

КУЛЬТИВУВАННЯ *PLEUROTUS OSTREATUS* ЗА ДІЇ LED – ЛАЗЕРІВ

Н. Ф. Сенюк, Д. Р. Левицька, К. С. Решетник

Анотація. Все більш актуальною стає розробка нових інтенсивних біотехнологій одержання макроміцетів. Такі розробки потребують вивчення 5 факторів, що впливають на функції організму гриба, це дозволить ефективно використовувати їх природний потенціал, а також дасть змогу отримувати якісну продукцію в достатній кількості. Світло є одним з факторів регуляції для більшості грибів. Розробка сучасних методів фотоіндукції біосинтетичної активності на основі освітлювальних джерел нового покоління, а саме енергозберігаючих світлодіодних лазерних систем дозволить збільшити вихід біомаси при культивуванні та харчову цінність плодових тіл.

Ключові слова: макроміцети, лазерні системи, біомаса, харчова цінність.

Глива звичайна або плеврот звичайний (*Pleurotus ostreatus*) – це сапрофітний гриб, що належить до класу базидієвих грибів. Може розкласти деревину та інші види рослинних відходів (солому, качани кукурудзи і т.д.). У виробництві поширені такі види, як *Pleurotus ostreatus*, *P. pulmonarius*, *P. florida*, *P. columbinus*, *P. cornucopiae*, *P. eryngii*, *P. sajorcaju* [1].

Дослідження механізмів фотореакцій різних грибів є важливим завданням з фундаментальної та з практичної точки зору. Важливі дані про вплив світла на розвиток грибів отримані порівняно недавно, зокрема, при виявленні генів, відповідальних за реакцію грибів на світло. Так, в 2006 році Л. М. Корочано і П. Галанд повідомили про особливості регулювання світлом розвитку і поведінки грибів [1]. Було з'ясовано, що найбільш ефективним, з точки зору впливу на фотоморфогенез грибів, являється синє світло, яке також може активувати метаболізм або прямо впливати на зростання грибних структур. У грибах описані декілька видів фоторецепторів [2, 3, 4, 5]. Гени, відповідальні за фоторецептори синього світла, знайдені у базидіоміцетів *Coprinus scinereus* і *Lentinus edodes*. Є думка відносно гіпотези про те, що WC – комплекси виникли на ранніх стадіях еволюції грибів, як фоторецептори і чинники транскрипцій, для регулювання їх фотореакції. Окрім цього, дослідження геномів грибів дозволило ідентифікувати гени фоторецепторів. Деякі з них досить несподівані, на зразок чутливих до червоного світла фітохромів, на додаток до тих, що поглинають синє світло криптохромах і родопсину [6, 7]. Деякі дослідники відзначають антистресову дію когерентного випромінювання, яке зв'язували зі збільшенням активності дихальних ферментів (супероксидредуктази, пероксидази, каталази та ін.). Вперше дослідження можливості використання когерентного світла для біорегуляції грибів, початі колективами Інституту ботаніки ім. Н. Г. Холодного і Інституту фізики НАН України, також доводять перспективність використання штучного світла (когерентного і некогерентного) у біотехнології культивування їстівних та лікарських грибів [10]. Вплив лазерного опромінення носить позитивний характер, так як не шкодить навколишньому середовищу. Лазерна фото активація являє собою не шкідливу обробку для міцелію. Метою нашої роботи було покращення синтезу білка *P. ostreatus* за допомогою LED-лазерів.

Для дослідження був використаний штам Р-191 гриба *Pleurotus ostreatus* із колекції культур шапинкових грибів кафедри ботаніки та екології Донецького національного університету імені Василя Стуса. З метою покращення синтезу білка та збільшення кількості біомаси міцелій досліджуваного штаму опромінювали за допомогою світлодіодних лазерів: з випромінюванням червоного спектру з довжиною хвилі 635 нм, випромінюванням синього спектру з довжиною хвилі 405 нм та з випромінюванням зеленого спектру з довжиною хвилі 532 нм, протягом 10 сек. У дослідженнях використані наступні варіанти опромінення: 1) контроль – без опромінення; 2) одноразове опромінення червоним лазером протягом 10 сек; 3) одноразове опромінення синім лазером протягом 10 сек; 4) одноразове опромінення зеленим лазером протягом 10 сек. Щільність енергії лазерного опромінення розраховували за формулами [11]. Енергетична доза опромінення у всіх варіантах досліду становила 51,1 мДж/см². Це значення вибрано на основі результатів

попередніх досліджень [12] та згідно з результатами даних літератури [13]. Для інокуляції контрольних зразків використовували неопромінену культуру. Штам, що досліджувався, висівали в колби з рідким живильним середовищем, малим шматочком інокулюму, розміром близько 5 мм завжди однієї щільності і віку. Міцелій гриба культивували поверхнево в колбах Ерленмеєра на стандартному глюкозо–пептонному живильному середовищі (ГПС, рН 6,5±0,2), об'ємом 50 мл, попередньо опромінивши зразки лазерами перед інокуляцією. Температура культивування становила 27,5°C. Матеріалами для дослідів були гомогенізований міцелій (МГ). Для цього міцелій за 5°C відділяли від культуральної рідини шляхом фільтрування. Міцелій додатково підсушували на фільтрувальному папері. Підготовлений міцелій в кількості 1 г гомогенізували в ступці з додаванням 10 мл дистильованої води або розчину NaCl та відцентровували в центрифугі при 2500 об/хв. З метою визначення кількості білка використовували метод біуретової реакції. Метод ґрунтується на властивості білків у лужному середовищі давати з біуретовим реактивом синьо-фіолетове забарвлення. Поява його зумовлена наявністю у молекулі білка пептидних зв'язків, що утворюють за даних умов мідно – натрієві солеподібні комплекси. Інтенсивність 15 забарвлення залежить від кількості цих зв'язків, а отже і від кількості білка в розчині, а також від кількості біуретового реактиву. Тому при додаванні визначеної кількості реактиву, ступінь забарвленості буде прямо пропорційна концентрації білка у розчині. Інтенсивність забарвлення реакційного розчину прямо пропорційна концентрації білків [15]. У першу пробірку вносили 0,1 мл дистильованої води (контроль), у другу – 0,1 мл стандартного розчину білка (50 г/л), у третю, четверту і п'яту пробірки – по 0,1 мл досліджувано горозчину білка. У кожную пробірку додають по 5 мл біуретового реактиву, перемішували, витримували 30 хв при кімнатній температурі. Виміряли оптичну щільність калібрувальної або дослідної проби проти холостої проби, при довжині хвилі (540–560 нм) в діапазоні 0–1.0 од. опт. щільності та довжині оптичного шляху 5 мм або 10 мм. Аналіз проводили згідно зі схемою (табл.1). Кількість біомаси міцелію визначали ваговим методом [14].

Таблиця 1

Відміряти у пробірку, мл	Калібрувальна чи дослідна проба			Холоста проба		
	Макро	Напів-мікро	Мікро	Макро	Напів-мікро	Мікро
Калібрувальний чи дослідний розчин	0,08	0,04	0,02	–	–	–
Фізіологічний розчин	–	–	–	0,08	0,04	0,02
Біуретовий реактив	4,00	2,00	1,00	4,00	2,00	1,00

Розрахунок концентрації загального білку проводять за формулою (1): $C = E_{\text{дос}} E_{\text{кал}} \times 50$, де: C – концентрація загального білку в дослідній пробі, г/л; 50–концентрація загального білку в калібрувальному розчині, г/л $E_{\text{дос}}$ –оптична щільність дослідної проби, од. опт. щільності; $E_{\text{кал}}$ –оптична щільність калібрувальної проби, од. опт. щільності Кількість біомаси міцелію визначали ваговим методом [14].

Усі досліди проводили у трикратній повторюваності. Для визначення вірогідності впливу лазерного опромінення застосовували метод дисперсійного аналізу. Порівняння середніх значень вели за методом Дункана [16]. Обробку проводили за допомогою пакета статистичних програм, створених на кафедрі фізіології рослин Донецького національного університету імені Василя Стуса [17].

Під час дослідження було встановлено, що опромінення світлодіодним лазером синього спектру з довжиною хвилі 405 нм чинило позитивний вплив як на синтез білка, так і на збільшення біомаси міцелію. Так, максимальну кількість білка було зафіксовано в результаті опромінення синім лазером – $26,81 \pm 0,15$ г/л, що на 74,19 % більше, порівняно з контролем. Опромінення когерентними монохроматичними променями червоного світла збільшило кількість білка у 1,3 рази порівняно з контролем. Дещо меншою була кількість білка у міцелії після опромінення променем світлодіодного зеленого лазера, але збільшення його концентрації також перевищувало контрольний варіант дослід у 1,2 рази. Найбільший

приріст біомаси також було виявлено в результаті опромінення синім лазером – $14,46 \pm 0,54$ г, що на 18,14 % більше контрольного варіанту. Приріст біомаси внаслідок опромінення променем червоного спектру збільшився на 16,42 %.

Висновки. В результаті проведених досліджень було встановлено, що опромінення лазерами червоного, синього та зеленого спектру світла протягом 10 сек сприяє зростанню кількості білка та біомаси досліджуваного штаму *P. ostreatus*. Зокрема, найбільшу кількість білка та біомаси зафіксовано в результаті опромінення синім лазером. Опромінення іншими спектрами світла мало позитивний вплив на досліджувані параметри, проте незначний.

Аннотація. Все более актуальной становится разработка новых интенсивных биотехнологий получения макромицетов. Такие разработки требуют изучения 5 факторов, влияющих на функции организма гриба, это позволит эффективно использовать их природный потенциал, а также позволит получать качественную продукцию в достаточном количестве. Свет является одним из факторов регуляции для большинства грибов. Разработка современных методов фотоиндукции биосинтетической активности на основе осветительных источников нового поколения, а именно энергосберегающих светодиодных лазерных систем позволит увеличить выход биомассы при культивировании и пищевую ценность плодовых тел.

Ключевые слова: макромицеты, лазерные системы, биомасса, пищевая ценность.

Abstract. The development of new intensive biotechnologies for macromycetes production is becoming increasingly relevant. Such developments require the study of 5 factors that affect the functions of the organism of the fungus, which will allow the effective use of their natural potential, as well as allow to obtain quality products in sufficient quantities. Light is one of the regulatory factors for most mushrooms. Development of modern methods of photo-induction of biosynthetic activity on the basis of new generation light sources, namely energy-saving LED laser systems will allow to increase biomass yield during cultivation and nutritional value of fruiting bodies.

Keywords: macromycetes, laser systems, biomass, nutritional value.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Corrochano L. M., Galland P. Photomorphogenesis and gravitropism in fungi. [eds. U. Kues, R. Fisher]. *The Mycota. Growth, Differentiation and Sexuality*, V. I. Berlin: Springer-Verlag, 2006. P.233–259.
2. Corrochano L. M. Fungal photoreceptors sensory molecules for fungal development and behaviour. *Photochemical Photobiological Sci.* 2007. V. 6, N 7. P. 725–736.
3. Corrochano L.M. Fungalphotobiology: a synopsis. *IMA Fungus.* 2011. V. 2, № 1. P. 25–28.
4. Herrera-Estrella A., Horwitz B. A. Looking through the eyes of fungi: molecular genetics of photoreception. *Mol. Microbiol.* 2007. V. 64, N 1. P. 5–15.
5. Tisch D., Schmoll M. Light regulation of metabolic pathways in fungi. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2010. V. 85, N 5. P.1259–1277.
6. Galagan G. V., Calvo S. E. [et al.] The genome sequence of the filamentous fungus *Neurospora crassa*. *Nature.* 2003. V. 422. P. 859–868.
7. Kamada T., Sano H., Nakazawa T., Nakahori K. Regulation of fruiting body photomorphogenesis in *Coprinopsis cinerea*. *Fungal Genet. Biol.* 2010. V. 47, N 11. P. 917–921.
8. Иванов Б. В. Влияние лазерного облучения на семена гороха / Б. В. Иванов, А. В. Миляев, В. А. Миляев [и др.] // *Аграрная наука*. – 2001. – № 5. – С. 28–29.
9. Поєдинок Н. Л., Бисько Н. А., Трухоновець В., Михайлова О. Б. Лазери в сучасній біотехнології. *Мікробіологічна біотехнологія – наукоємке напрямлення сучасних знань: міжн. науч. конф.*, 6–8 июля, 2011 г.: матеріали. Кишинев, Молдова, 2011. С. 202–203.
10. Биологические особенности лекарственных макромицетов в культуре. Т. 2 / под ред. С. П. Вассера. К.: Альтепрес, 2011. 212 с
11. Вакарчук І. О. Квантова механіка : підручник / 4-те вид., доп. Львів : ЛНУ імені Івана Франка, 2012. 872 с.
12. Reshetnyk K. Investigation the effect of laser irradiation on the growth characteristics of *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm. *2ND International Conference «Smart Bio»* (3–5 May 2018, Kaunas, Lithuania)–2018. P. 344.
13. Поєдинок Н. Л., Негрійко А. М., Бисько Н. А., Михайлова О. Б., Ходаковський В. М., Потьомкіна Ж. В. Енергоєфективні системи штучного освітлення у технологіях вирощування їстівних та лікарських грибів. *Наука та інновації*. 2013. Т.9, № 3. С. 46–59.
14. Mattila P., Kõnkö K., Eurola M. [et al.] Contents of vitamins, mineral elements, and some phenolic compounds in cultivated mushrooms. *J. Agric. Food Chem.* 2001. V. 49, N 5. P. 2343–2348.
15. Покровский А. А. Метаболические аспекты фармакологии и токсикологии пищи. М: Медицина, 1979. 184с.
16. Приседський Ю. Г. Пакет програм для проведення статистичної обробки результатів біологічних експериментів. Донецьк : ДонНУ, 2005. 84 с.
17. Приседський Ю. Г. Статистична обробка результатів біологічних експериментів. Донецьк : Кассиопея, 1999. 210 с.