

СЕЛЕКЦИЯ, СЕМЕНОВОДСТВО И БИОТЕХНОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ / PLANT BREEDING, SEED PRODUCTION AND BIOTECHNOLOGY

DOI: <https://doi.org/10.60797/JAE.2024.52.5>

МАТЕМАТИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ ГЛУБИННОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ БИОМАССЫ *PLEUROTUS CITRINOPILEATUS*

Научная статья

Иванов З.А.^{1,*}, Васюк А.Е.², Есякова О.А.³, Ушанов С.В.⁴

¹ ORCID : 0009-0009-0682-897X;

^{1,2,3,4} СибГУ науки и технологий им. М.Ф. Решетнева, Красноярск, Российская Федерация

* Корреспондирующий автор (zaharivanov53345[at]gmail.com)

Аннотация

Данная работа посвящена математическому описанию проведённого глубинного культивирования такого объекта исследования, как РС-1.2 ксилотрофного базидиомицета *Pleurotus citrinopileatus* (*P. citrinopileatus*) – вешенка лимонная, чистая культура которого была выделена из коммерческих плодовых тел.

Сам эксперимент – глубинное культивирование, проводили в стационарном лабораторном биореакторе «CeCa-Cx650, Великобритания» при температуре 26 °С, pH 5,0 и непрерывном перемешивании путем барботирования стерильным воздухом.

На основании экспериментальных данных построена кривая роста глубинной культуры *Pleurotus citrinopileatus* при засевной концентрации 1 г/л. Показано, что кривую роста точно описывает уравнение Моно. Разработана математическая модель роста глубинной культуры. Проверена ее однородность и адекватность. Применение разработанной математической модели позволяет характеризовать поведение культуры в глубинных условиях, устанавливать оптимальную начальную концентрацию мицелия в биореакторе, прогнозировать время и скорость накопления максимального количества биомассы при различных засевных концентрациях.

Ключевые слова: *Pleurotus citrinopileatus*, глубинная биомасса, культивирование, математическая модель роста культуры, уравнение Моно, удельная скорость роста, критерий Кохрена, критерий Фишера, критерий Фрочини.

MATHEMATICAL MODEL OF DEEP CULTIVATION OF *PLEUROTUS CITRINOPILEATUS* BIOMASS

Research article

Ivanov Z.A.^{1,*}, Vasyuk A.E.², Yesyakova O.A.³, Ushanov S.V.⁴

¹ ORCID : 0009-0009-0682-897X;

^{1,2,3,4} Reshetnev Siberian State University of Science and Technology, Krasnoyarsk, Russian Federation

* Corresponding author (zaharivanov53345[at]gmail.com)

Abstract

This work is dedicated to the mathematical description of the conducted deep cultivation of such research object as PC-1.2 of xylophilic basidiomycete *Pleurotus citrinopileatus* (*P. citrinopileatus*) – lemon oyster mushroom, pure culture of which was isolated from commercial fruiting bodies.

The experiment itself, deep cultivation, was carried out in a fixed laboratory bioreactor "CeCa-Cx650, UK" at 26 °C, pH 5.0 and continuous stirring by bubbling with sterile air.

The growth curve of *Pleurotus citrinopileatus* deep culture at inoculum concentration of 1 g/l was constructed on the basis of experimental data. It is shown that the growth curve is accurately described by the Mono equation. A mathematical model of deep culture growth was developed. Its homogeneity and adequacy have been checked. Application of the developed mathematical model allows to characterize the behaviour of the culture in deep conditions, to establish the optimal initial concentration of mycelium in the bioreactor, to predict the time and rate of accumulation of the maximum amount of biomass at different seeding concentrations.

Keywords: *Pleurotus citrinopileatus*, deep biomass, cultivation, mathematical model of culture growth, Mono equation, specific growth rate, Cochran criterion, Fisher criterion, Frocini criterion.

Введение

В современном обществе белок является наиболее дефицитным компонентом пищи. Ценность пищевого белка определяется схожестью его аминокислотного состава с аминокислотным составом белков потребляющего его организма, что позволяет последнему активно усваивать и использовать подобные продукты в разнообразных метаболических процессах. В последние десятилетия значительное внимание исследователей в качестве продуцентов белка привлекают базидиальные грибы как источник белка, богатого незаменимыми аминокислотами.

Одним из перспективных продуцентов для получения грибного белка, является представитель рода *Pleurotus* – вешенка лимонная. Этот гриб, как в природных условиях, так и в культуре, непатогенен, обладает высокой пищевой ценностью и способен эффективно утилизировать разнообразные растительные субстраты.

Известно, что в плодовых телах вешенки лимонной (*P. citrinopileatus*) наряду с белком, содержатся и биологически активные вещества, способные не только предупреждать, но и лечить широкий спектр заболеваний. Так, исследования последних лет [1], [2], [3] свидетельствуют, что этот гриб обладает способностью снижать уровень глюкозы в крови человека, оказывает противоопухолевое действие, повышает иммунную устойчивость организма.

Сегодня показано, что культивируемый в глубинных условиях мицелий *Pleurotus* не уступает, а в ряде случаев по содержанию белка превосходит их плодовые тела [4], [5], [6]. При этом глубинный мицелий имеет ряд преимуществ перед плодовым телом, из которых наиболее важные – чистота и стабильный химический состав. Таким образом, глубинное культивирование биомассы мицелия *P. citrinopileatus* является одним из перспективных направлений получения пищевого и кормового белка [7], [8], [9].

Процесс получения мицелия по сравнению с выращиванием плодовых тел более высокопроизводителен при сравнительно низких энерго- и трудозатратах. Разработке эффективной технологии культивирования глубинной биомассы *P. citrinopileatus* для внедрения в производство белковых продуктов должно предшествовать изучение характера роста продуцента, создание математической модели для прогнозирования роста и установления оптимальных условий культивирования, что и явилось целью настоящей работы.

Объектом исследования являлся штамм: РС-1.2 ксилотрофного базидиомицета *Pleurotus citrinopileatus* (*P. citrinopileatus*) – вешенка лимонная, чистая культура которого была выделена из коммерческих плодовых тел. Систематическое положение объекта исследования: царство *Fungi*; отдел *Basidiomycota*; класс *Agaricomycetes*; подкласс *Agaricomycetidae*; порядок *Agaricales*; семейство *Pleurotaceae*; род *Pleurotus*; вид *Pleurotus*.

Методы и принципы исследования

Глубинное культивирование проводили в стационарном лабораторном биореакторе «СеСа-Сх650, Великобритания» при температуре 26 °С, pH 5,0 и непрерывном перемешивании путем барботирования стерильным воздухом (расход воздуха 100 л/ч на 1 л среды). Среду предварительно стерилизовали в автоклаве в течение 30 минут при 0,5 кгс/см². В качестве питательной среды использовали гидролизат растительного сырья с массовой долей редуцирующих веществ не менее 3%.

Для определения прироста биомассы *P. citrinopileatus* каждые 12 часов отбирали пробу культуральной жидкости, объемом 10 мл. Затем пробу центрифугировали, биомассу (осадок) промывали дистиллированной водой, затем снова центрифугировали. Осадок высушивали и взвешивали.

Для построения математической модели эксперимента культивирования *P. citrinopileatus* рассчитывали: средние значения и стандартные ошибки опытов; дисперсию воспроизводимости; однородность дисперсий по критерию Кохрена; стандартную ошибку модели; коэффициент детерминации; адекватность модели по критерию Фишера и нормальное распределение ошибок по критерию Фроцини [10], [11].

Культивирование проводили при засевной концентрации мицелия – 1 г/л; начальной концентрации субстрата – 30 г/л. Время культивирования составило 120 ч; субстратная константа – 4; удельная скорость роста – 0,037 ч⁻¹.

Одновременно прирост биомассы *P. citrinopileatus* рассчитывали с помощью уравнения Моно [12]:

$$X = X_0 \cdot \exp \left[\frac{\mu_m \cdot S_0}{K_s + S_0} \right] \cdot t,$$

где:

X – предельное накопление биомассы, г/л;

X_0 – засевная концентрация мицелия, г/л;

μ_m – удельная скорость роста, ч⁻¹;

S_0 – начальная концентрация субстрата, г/л;

K_s – субстратная константа;

t – время культивирования, ч.

В таблице приведены экспериментальные и расчетные данные по накоплению биомассы в ходе глубинного культивирования, которые послужили исходными для построения графиков, характеризующих рост биомассы (рисунок 1).

Таблица 1 - Расчетные и экспериментальные данные по накоплению биомассы *P. citrinopileatus*

DOI: <https://doi.org/10.60797/JAE.2024.52.5.1>

t, ч	12	24	36	48	60	72	84	96	108	120
$X_{\text{расч.}}$, г/л а.с.м.	1,48	2,19	3,24	4,79	7,09	10,49	15,52	22,97	33,98	50,28
$X_{\text{экс.}}$, г/л а.с.м.	1,15	1,95	2,85	4,95	7,70	10,35	15,10	15,20	15,20	15,15

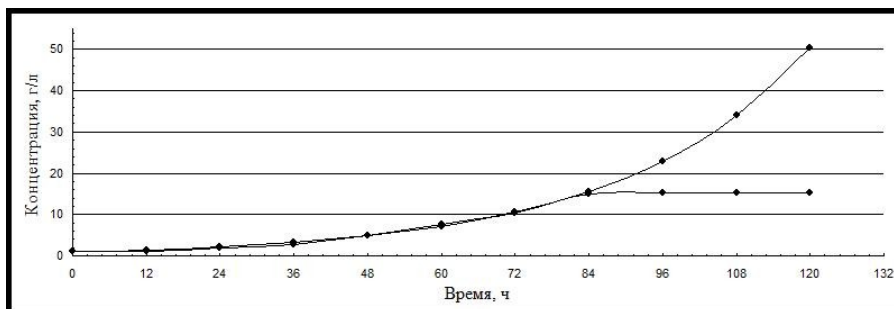


Рисунок 1 - Изменение расчетной и экспериментальной концентрации биомассы в ходе культивирования
DOI: <https://doi.org/10.60797/JAE.2024.52.5.2>

Примечание: 1 – расчетная концентрация биомассы 1 г/л; 2 – экспериментальная концентрация биомассы 1 г/л

Как видно из графика, максимальный прирост биомассы глубинной культуры *P. citrinopileatus* достигается через 3,5 суток (84 часа). Затем идет стационарная фаза, предшествующая фазе отмирания культуры. Очевидно, для эффективного использования культуры *P. citrinopileatus* в качестве продуцента белковой биомассы культивирование следует останавливать в точке наибольшей продуктивности по биомассе, т.е. в конце фазы экспоненциального роста.

В зависимости от используемого режима культивирования и конструкции биореактора на этой стадии выращивания культуры производится либо полный слив культуральной жидкости с сепарацией биомассы, либо частичный слив культуральной жидкости с доливом свежей питательной среды до рабочего объема биореактора.

Данные рисунка 1 свидетельствуют, что экспериментальная и расчетная кривые практически совпадают. Это дает основание утверждать, что уравнение Моно удовлетворительно описывает характер процесса роста глубинной культуры *P. citrinopileatus* и позволяет применить это уравнение для построения математической модели процесса роста:

$$f(t, \mu) := x_0 \cdot e^{\frac{\mu \cdot S_0}{K+S_0} \cdot t}$$

$$Cr(t, \mu, T_{max}) := \begin{cases} f(t, \mu) & \text{if } t \leq T_{max} \\ f(\mu, T_{max}) & \text{otherwise} \end{cases} \quad (1)$$

Для проверки адекватности и однородности математической модели была проведена обработка экспериментальных данных и рассчитаны: дисперсия воспроизводимости экспериментальных результатов измерения роста биомассы – 0,065 и стандартная ошибка воспроизводимости экспериментальных данных – 0,256.

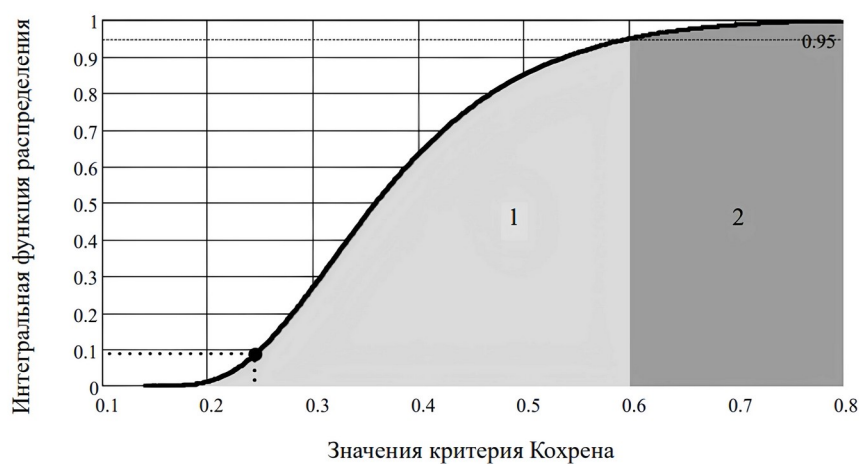
Основные результаты

В ходе проверки гипотезы однородности дисперсий экспериментов, при 5% уровне значимости были найдены: расчётное значение критерия Кохрена – 0,244 и критическое значение критерия Кохрена – 0,602 (см. рис. 2).

$$\text{Результат_проверки}(\varepsilon, C_{\phi}, Koh_{крим}) := \begin{cases} A \leftarrow \text{"гипотеза однородности дисперсий"} \\ B \leftarrow \text{"отклоняется"} \\ Koh_p \leftarrow Koh_p(\varepsilon, C_{\phi}) \\ Rez \leftarrow \text{concat}(A, \text{if}(Koh_p \leq Koh_{крим}, \text{"не"}, \text{" "}), B) \end{cases}$$

Рисунок 2 - Результат проверки гипотеза однородности дисперсий по критерию Кохрена
DOI: <https://doi.org/10.60797/JAE.2024.52.5.3>

Результат проверки = “гипотеза однородности дисперсий не отклоняется”.



... – расчетное значение критерия Кохрена.

— — статистика Кохрена.

Рисунок 3 - Интегральная функция распределения статистики Кохрена
DOI: <https://doi.org/10.60797/JAE.2024.52.5.4>

Примечание: 1 – область принятия гипотезы однородности; 2 – область отклонения гипотезы однородности

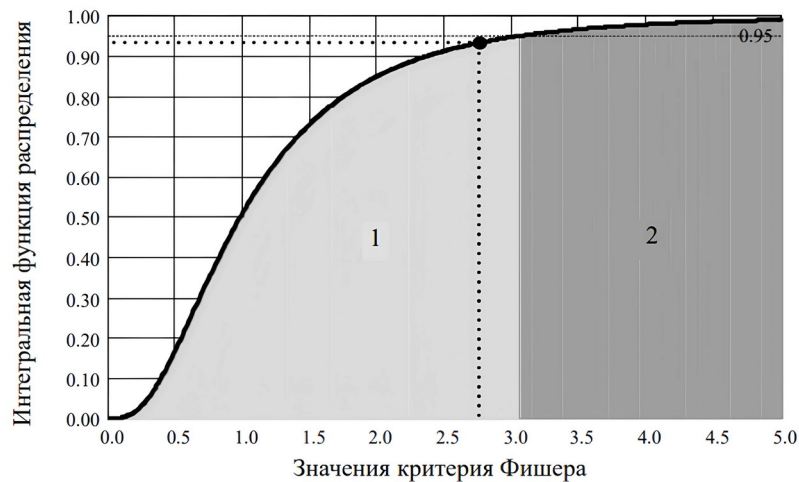
Результат проверки гипотезы адекватности модели по критерию Фишера:

A : = “гипотеза адекватности модели”

B : = “отклоняется”

Результат проверки: =concat(A,if(Fp≤Fк”не”, ” ”),B)

Результат проверки = «гипотеза адекватности модели не отклоняется».



... – расчетное значение критерия Фишера.

— – статистика Фишера.

Рисунок 4 - Интегральная функция распределения статистики Фишера
DOI: <https://doi.org/10.60797/JAE.2024.52.5.5>

Примечание: 1 – область принятия гипотезы адекватности; 2 – область отклонения гипотезы адекватности

Данные рисунка 4 свидетельствуют, что при заданном уровне значимости и расчетном значении критерия Фишера модель адекватна.

Следующим этапом настоящей работы было нахождение интегральной функции распределения ошибок (рисунок 5).

Из графического представления интегральной функции распределения ошибок эксперимента видно, что ошибки проведенного эксперимента находятся в области допустимых значений, что еще раз подтверждает адекватность использования разработанной математической модели (1) для описания процесса роста глубинной культуры *P. citrinopileatus*.

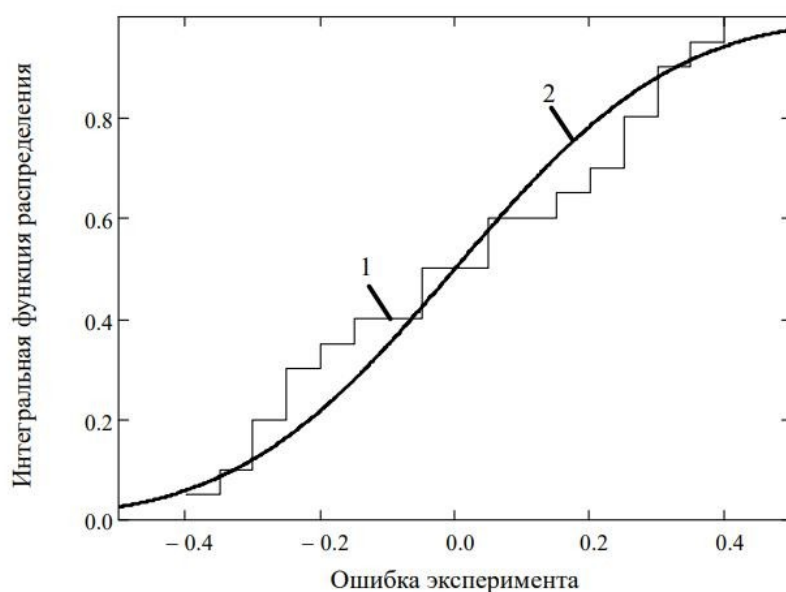


Рисунок 5 - Интегральная функция распределения ошибки эксперимента
DOI: <https://doi.org/10.60797/JAE.2024.52.5.6>

Примечание: 1 – эмпирическая; 2 – нормальная

Также провели проверку нормальности распределения ошибок по критерию Фроцини, при уровне значимости 5%. Критическое значение критерия Фроцини – 0,283; расчетное значение критерия Фроцини – 0,239.

Результат проверки нормальности распределения ошибок по критерию Фроцини:

Результат : = сопсат(“гипотеза нормальности”,if($F_p \leq F_{кр}$,”не”,””),”отклоняется”)

Результат =”гипотеза нормальности не отклоняется”

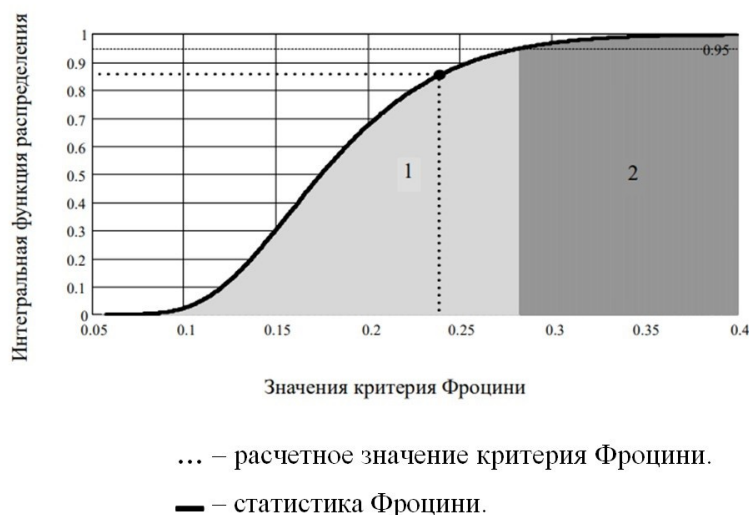


Рисунок 6 - Интегральная функция распределения ошибок эксперимента для прироста биомассы
 DOI: <https://doi.org/10.60797/JAE.2024.52.5.7>

Примечание: 1 – область принятия гипотезы нормальности; 2 – область отклонения гипотезы нормальности

Результаты, представленные на рисунке 6, свидетельствуют нормальному распределению ошибок эксперимента.

Для построения кривых роста культуры с различной засевной концентрацией (рисунок 7) используем уравнение Моно в интегральной форме [13].

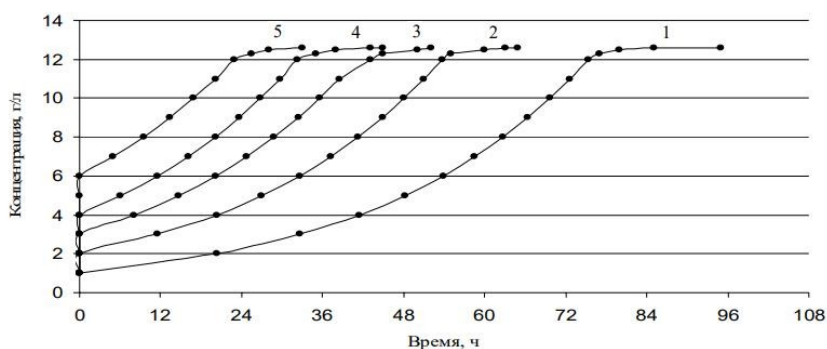


Рисунок 7 - Кривые роста с различной засевной концентрацией мицелия
 DOI: <https://doi.org/10.60797/JAE.2024.52.5.8>

Примечание: 1 – засевная концентрация 1 г/л; 2 – засевная концентрация 2 г/л; 3 – засевная концентрация 3 г/л; 4 – засевная концентрация 4 г/л; 5 – засевная концентрация 5 г/л

Как видно из рисунка 6, засевная концентрация мицелия 5 г/л позволяет за кратчайшее время достичь максимальной концентрации биомассы в биореакторе. Дальнейшее повышение засевной концентрации мицелия приводит к быстрому исчерпанию субстрата и ингибированию продуктами метаболизма.

На основании экспериментальных данных построена кривая роста глубинной культуры *Pleurotus citrinopileatus* при засевной концентрации 1 г/л. Показано, что кривую роста точно описывает уравнение Моно. Разработана математическая модель роста глубинной культуры. Проверена ее однородность и адекватность.

Заключение

Применение разработанной математической модели позволяет характеризовать поведение культуры в глубинных условиях, устанавливать оптимальную начальную концентрацию мицелия в биореакторе, прогнозировать время и скорость накопления максимального количества биомассы.

Конфликт интересов

Не указан.

Рецензия

Все статьи проходят рецензирование. Но рецензент или автор статьи предпочли не публиковать рецензию к этой статье в открытом доступе. Рецензия может быть предоставлена компетентным органам по запросу.

Conflict of Interest

None declared.

Review

All articles are peer-reviewed. But the reviewer or the author of the article chose not to publish a review of this article in the public domain. The review can be provided to the competent authorities upon request.

Список литературы / References

1. Chen J.N. A glycoprotein extract from golden oyster mushroom *Pleurotus citrinopileatus* exhibiting growth inhibitory effect against U937 leukemia cells / J.N. Chen, Y.T. Wang, J.S. Wu // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. — 2009. — Vol. 57. — № 15. — P. 6706–67011.
2. Rashita S. Effect of *Pleurotus citrinopileatus* on blood glucose, insulin and catalase of streptozotocin-induced type 2 diabetes mellitus rats / S. Rashita [et al.] // *The Journal of Animal & Plant Sciences*. — 2013. — Vol. 23. — № 6. — P. 1566–1571.
3. Zhang L. Antitumor polysaccharides from a Chinese mushroom, "Yuhuangmo," the fruiting body of *Pleurotus citrinopileatus* / L. Zhang, G. Wang, H. Li [et al.] // *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. — 1994. — Vol. 58. — № 7. — P. 1195–1201.
4. Musieba F. Proximate composition, amino acids and vitamins profile of *Pleurotus citrinopileatus* Singer: an indigenous mushroom in Kenya / F. Musieba, S. Okoth, R. Mibey [et al.] // *American Journal of Food Technology*. — 2013. — P. 1–7.
5. Кутафьева Н.П. Морфология грибов / Н.П. Кутафьева. — Новосибирск : Сибирский университет, 2003. — 215 с.
6. Ассонов Н.Р. Микробиология / Н.Р. Ассонов. — М. : Агропромиздат, 1989. — 351 с.
7. Мосичев В.М. Основы проектирования микробиологической промышленности / В.М. Мосичев. — М. : Агропром, 1990. — 304 с.
8. Яковлев В.И. Технология микробиологического синтеза / В.И. Яковлев. — Л. : Химия, 1987. — 272 с.
9. Беспалова Л.А. Особенности липидогенеза базидиомицетов при культивировании на различных средах / Л.А. Беспалова [и др.] // *Прикладная биохимия и микробиология*. — 2002. — Т. 38. — № 4. — С. 405–412.
10. Ахназарова С.Л. Методы оптимизации эксперимента в химической технологии / С.Л. Ахназарова, В.В. Кафаров. — М. : Высшая школа, 1985. — 323 с.
11. Ушанов С.В. Параметрическая идентификация моделей / С.В. Ушанов. — Красноярск : Литера-Принт, 2012. — 199 с.
12. Варфоломеев С.Д. Биотехнология. Кинетические основы микробиологических процессов / С.Д. Варфоломеев, С.В. Калужный. — М. : Высшая школа, 1990. — 296 с.
13. Безбородов А.М. Промышленная микробиология / А.М. Безбородов, И.Н. Блохина. — М. : Высшая школа, 1989. — 688 с.

Список литературы на английском языке / References in English

1. Chen J.N. A glycoprotein extract from golden oyster mushroom *Pleurotus citrinopileatus* exhibiting growth inhibitory effect against U937 leukemia cells / J.N. Chen, Y.T. Wang, J.S. Wu // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. — 2009. — Vol. 57. — № 15. — P. 6706–67011.
2. Rashita S. Effect of *Pleurotus citrinopileatus* on blood glucose, insulin and catalase of streptozotocin-induced type 2 diabetes mellitus rats / S. Rashita [et al.] // *The Journal of Animal & Plant Sciences*. — 2013. — Vol. 23. — № 6. — P. 1566–1571.
3. Zhang L. Antitumor polysaccharides from a Chinese mushroom, "Yuhuangmo," the fruiting body of *Pleurotus citrinopileatus* / L. Zhang, G. Wang, H. Li [et al.] // *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. — 1994. — Vol. 58. — № 7. — P. 1195–1201.
4. Musieba F. Proximate composition, amino acids and vitamins profile of *Pleurotus citrinopileatus* Singer: an indigenous mushroom in Kenya / F. Musieba, S. Okoth, R. Mibey [et al.] // *American Journal of Food Technology*. — 2013. — P. 1–7.
5. Kutafyeva N.P. Morfologija gribov [Morphology of Fungi] / N.P. Kutafyeva. — Novosibirsk : Siberian University, 2003. — 215 p. [in Russian].
6. Assonov N.R. Mikrobiologija [Microbiology] / N.R. Assonov. — Moscow : Agropromizdat, 1989. — 351 p. [in Russian].
7. Mosichev V.M. Osnovy proektirovaniya mikrobiologicheskoy promyshlennosti [Basics of Microbiological Industry Design] / V.M. Mosichev. — Moscow : Agroprom, 1990. — 304 p. [in Russian].

8. Yakovlev V.I. Tehnologija mikrobiologičeskogo sinteza [Technology of Microbiological Synthesis] / V.I. Yakovlev. — Leningrad : Khimiya, 1987. — 272 p. [in Russian].
9. Bespalova L.A. Osobnosti lipidogeneza bazidiomicetov pri kul'tivirovanii na razlichnyh sredah [Specific Features of Lipidogenesis in Basidiomycetes during Cultivation on Different Media] / L.A. Bespalova [et al.] // Prikladnaja biohimija i mikrobiologija [Applied Biochemistry and Microbiology]. — 2002. — Vol. 38. — № 4. — P. 405–412. [in Russian].
10. Ahnazarova S.L. Metody optimizacii jeksperimenta v himičeskoj tehnologii [Methods for Experiment Optimization in Chemical Technology] / S.L. Ahnazarova, V.V. Kafarov. — Moscow : Higher School, 1985. — 323 p. [in Russian].
11. Ushanov S.V. Parametricheskaja identifikacija modelej [Parametric Identification of Models] / S.V. Ushanov. — Krasnoyarsk : Litera-Print, 2012. — 199 p. [in Russian].
12. Varfolomeev S.D. Biotehnologija. Kinetičeskie osnovy mikrobiologičeskikh processov [Biotechnology: Kinetic Fundamentals of Microbiological Processes] / S.D. Varfolomeev, S.V. Kalyuzhny. — Moscow : Higher School, 1990. — 296 p. [in Russian].
13. Bezborodov A.M. Promyshlennaja mikrobiologija [Industrial Microbiology] / A.M. Bezborodov, I.N. Blokhoyna. — Moscow : Higher School, 1989. — 688 p. [in Russian].