer. chem. Soc.*, 1911, **33**, 366, 381
- ⁴ Barnes, H., *Analyst*, 1950, **75**, 388
- ⁵ Elek, A., & Sobotka, H., *J. Amer. chem. Soc.*, 1926, **48**, 501
- ⁶ 'Official Methods of Analysis of the Association of Official Agricultural Chemists', 1955, 8th Edn, p. 13 (Washington, D.C.: The Association)
- ⁷ Murphy, R. P., *J. Sci. Fd Agric.*, 1957, **8**, 231
- ⁸ Nelson, J. L., Kurtz, L. T., & Bray, R. H., *Analyt. Chem.*, 1954, **26**, 1081

THE INTERACTION BETWEEN PHYTIC ACID AND DIVALENT CATIONS DURING THE COOKING OF DRIED PEAS

By D. E. C. CREAN and D. R. HAISMAN

The combination between phytate and the calcium and magnesium ions in peas cooked for various times in solutions of varying degrees of hardness has been studied. Experiments on the effect of ionic environment on the composition of mixed calcium and magnesium salts of phytic acid indicate that the composition of the insoluble phytate in peas varies between the tricalcium dimagnesium dihydrogen and the dicalcium trimagnesium dihydrogen salts. Since cooking in extremely hard water complexes only 60% of the total phytate in the peas, and the absorption curves show that insoluble phytates account for only a proportion of the absorbed ions, it is concluded that the influence of phytate ions on texture is small.

Introduction

Dried peas are a staple stored foodstuff, useful in the canning industry for maintaining production in the slack season; when cooked in cans they are popularly known as 'processed peas'. The texture of these cooked peas tends to be variable, sometimes making quality control difficult, and has been extensively investigated in recent years. It is thought that the texture is largely determined by the ease of thermal breakdown of middle lamellae pectins and the plasticity of the cell walls in the parenchyma tissue.^{1, 2}

The deleterious effect of calcium and magnesium, either already present in the peas or added in the cooking, on the cooking quality is well known, and is most probably due to the cross-linking of uronic acid groups, rigidifying both middle lamellae and cell walls. Dried peas frequently contain a considerable quantity of phytic acid (inositol hexaphosphoric acid) which serves as a phosphorus store during the dormancy of the seed.³ Phytic acid is an effective precipitant for calcium and magnesium ions and for this reason its occurrence in foodstuffs arouses interest both in its dietary effect and possible rachitogenic action⁴ and in its effect on textural changes. Mattson⁵ has proposed that the texture of yellow peas is entirely dependent on their phytate content and showed in a series of experiments the deterioration in

J. Sci. Fd Agric., 1963, Vol. 14, November