НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ДЕРЖАВНА УСТАНОВА
«ІНСТИТУТ ХАРЧОВОЇ БІОТЕХНОЛОГІЇ ТА ГЕНОМІКИ НАН УКРАЇНИ»

ПОЄДИНОК НАТАЛІЯ ЛЕОНІДІВНА

УДК 602.3:582.282/284:57.086.83]:[681.7.069.24+577.344

БІОТЕХНОЛОГІЧНІ ОСНОВИ ІНТЕНСИФІКАЦІЇ КУЛЬТИВУВАННЯ ЇСТІВНИХ І ЛІКАРСЬКИХ МАКРОМІЦЕТІВ ЗА ДОПОМОГОЮ СВІТЛА НИЗЬКОЇ ІНТЕНСИВНОСТІ

03.00.20 – біотехнологія

АВТОРЕФЕРАТ

дисертації на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук

Київ – 2015

Дисертацією є рукопис

Робота виконана в Інституті ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України та ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України»

Науковий консультант: доктор біологічних наук, професор, член-кореспондент НАН України **Дудка Ірина Олександрівна**, Інститут ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України, завідувач відділу мікології

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук, старший науковий співробітник **Циганкова Вікторія Анатоліївна**, Інститут біоорганічної хімії та нафтохімії НАН України, провідний науковий співробітник відділу хімії біоактивних азотовмісних гетероциклічних основ

доктор біологічних наук, професор **Дуган Олексій Мартем`янович,** Національний технічний університет України «Київський політехнічний інститут» МОН України, декан факультету біотехнології і біотехніки

доктор сільськогосподарських наук, професор **Теслюк Віктор Васильович**, Національний університет біоресурсів і природокористування України Міністерства освіти і науки України, завідувач кафедри сільськогосподарських машин та системотехніки ім. акад. П.М. Василенка

Захист дисертації відбудеться «27» жовтня 2015 р. о 11 год. на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.254.01 при ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України» за адресою: 04123, вул. Осиповського, 2А, факс: (044) 434-37-77

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України» за адресою: 04123, вул. Осиповського, 2А.

Автореферат розісланий «25» вересня 2015 р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради, к.б.н. Г.Я. Баєр

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Макроміцети (гриби з великими, добре помітними неозброєним оком плодовими тілами) є джерелом активних компонентів, які містяться в аскомах і базидіомах, міцелії при глибинному культивуванні та в культуральній рідині. В наш час їх використовують як продукти дієтичного харчування, харчові добавки, препарати, які називають «грибними лікарськими препаратами», біопрепарати для захисту рослин з інсектицидною, фунгіцидною, бактеріцидною, гербіцидною і антивірусною активністю та космецевтики [Wasser, 2010, 2014; Chang et al., 2012; Hyde, 2013]. Розробка нових інтенсивних біотехнологій одержання як біологічно активних сполук макроміцетів, так і плодових тіл з кожним роком стає все більш актуальною. Такі розробки потребують глибокого вивчення факторів, які регулюють функції організму гриба, що дозволить максимально ефективно використовувати їх природний потенціал і забезпечить одержання якісної продукції в необхідній кількості. Одним з таких факторів регуляції є світло, яке є для більшості грибів важливим морфогенетичним фактором, незважаючи на те, що вони не належать до фототрофних організмів. На сьогодні розроблена ціла низка біотехнологічних процесів з використанням фотоінтенсифікації та фоторегуляції розвитку рослин. Проте, не дивлячись на значний прогрес у вивченні фоторецепції та фотоморфогенезу грибів та накопичений фактичний матеріал [Corrochano, Galland, 2006; Corrochano, 2007, 2011; Herrera-Estrella, 2007; Tisch, Schmoll, 2010; Крицкий и др., 2005, 2010; Kritskiy et al., 2010], низькоінтенсивне світлове випромінювання при розробці біотехнологічних процесів одержання грибної біомаси й цінних метаболітів практично не застосовується.

Це пов'язано з відсутністю інформації з ряду таких питань, як: 1) чутливість макроміцетів з різних таксономічних груп на різних стадіях онтогенезу до світла з різними спектральними і енергетичними характеристиками; 2) специфіку біологічної дії когерентного лазерного випромінювання при стимуляції ростової та синтетичної активності макроміцетів та залежності стимулюючого ефекту від часових характеристик світлового імпульсу; 3) тривалість й пролонгованість фотоіндукційних змін; 4) фактори, що впливають на практичну реалізацію методів фотоінтенсифікації та фоторегуляції розвитку грибів. Дослідження в цьому напрямку та практичне використання одержаних результатів є важливим та перспективним завданням для успішного розвитку сучасних мікобіотехнологій.

Актуальною залишається проблема пророщування спор при генетичних дослідженнях грибів, їх селекції та інтродукції в природні місця існування для збереження біорізноманіття. Нова інформація про фоточутливість спор макроміцетів і розробка ефективних методів фотоіндукції їх проростання відкриє широкі перспективи для створення та впровадження нових методів підвищення ефективності пророщування спор для відновлення цінних і зникаючих видів, створення високопродуктивних штамів.

Нові знання про фоточутливість макроміцетів, безсумнівно, матимуть цінність для розуміння фундаментальних механізмів, що лежать в основі їх фоторецепції і

фотоіндукції, процесів змін стійкості і чутливості до світла грибів з різних екологічних ніш. Це стане фундаментом для наукового обґрунтування прогнозу та інтенсифікації біотехнологічних процесів одержання цільових продуктів за допомогою впливу світла низької інтенсивності. З огляду на сказане, актуальним напрямком біотехнології макроміцетів є розробка сучасних методів цілеспрямованої фотоіндукції ростової й біосинтетичної активності, впровадження яких дозволить скоротити строки культивування, зменшити кількість посівного матеріалу при інокуляції субстратів, збільшити вихід біомаси та біологічно активних компонентів при глибинному культивуванні, підвищити врожайність плодових тіл і їх якість при твердофазному вирощуванні.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, тематиками. Робота виконувалась протягом 1998-2013 рр. згідно планів комплексних тем науково-дослідницької роботи відділу мікології Інституту ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України, зокрема, за темами «Біологічні властивості лікарських макроміцетів та шляхи біотехнологічного використання окремих видів в Україні» (№ д/р 0100U000062), «Фізіолого-морфологічна характеристика лікарських макроміцетів та їх біосинтетична активність у культурі» (№ д/р 0104U009743), «Біологічні властивості сапротрофних макроміцетів в культурі» (№ д/р 0110U001264) та в ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України» з 2013 по 2015 р. у рамках наукових тем «Вивчення молекулярно-генетичних і клітинних механізмів стійкості рослин до абіотичних факторів для покращення їх адаптаційних якостей до несприятливих умов навколишнього середовища» (№ д/р 0112U001597) и «Вивчення антибактеріальної активності макроміцетів» (№ д/р 0115U002083).

Фінансування роботи підтримано грантами «ДФФД-БРФФД-2005» «Фактори регуляції біосинтетичної активності лікарських грибів» (№ д/р 0105U006780), «ДФФД-БРФФД-2007» «*Cordyceps militaris* – новий об'єкт сучасної біотехнології: фізіологічно активні сполуки, механізми регуляції, біологічна дія» (№ д/р 0105U00678), «ДФФД-БРФФД-2009» «Біологічні особливості макроміцетів різних екологічних груп в чистій культурі» (№ д/р 0109U007524), «ДФФД-РФФД-2009» «Біологічні основи інтродукції макроміцетів в культуру» (№ д/р 0109U007523), грантом НАН України на виконання інноваційного проекту «Розробка та підготовка до впровадження інтенсивної технології вирощування їстівних та лікарських грибів на основі енергоефективних систем штучного освітлення» (№ д/р 0111U003274) (2011 р.), грантом на виконання спільного українсько-білоруського науково-технічного проекту «Розробка біотехнологій інтенсифікації культивування цінних видів їстівних та лікарських грибів у промислових умовах Білорусі та України» (№ д/р 0112U006116) (2011-2013 р.).

Мета й завдання дослідження. Метою роботи була розробка наукових основ використання світла низької інтенсивності для підвищення ефективності процесів біотехнологічного культивування лікарських та їстівних макроміцетів.

Для досягнення поставленої мети необхідно було вирішити наступні завдання:

- визначити енергоефективні джерела штучного світла з контрольованими спектральними і енергетичними характеристиками та режими активації;
- розробити методичні підходи до фотоактивації посівного матеріалу з подальшим вивченням фоточутливості макроміцетів на різних стадіях онтогенезу;
- вивчити динаміку фотоіндукційної активності спор і вегетативного міцелію на різних етапах культивування, при пересівах та встановити тривалість збереження фотоіндукційних змін;
- виявити фактори, що впливають на реалізацію фотостимулюючого ефекту в процесі культивування;
- розробити методичні підходи фотоінтенсифікації технологічних етапів глибинного культивування макроміцетів і цілеспрямованої регуляції їхньої біосинтетичної активності;
- розробити методичні підходи фотоінтенсифікації технологічних етапів твердофазного культивування макроміцетів;
- розробити практичні рекомендації щодо використання світла низької інтенсивності для модифікації біотехнологічних аспектів культивування їстівних і лікарських макроміцетів.

Об’єкт дослідження: біотехнологічні процеси культивування їстівних і лікарських макроміцетів *Agaricus bisporus, Flammulina velutipes, Hericium erinaceus, Inonotus obliqus, Ganoderma lucidum, Ganoderma aplanatum, Lentinus edodes*, *Pleurotus ostreatus, Cordyceps militaris, Cordyceps conica, Morchella esculenta* і *Morchella conica* з використанням високоефективних джерел штучного світла.

Предмет дослідження: особливості стимулюючої дії низькоінтенсивного світлового випромінювання на ростову й біосинтетичну активність макроміцетів на різних стадіях онтогенезу із перспективою використання в біотехнологіях глибинного й твердофазного культивування.

Методи дослідження: фотобіологічні (підбір енергоефективних джерел штучного світла з контрольованими спектральними і енергетичними характеристиками), мікробіологічні і мікологічні (культивування макроміцетів і дослідження їхніх властивостей), біохімічні (вивчення метаболічних змін), біотехнологічні.

Наукова новизна одержаних результатів. Розроблено наукові засади використання низькоінтенсивного світла в біотехнологіях вирощування їстівних і лікарських грибів. Вперше запропоновані високоефективні методи цілеспрямованої регуляції біосинтетичної активності макроміцетів і інтенсифікації технологічних етапів їхнього вирощування за допомогою світла низької інтенсивності різної когерентності та спектрального складу, що дозволяють індукувати проростання спор, скоротити терміни культивування, зменшити кількість посівного матеріалу при інокуляції субстратів, збільшити вихід біомаси та біологічно активних компонентів при глибинному культивуванні, а також збільшити урожайність плодових тіл та їх якість при твердофазному вирощуванні.

На основі отриманих даних запропонована і експериментально доведена гіпотеза про те, що пусковий механізм індукованих низькоінтенсивним світлом

біологічних реакцій, описаний для інших біологічних об'єктів різного рівня організації, притаманний і макроміцетам. Експериментально доведено, що короткочасне (від декілька секунд до десятків хвилин) низькоінтенсивне випромінювання в малих дозах (45-230 мДж/см^2) викликає стимулюючий ефект, який зберігається тривалий час. Вперше виявлено, що основні зміни, викликані короткочасним опроміненням світлом низької інтенсивності у макроміцетів на різних стадіях онтогенезу, мають пролонговану дію та не потребують подальшої активізації світлом. Це дозволило вперше розробити екологічно чисті та енергоекономічні методи інтенсифікації технологічних етапів культивування макроміцетів шляхом активації їх посівного матеріалу короткочасним світловим впливом.

Вперше встановлена тривалість збереження фотоіндукованої активності посівного міцелію та її динаміка при поступових пересівах і зберіганні. Виявлено, що реалізація фотостимулюючого ефекту залежить від способу культивування макроміцетів, концентрації джерел азоту й вуглецю у живильних середовищах. Встановлено, що короткочасне опромінювання світлом низької інтенсивності викликає зміни трофіки макроміцетів, при цьому зростає ефективність використання джерела вуглецю, що в свою чергу підвищує їх фотоіндукційну ростову активність при культивуванні на середовищах із більш низькими концентраціями глюкози при глибинному культивуванні.

Вперше для *I. obliquus* розроблено й апробовано поживне середовище зі зниженим вмістом азоту для підвищення фотоіндукційного стимулюючого ефекту при одержанні меланіну, каталази, позаклітинної тирозинази та поліфенолоксидази, а також внутрішньоклітинної пероксидази. Виявлено достовірно значні зміни рівня активності ферментів *I. obliquus* після дії червоного та синього низькоінтенсивного лазерного випромінювання (НІЛВ), зокрема тих, які каталізують синтез меланіну (поліфенолоксидази і тирозинази).

Вперше після опромінювання світлом низької інтенсивності в жирнокислотному профілі макроміцетів виявлені зміни, що полягають у зменшенні кількості ненасичених жирних кислот.

Визначена специфіка реакцій макроміцетів відділів *Ascomycota* та *Basidiomycota* на опромінення безперервним та імпульсним світлом різної когерентності та довжини хвиль. При порівняльному аналізі змін вуглецевого складу полісахаридів у макроміцетах, які відносяться до базидіоміцетів та аскоміцетів, вперше виявлено різні тенденції в їх динаміці під дією короткочасних світлових впливів, що дозволило припустити наявність значних відмін у їхніх фоторецепторних системах.

Вперше для макроміцетів встановлена достовірна перевага використання низькоінтенсивного лазерного випромінювання замість некогерентного світла низької інтенсивності та імпульсного світла різної когерентності порівняно із безперервним для стимуляції росту, антимікробної та ферментативної активності, синтезу меланіну й полісахаридів, яка виражається в додатковому збільшенні ростових показників і виходу біологічно активних речовин (10-150%).

Розроблені високоефективні екологічно чисті способи цілеспрямованої регуляції біосинтетичної активності макроміцетів та інтенсифікації технологічних етапів їхнього культивування за допомогою світла низької інтенсивності.

Вперше експериментально доведено, що світло низької інтенсивності може виступати як стимулятор біологічної активності не тільки для грибів, які потребують освітлення на етапі формування плодових тіл, але і для виду *Agaricus bisporus* всі етапи плодоутворення якого проходять за відсутності світла.

Одержані нові, науково обґрунтовані теоретичні та експериментальні результати дослідження фоточутливості макроміцетів до світла низької інтенсивності з різними спектральними і енергетичними характеристиками, які у сукупності доповнюють і розширюють наші уявлення про фундаментальні процеси фоторецепції макроміцетів.

Практичне значення одержаних результатів. Одержано дані, які у сукупності визначили характер фотоіндукційних змін у їстівних і лікарських макроміцетах, що промислово культивуються, під дією світла низької інтенсивності з різними спектральними і енергетичними характеристиками, що є основою способів активації посівного матеріалу і використання його для інтенсифікації технологічних етапів глибинного і твердофазного культивування.

Розроблено методичні підходи стимуляції ростової та біосинтетичної активності шляхом модифікації існуючих біотехнологій одержання біомаси, біологічно активних сполук і плодових тіл макроміцетів, що дозволяє суттєво скоротити терміни культивування й значно (на 10-250%) збільшити вихід цільового продукту і які захищені 9 патентами.

Одержано патент України на спосіб активації проростання спор [Деклараційний патент № 36013 16.04.2001, Бюл. № 3]. Запропонований спосіб активації проростання спор може використовуватися в біотехнології, при експериментальних дослідженнях в галузі генетики та фізіології грибів, при відновленні в культурі різних видів макроміцетів, збереженні їх у спеціальних колекціях і інтродукції у природні місця існування.

Способи активації й обробки посівного міцелію, стимуляції росту, розвитку, плодоношення та антимікробної активності макроміцетів можуть бути використані в біотехнологіях поверхневого та глибинного культивування для інтенсифікації технологічних етапів [Патент на винахід № 76305 17.06.2006, бюл. № 7; Деклараційні патенти на винахід № 53900 17.02.2003, бюл. № 2; № 53867 17.02.2003, бюл. № 2; № 53880 17.02.2003, бюл. № 2; Патенти на корисну модель № 16930 15.09.2006, бюл. № 9 и № 26074 17.09.2007, № 14].

Спосіб одержання біомаси і білка харчового призначення *Morchella conica* [Патент України на винахід № 102450 10.07.2013, Бюл. №13], який базується на фотостимуляції, може бути використаний у біотехнологіях виробництва харчових добавок.

Одержано патент на спосіб підвищення синтезу меланіну у *I. obliquus* [Патент України на винахід № 82960 26.05.2008, Бюл. №10]. Запропонований спосіб передбачає створення відповідних умов опромінювання при рості гриба –

продуцента меланінових пігментів, які одночасно сприяють зростанню синтезу меланінових пігментів і зростанню виходу біомаси.

Матеріали дисертаційної роботи, які стосуються фоточутливості макроміцетів та їхніх реакцій на світловий вплив з різними характеристиками, можуть бути використані для підготовки фахівців у галузі, біотехнології, мікології та фотобіології.

Особистий внесок здобувача. Дисертація є самостійною працею автора. На основі проведеного дисертантом інформаційного пошуку та аналізу літератури розроблена концепція та робочі гіпотези за темою дисертації, обґрунтована й розроблена методологія й програма постановки досліджень, виконана експериментальна частина досліджень, проведено аналіз і узагальнення одержаних результатів, складені таблиці, оформлені рисунки, сформульовані висновки та положення в дисертації, підготовлені до друку наукові статті. Усі опубліковані результати отримані за особистої участі автора в постановці завдань, розробці методик й методів експериментальних досліджень, підготовці й проведенні експериментів, вимірювань, обробці їхніх результатів, формулюванні висновків.

Колекція шапинкових грибів Інституту ботаніки НАН України, яка була створена за ініціативи проф. А.С. Бухало и члена-кореспондента НАН України І.О. Дудки, слугувала базою для організації вивчення фоточутливості макроміцетів і створення біотехнологічних основ інтенсифікації їхнього культивування за допомогою штучного світла. У дослідженнях брали участь співробітники відділу мікології.

Дослідження зі створення модельних систем для опромінювання макроміцетів світлом із різними спектральними, енергетичними, поляризаційними характеристиками та забезпечення умов для експериментів з високою точністю відтворення енергетичних і спектральних параметрів випромінювання проведені разом із членом-кореспондентом НАН України А.М. Негрійком та к.ф.-м.н. В.В. Ходаковським (Інститут фізики НАН України).

Тест-культури для вивчення антимікробної активності макроміцетів були надані Інститутом з пошуку нових антибіотиків ім. Г.Ф. Гаузе РАМН, на базі якого проводили дослідження одержаної здобувачем в результаті виконання експериментів культуральної рідини. Співробітники Інституту брали участь у визначенні антимікробної активності наданого матеріалу, обговоренні отриманих результатів.

Вивчення дії світла на жирнокислотний склад ліпідів, вуглецевий склад полісахаридів і фізіологічні сполуки макроміцетів проводились у співробітництві з Інститутом мікробіології НАН Білорусі. Особистий внесок здобувача полягав у розробці теоретичної основи проведення досліджень, керівництві і участі у плануванні та проведенні експериментів.

У всіх наукових статтях, в яких опубліковані основні результати дисертаційної роботи, автору належить провідна роль у плануванні та проведенні експериментальних досліджень, обробці, інтерпретації й узагальненні результатів, їх теоретичному аналізі, а в переважній більшості статей їй належить провідна роль у їх написанні. В обговоренні результатів і написанні статей брали участь співавтори

відповідних публікацій. Загалом, при проведенні досліджень та узагальнення результатів частка автора склала близько 85%.

Апробація результатів дисертації. Результати роботи були представлені на: I, II и III з'їздах мікологів Росії (Москва, 2002, 2008. 2012); I, II, III, IV, V, VI Всеросійських конгресах з медичної мікології (Москва, 2003, 2004, 2005, 2006, 2007, 2014); I, II и III міждисциплінарних мікологічних форумах (Москва, 2009, 2010, 2015); International Medicinal Mushroom Conferences (IMMC) (Kiev, Ukraine, 2001; Pattaya, Thailand, 2003; Port Townsend, USA, 2005; Ljubljana, Slovenia, 2007; Nantong, China, 2009; Zagreb, Croatia, 2011; Beijing, China, 2013); XVII International School-Seminar «Spectroscopy of molecules and crystals» (Beregove, Crimea, Ukraine, 2005); XX International School-Seminar "Spectroscopy of molecules and crystals (Beregove, Crimea, Ukraine, September 20-27, 2011); XIV Congress of European Mycologists (Yalta, Ukraine, 22-27 September 2003); міжнародній науково-практичній конференції «Перспективи використання лікарських грибів при вирішенні медико-екологічних проблем (Київ, 10-11 вересня 2004 р.); Fifth International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products (China, 2005); науково-практичній конференції «Грибоводство и смежные биотехнологии. Инновации для инвестиций» (Москва ВВЦ, Центр «Москва», 7-12 жовтня 2005 р.); міжнародних наукових конференціях «Современное состояние и перспективы развития микробиологии и биотехнологии» (Мінськ, 2006, 2008); міжнародній науково-практичній конференції «Рациональное использование и воспроизводство лесных ресурсов в системе устойчивого развития» (Гомель, 2007); Першій міжнародній спеціалізованій науково-практичній конференції «Грибна індустрія-2006» (Київ, 2006); Другій міжнародній спеціалізованій науково-практичній конференції «Грибна індустрія-2007» (Київ, 2007); International Conference on Laser Applications in Life Sciences (Moscow, Russia ,11-14 June 2007); The National Scientific Conference with International Participation "Current problems in microbiology and biotechnology» (Chisinau, Republic of Moldova, 2009); міжнародній науковій конференції «Микробиологическая биотехнология – наукоемкое направление современных знаний» (Кишинів, Молдова, 6-8 липня, 2011 р.); Білоруському інноваційному тижні (Мінськ, Білорусь, 16-17 листопада 2011 р.); міжнародній науковій конференції «Малые дозы» (Гомель, 26-28 вересня 2012 р.).

Публікації. За темою дисертації опубліковано 73 наукові праці, включаючи 37 статей (з них 21 стаття опублікована у фахових виданнях), 1 розділ у монографії, 3 патенти на винахід, 4 деклараційних патенти, 2 патенти на корисну модель і 26 тез у матеріалах міжнародних і всеукраїнських з'їздів, конгресів і конференцій.

Структура дисертації. Дисертація складається зі вступу, огляду літератури, основної частини (включає матеріали й методи досліджень, результати власних досліджень та їхнє обговорення – 6 розділів), заключення, висновків і списку використаної літератури (673 найменувань). Дисертація викладена на 387 сторінках комп'ютерного тексту, проілюстрована 45 рисунками і 47 таблицями.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

У розділі «Огляд літератури» представлений сучасний стан таких проблем: перспективи використання макроміцетів як продуцентів харчової біомаси та біологічно активних речовин; головні принципи і сучасні біотехнологічні тенденції інтенсивного культивування їстівних і лікарських грибів; фактори регуляції росту, біосинтетичної активності макроміцетів і методів їхньої інтенсифікації. Наведена характеристика поживної цінності, біологічно активних речовин культивованих макроміцетів та їх лікувальні властивості. Представлені основні досягнення й проблеми у вивченні фотоморфогенезу й механізмів фоторецепції вищими грибами, роль джерел штучного світла в дослідженні грибів і фоторегуляції їхнього метаболізму. Подано опис досвіду використання штучного світла в рослинництві і грибництві та перспективи використання світла низької інтенсивності з різними спектральними і поляризаційними характеристиками для інтенсифікації та цілеспрямованої регуляції активності макроміцетів у біотехнологічних процесах.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Для проведення досліджень нами були взяті штами макроміцетів, відомі як продуценти харчової біомаси та біологічно активних речовин, що зберігались у Колекції культур шапинкових грибів Інституту ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України (ИВК) (табл. 1). Загалом у різних експериментах було вивчено 24 штами з 11 видів, 10 родів, 4 порядків, 2 відділів *Ascomycota* и *Basidiomycota*.

Таблиця 1

Систематичне положення макроміцетів, використаних в роботі

№ п/п	Порядок	Сімейство	Вид гриба
Відділ *Ascomycota*			
1	*Hypocreales*	*Cordycipitaceae*	*Cordyceps militaris* (L.) Link
2	*Hypocreales*	*Cordycipitaceae*	*Cordyceps sinensis* (Berk.) Sacc. Link
3	*Pezizales*	*Morchellaceae*	*Morchella esculenta* (L.) Pers.
4	*Pezizales*	*Morchellaceae*	*Morchella conica* Pers**.**
Відділ *Basidiomycota*			
5	*Agaricales*	*Agaricaceae*	*Agaricus bisporus* (J.E. Lange) Imbach
6	*Agaricales*	*Marasmiaceae*	*Lentinula edodes* (Berk.) Pegler (= *Lentinus edodes* (Berk.) Singer)
7	*Agaricales*	*Physalacriaceae*	*Flammulina velutipes* (Curtis) Singer
8	*Agaricales*	*Pleurotaceae*	*Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm.
9	*Hymenochaetales*	*Hymenochaetaceae*	*Inonotus obliqus* (Ach.: Pers.) Pilát
10	*Polyporales*	*Ganodermataceae*	*Ganoderma applanatum* (Pers.) Pat.
11	*Polyporales*	*Ganodermataceae*	*Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst.

У залежності від мети певного етапу досліджень штами макроміцетів культивували за умов поверхневого (на агаризованих, твердих і рідких субстратах) та глибинного культивування. Для пророщування спор, вивчення поверхневого росту і параметрів радіального росту макроміцети вирощували на агаризованому

пивному суслі (7^0 по Баллінгу). При вивченні динаміки накопичення біомаси, біосинтетичної активності та трофіки макроміцетів експерименти проводили на рідкому пивному суслі (7^0 по Баллінгу) та на глюкозо-пептонному середовищі (г/л: глюкоза – 20,0; KH_2PO_4 – 1,0; K_2HPO_4 – 1,0; $MgSO_4$ – 0,25; пептон – 3,5; КЭ – 2,0) у колбах Ерленмейєра у динамічному режимі (200 об/хв). Температура культивування становила 25±2°С, час – 7-14 діб. Швидкість радіального росту розраховували за методикою, описаною в літературі [Соломко и др., 2000]. Для розрахунку ростового коефіцієнта (РК) вимірювали діаметр колонії, висоту й щільність міцелію [Бухало, 1988].

Посівний міцелій грибів отримували за загальновідомими способами [Дудка и др., 1982]. Плодові тіла *Agaricus bisporus* одержували у камерах комплексу з вирощування шампіньйонів агрокомбінату «Пуща-Водиця» (Київ). Культивування *A. bisporus* проводилось за прийнятою на комбінаті технологією [Дудка и др., 1992]. Плодові тіла інших макроміцетів одержували в процесі інтенсивного культивування [Бухало и др., 2004] на таких субстратах: *Flammulina velutipes, Ganoderma applanatum* і *G. lucidum* – осикова тирса (60%) і пшеничні висівки (40%); *Hericium erinaceus* і *Lentinus edodes* – букова тирса (60%) і кукурудзяна крупа (40%); *Pleurotus ostreatus* – солома пшенична (40%), тирса вільхи (40%), пшеничні висівки (20%). Урожайність розраховували як масу свіжих грибів на 1 кг субстрату на момент інокуляції. Окремі деталі методики наведені при викладенні результатів досліджень (розділ 6 та 7).

Базидіоспори *A. bisporus, F. velutipes, L. edodes* і *P. ostreatus* одержували за методикою [Дудка и др., 1982]. Спори *G. applanatum, G. lucidum* і *H. erinaceus* отримували із стиглих плодових тіл, які були підвішені в стерильних ємностях над стерильною фольгою, їх залишали при температурі +20-22°С на 1-2 доби. Спори пророщували за методикою, описаною в літературі [Дудка и др., 1982; Бухало, 1988]. Проростання спор контролювали під мікроскопом щоденно. Проростлі спори, що лежали окремо, ізолювали і поміщали в нові чашки Петрі із сусло-агаром для вимірювання швидкості росту. Сформовані міцеліальні структури аналізували на наявність пряжок і кількість ядер в клітинах. Ядра фарбували за методом Гімза [Дудка и др., 1982].

Для визначення кількості біомаси міцелій гриба відокремлювали від культуральної рідини та висушували в сушильній шафі за температури 105°С до постійної маси. Концентрацію біомаси розраховували в грамах сухої речовини на 1 л середовища.

Екстракцію ендополісахаридів здійснювали після руйнування міцелію на гомогенізаторі [Chihara, Hamuro, 1970; Гончарова, 1996]. Подрібнену пробу сухого міцелію в кількості 100 мг поміщали в пробірку об'ємом 20 мл, додавали 5 мл 1 М NaOH, закривали пробками та екстрагували в термостаті за 60°С протягом 1 год, періодично помішуючи [Tang, 2002]. Одержаний екстракт центрифугували 20 хв при 8000 об/хв.

Для виділення екзополісахаридів культуральну рідину упарювали в 2-3 рази, осаджували етиловим спиртом (1:1), залишали при температурі 4°С до повного осадження, потім осаджені полісахариди відокремлювали центрифугуванням,

діалізували три доби, проти дистильованої води, переосаджували спиртом, відокремлювали центрифугуванням і висушували при температурі 4°С [Babitskaya, 2000]. Осад відокремлювали та визначали вміст полісахариду за фенол-сірчаним методом у супернатанті [Грушенко, 1978].

Склад вуглеводів полісахаридів після попереднього гідролізу їх 7%-ною сірчаною кислотою на водяній бані при 100°С протягом 5 год визначали за методом газорідинної хроматографії (ГРХ) у вигляді триметилсилильних похідних цукрів [Gutiérrez, 1996].

Особливість трофіки макроміцетів досліджували за рівнем накопичення біомаси та ефективністю використання вуглецевовмісного субстрату (глюкози). Ефективність використання глюкози визначали за величиною економічного коефіцієнта Y, який розраховували як відношення біомаси, накопиченої кожним макроміцетом, до кількості використаного ним за певний період субстрату [Перт, 1978]. Залишкову кількість глюкози в культуральному фільтраті визначали фенол-сірчаним методом [Dubois et al., 1956].

Визначення білка проводили за методом [Ермаков, 1987]; ліпіди з вологого міцелію екстрагували за методом Фолча в модифікації Блайя та Дайєра [Folch, 1957; Кейтс, 1975]. Якісний та кількісний склад жирних кислот вивчали за допомогою методу газорідинної хроматографії на хроматографі «Хром-5». Ідентифікацію ефірів жирних кислот проводили за відносними об'ємами утримування, а також у співставленні з показниками контрольних метилових ефірів чистих жирних кислот [Бабицкая и др., 2003]. Антиокислювальну активність (АОА) спиртових екстрактів визначали за [Капич, 1995].

Екстракцію меланіну із попередньо зруйнованих клітин біомаси проводили за загальноприйнятим методом лужного гідролізу [Бабицкая, 2000]. Вміст меланіну в середовищі культивування визначали прямим фотометруванням культуральної рідини після відділення міцеліальної маси грибів [Бабицкая и др., 2002]. Загальний вихід меланіну розраховували як суму меланіну, екстрагованого з біомаси гриба (ендомеланіни) та меланіну, синтезованого грибом у культуральній рідині (екзомеланіни).

Тирозиназну та поліфенолоксидазну активність визначали спектрофотометрично [Ермаков, 1987]. За умовну одиницю активності приймали приріст оптичної щільності в 1 мл реакційної суміші, перерахованої на 1 мг внесеного білка. Пероксидазну активність визначали спектрометрично [Thiyagarajan et al., 2008] при довжині хвилі 436 нм, у якості субстрату використовували АБТС (2,2'-азино-біс (3-етилбензотіазолін-6-сульфонова кислота) в ацетатному буфері pH 5,5. За умовну одиницю активності приймали приріст оптичної щільності в 1 мл реакційної суміші, перерахованої на 1 мг внесеного білку. Каталазну активність визначали спектрофотометрично [Королюк и др., 1988]. Активність позаклітинної каталази виражали в ммолях, а внутрішньоклітинної – в мкмолях розкладеного H_2O_2 $хв^{-1}$ $мг^{-1}$ білку.

Антимікробну активність макроміцетів вивчали, використовуючи такі 12 тест-культури з Всеросійської колекції мікроорганізмів (ВКМ): грампозитивні бактерії (*Bacillus subtilis* АТСС 6633, *B. mycoides* 537, *B. pumilis* NCTC 8241, *Leuconostoc mesenteroides* ВКПМ В-4177, *Micrococcus luteus* NCTC 8340, *Staphylococcus aureus*

FDA 209P (MSSA), ИНА 00761 (MRSA, клінічний ізолят), грамнегативні бактерії (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Comamonas terrigena* ВКПМ B-7571 (=ATCC 8461), *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, гриби (*Aspergillus niger* ИНА 00760, *Saccharomyces cerevisiae* RIA 259). Антимікробну активність визначали за діаметрами зон затримки росту тест-культур після інкубування. Зміну активності визначали у відсотках по відношенню до контролю [Poyedinok et al., 2015].

У всіх варіантах дослідів з вивчення впливу світла низької інтенсивності на макроміцети були обрані умови рівних енергетичних доз світлових впливів на спори та міцелій, тому для всіх видів джерел світла щільність енергії на поверхні зразка була однаковою. Світлові потоки інтенсивністю не більше 100 мВт/см^2 вважаються низькоінтенсивними [Ohshiro, Calderhead, 1988]. Експериментальні дослідження, проведені на біологічних об'єктах різного рівня організації, дозволили визначити межі можливих змін параметрів світлового впливу для забезпечення біостимулюючого ефекту: за щільністю енергії – до 10 Дж/см^2 і довжині хвилі випромінювання – 337-1260 нм. При обранні однакових енергетичних умов опромінювання зразків світлом ми виходили з того, що за відсутності встановлених і загальноприйнятих механізмів дії низькоінтенсивного випромінювання на міцелій грибів ми зосередились на визначенні якісних відмінностей впливу на них рівних доз енергії випромінювання різного спектрального складу та часових характеристик. Опромінювання проводили в безперервному та переривчастому режимах з тривалістю імпульсу 1 мс та періодом повторення 2 мс. Щільність енергії оптичного випромінювання складала 45-650 мДж/см^2.

Як джерело когерентного видимого світла використовували модифікації газових лазерів: гелій-неонового ЛГН-215 з випромінюванням на довжині хвилі 632,8 нм (червоне світло), виробництва НПО «Полярон», Львів, Україна, та аргонового іонного лазера (модифікована модель ЛГН-106М1 виробництва НПО «Плазма», Росія), випромінювання з довжиною хвилі 514,5 та 488,0 нм. Модифікація лазера полягала в установці замість одного з дзеркал резонатора лазера призми Літрова, що дозволило настроювати лазер на генерацію випромінювання на обраній довжині хвилі. Лазерний промінь розфокусовувався лінзою до розміру області чашки Петрі чи дна колби (рис. 1).

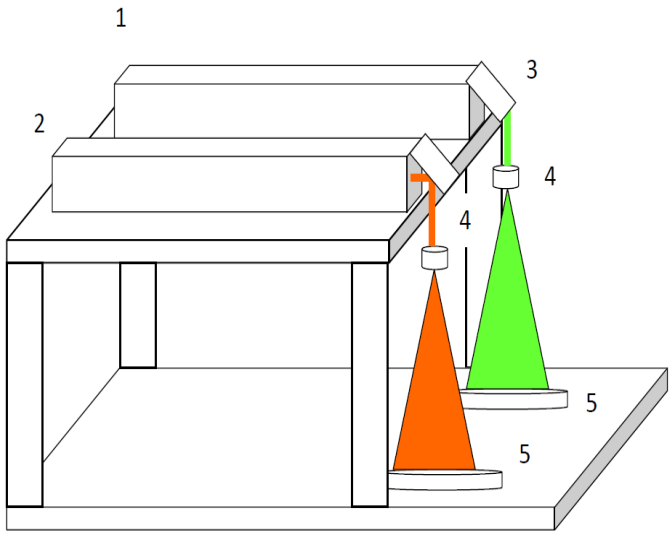

Рис. 1. Схема лазерного опромінювання макроміцетів в чашках Петрі.
Примітка: 1 – аргоновий іонний лазер ЛГН-106М1; **2** – гелій-неоновий лазер ЛГН-215; **3** – поворотні дзеркала; **4** – лінзи-об'єктиви; **5** – чашки Петрі

Матриця світлодіодів формувалась з 21 потужного світлодіода типу YSH-FRGBB-IA на основі AlGaInN, виробництва компанії China Young Sun Led Technology Ltd. Кожний діодний блок містив три світловипромінювальних мікрочіпа, які випромінюють світло з довжинами хвиль 463 нм (синій), 522 нм (зелений) та 625 нм (червоний). Електрична потужність кожного мікрочіпа складала 1 Вт, інтенсивність випромінювання регулювали від нуля до максимального значення незалежно для кожного спектрального діапазону, тобто окремо для синього, зеленого та червоного світла регулюванням сили струму через діоди (рис. 2).

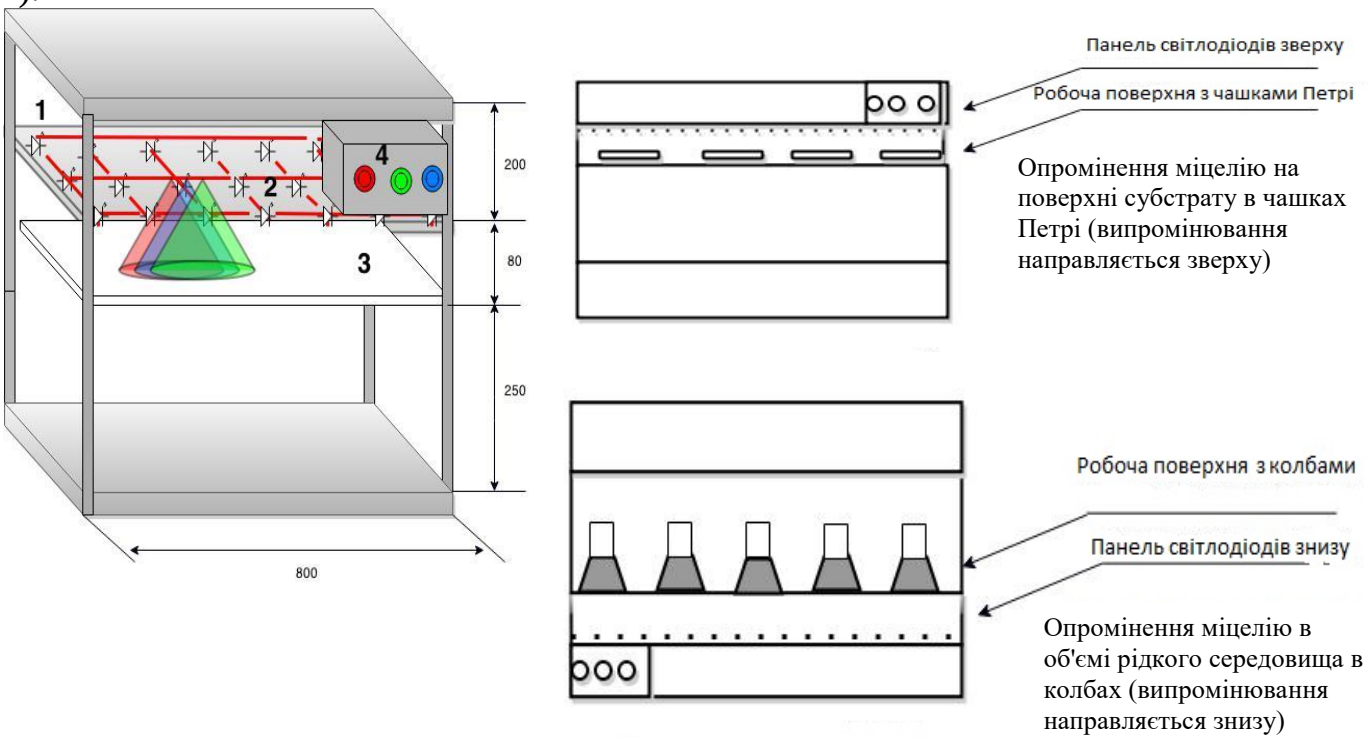

Рис. 2. Схема світлодіодної освітлювальної установки для опромінення макроміцетів світлом контрольованого спектрального складу.
Примітка: 1 – панель зі світлодіодами (21 потужний світлодіод на AlGaInN типу YSH-FRGBB-IA); **2** – світлодіоди з незалежним регулюванням потужності випромінювання в трьох спектральних каналах (червоний, зелений, синій), розміщені на панелі; **3** – робоча поверхня для розміщення опромінюваних об’єктів; **4** – блок живлення світлодіодів з незалежним регулюванням потужності в окремих спектральних діапазонах

Щільність потужності світлового випромінювання вимірювали за допомогою цифрового оптичного вимірювача потужності та енергії PM-100D, Thorlabs Inc. зі стандартним фотодіодним датчиком потужності S120C, робочий діапазон 400-1100 нм. Енергетична доза опромінення (світлова енергія, що падає на одиницю площі) визначалась як добуток щільності потужності та часу опромінення. Через досить широку варіацію вихідної потужності використаних джерел світла експозицію обирали у відповідності із заданою дозою та варіювали від 1 до 30 хв, у залежності від схеми експерименту.

Статистичну обробку результатів проводили з використанням програми Statistica 6.0. Результати досліджень у відповідності з t-критерієм Стьюдента були статистично достовірними за рівня значимості $p \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Розробка способів підготовки та фотоактивації посівного матеріалу

Вивчення фоточутливості макроміцетів і розробка методів активізації посівного матеріалу культивованих їстівних і лікарських макроміцетів шляхом короткочасного опромінення низькоінтенсивним світлом вимагали створення систем освітлення з максимально точно контрольованими енергетичними й спектральними параметрами. Для цього нами із співробітниками Інституту фізики НАН України були створені модельні установки на основі газових лазерів і твердотілих світловипромінюючих діодів (рис. 1 та 2). Застосування створених модельних систем дозволило одержувати коректні, відтворювані результати з дії світла на ростову та біосинтетичну активність макроміцетів на різних стадіях онтогенезу при поверхневому та глибинному культивуванні.

На основі аналізу значного фактичного матеріалу, який свідчить про те, що у своїй більшості регулююча дія світла в ході онтогенезу грибів виявляється при переході організму до нового етапу індивідуального розвитку, в тому числі до проростання спор і формування спороносних структур, було зроблено припущення, що світло можна використовувати як екологічно чистий стимулятор біологічної активності спор. Аналіз отриманих нами результатів досліджень дозволив визначити, що короткочасне низькоінтенсивне опромінення монохроматичним світлом довжиною хвилі 488,0 і 632,8 нм у дозах від 45 до 230 мДж/см^2 дозволяє значно збільшити кількість пророслих спор у вивчених видів макроміцетів. Оптимальна доза опромінення в експерименті – до 230 мДж/см^2. Опромінення світлом з довжиною хвилі 514 нм у тих самих дозах було або нейтральним (*P. ostreatus, G. aplanatum, A. bisporus*), або пригноблюючим (*H. erinaceus, L. edodes, G. lucidum, F. velutipes*). Вперше встановлена різниця в фоточутливості базидіоспор не тільки у різних видів, але й між штамами одного й того ж виду. Імовірно, індивідуальна реакція штамів на світлові дії пов’язана з їхнім географічним походженням і епігенетичними особливостями, які були сформовані під впливом різних екологічних факторів. Так, опромінення червоним світлом збільшує кількість пророслих спор у штама 963 *H. erinaceus* приблизно в 10 разів, у штама 1756 – в 100, у 968 – в 10^5 разів.

Порівняльне вивчення впливу світла, одержаного з різних джерел, показало, що базидіоспори більшості вивчених видів більш чутливі до когерентного (лазерного) світла, ніж до некогерентного (світлодіоди) (рис. 3). Особливо яскраво ці відмінності спостерігаються у *F. velutipes, G. aplanatum, G. lucidum* і *H. erinaceus.* Такий ефект, мабуть, пов’язаний із більш глибоким проникненням лазерного світла у клітинні структури. У наш час можливі механізми такої біостимуляції когерентним світлом є предметом активних дискусій [Karu, 2003, 2008, 2011; Rubinov et al., 2005; Hode, 2005; Zalevsky et al., 2011].

Порівняльне вивчення ефективності опромінення в безперервному та імпульсному режимі (632,8 нм) на проростання спор показало, що імпульсне світло робить достовірно більший стимулюючий вплив на проростання базидіоспор *F. velutipes* і *G. applanatum*, ніж безперервне світло за тієї ж дози і довжини хвилі. Спори *H. erinaceus, G. lucidum, L. edodes* і *P. ostreatus* практично однаково реагують на обидва режими опромінення.

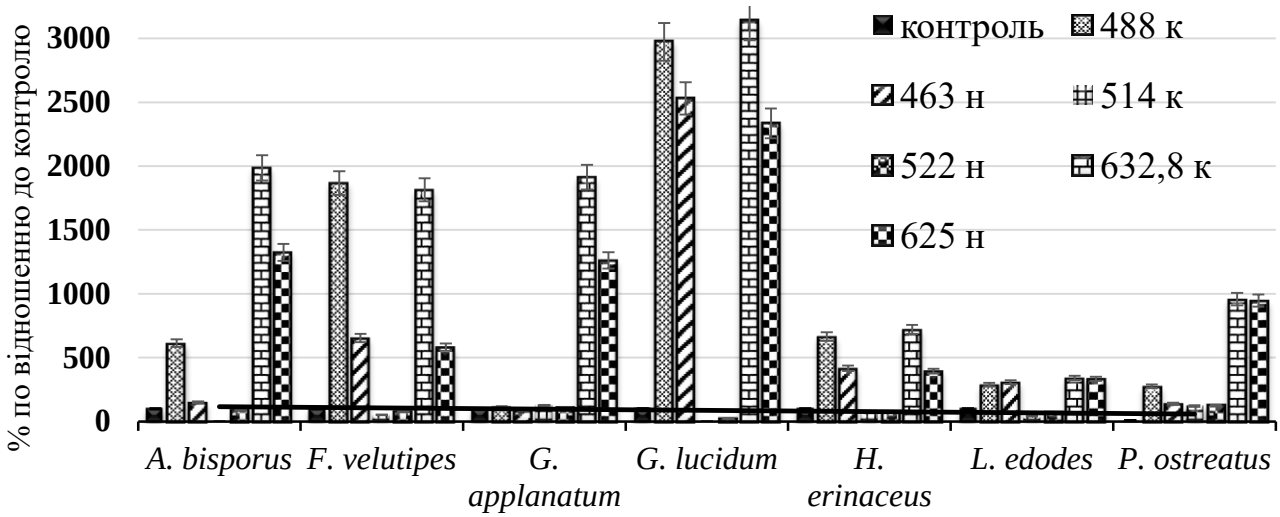

Рис. 3. Вплив світла низької інтенсивності (230 мДж/см^2) з різними спектральними характеристиками на проростання спор макроміцетів.
Примітка: н – некогерентне світло, к – когерентне

Для видів грибів, спори яких проростають тривалий час, окрім збільшення відсотка проростання, ми виявили скорочення часу їхнього проростання й формування повітряного міцелію на агаризованому середовищі після світлових впливів порівняно з початковими показниками в досліджуваних штамів.

Аналіз властивості базидіоспор, опромінених лазерним світлом і LED, до формування моноспорових ізолятів дозволив вперше встановити, що фотоіндукована когерентним світлом активність передається на наступну стадію від спори до формування паросткової гіфи (рис. 4). Окрім того, спостерігається зростання стимулюючого ефекту, який проявляється в збільшені швидкості росту міцелію моноспорового ізолята порівняно з контролем. Так, наприклад, відсоток проростання базидіоспор досліджуваних штамів *L. edodes* після опромінення когерентним і некогерентним світлом у синій частині спектра, а *P. ostreatus* – в червоній достовірно не відрізнялись. Однак, швидкість росту моноспорових ізолятів, отриманих зі спор, опромінених лазерним світлом у цих діапазонах довжини хвиль, майже у 3 рази вища, ніж після опромінення світлодіодами. Це свідчить про те, що специфіка лазерної фотоіндукції, яка призводить до додаткової стимуляції різних процесів у клітині, може проявлятися й після проростання спори. Такі реакції пов’язують зі змінами в параметрах клітинного гомеостазу. Вони вписуються в теорію про універсальні механізми фотостимуляції, яка знайшла експериментальне підтвердження на інших біологічних об’єктах [Кару, 2008]. Згідно з цією теорією основні фізичні і/або хімічні зміни, викликані світлом у

фотоакцепторних молекулах (наприклад, у термінальних ферментах дихальних ланцюгів), супроводжуються каскадом біохімічних реакцій в клітинах, які не потребують подальшої активізації світлом (ланцюги передачі й посилення фотосигналу або клітинна сигналізація). Утім, у літературі відсутня будь-яка інформація про трансформацію таких змін у процесі морфогенезу грибів.

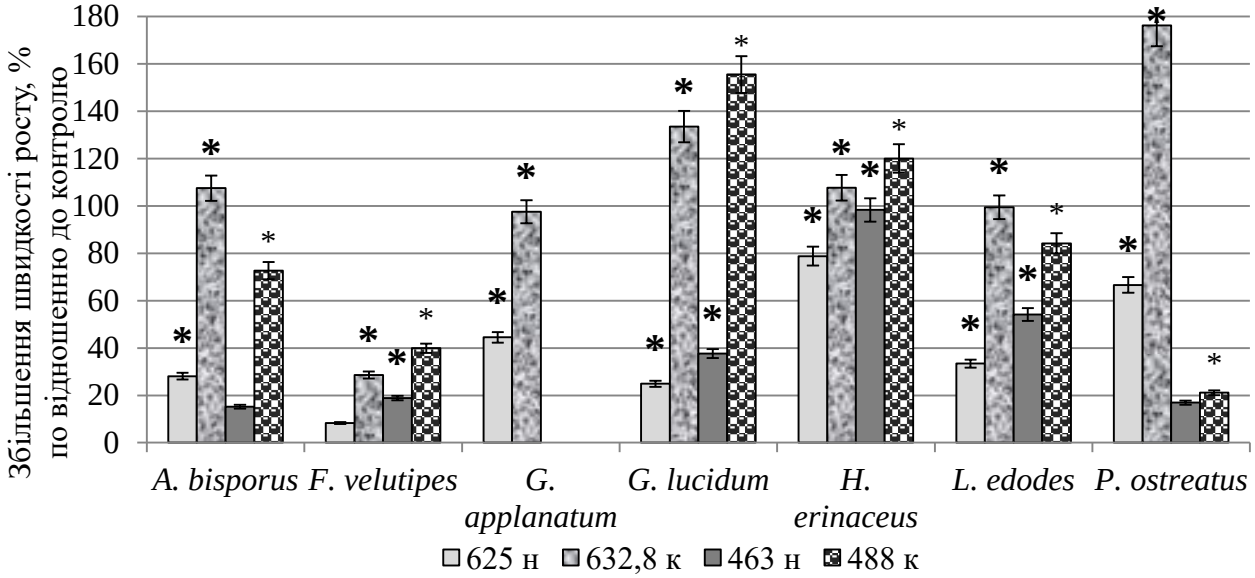

Рис. 4. Вплив опромінення на ріст моноспорових ізолятів
Примітка: * – зазначені статистично достовірні відмінності по відношенню до контролю ($p < 0,05$), результати представлені, як M±n n = 50; н – некогерентне світло, к – когерентне

Тому була висунута гіпотеза про те, що фотоіндукційні зміни біологічної активності різних організмів і пролонгованість цих змін не є унікальними та характерні для багатьох представників мікобіоти. Для перевірки цієї гіпотези та з метою визначення оптимальних параметрів активації посівного матеріалу була розроблена схема проведення досліджень (рис. 5). Вона включала вивчення відповідних реакцій макроміцетів (ріст і накопичення біомаси) на короткочасне опромінення світлом низької інтенсивності різної когерентності та довжини хвиль на різних стадіях росту вегетативного міцелію починаючи від проростання спор. Одержаний за цією схемою міцелій використовували для повторного засіву. Показником його активності було накопичення біомаси. Контролем слугував міцелій, отриманий з неопромінених спор, і такий, що не піддавався світловому впливу на жодній стадії росту.

Аналіз ростових показників активованого посівного матеріалу (табл. 2) дозволив визначити для кожного штаму фази онтогенезу, на яких опромінення дозволяє отримати максимальний стимулюючий ефект. При дослідженні посівного міцелію *G. applanatum* і *P. ostreatus*, одержаного зі спор, опромінених зеленим світлом (514 нм), не спостерігали достовірних змін у накопиченні біомаси порівняно із контролем, а у *F. velutipes, G. lucidum* і *H. erinaceus* навпаки відмічали зменшення. Однак, у процесі формування вегетативного міцелію чутливість *G. lucidum*, *H. erinaceus* і *P. ostreatus* до світла цієї хвилі кардинально змінюється. При

використанні посівного міцелію, опроміненого в стаціонарній фазі росту, спостерігали збільшення виходу біомаси цих макроміцетів на 34,8%, 43,1% та 46,1% відповідно. Спори *G. applanatum* не виявляють чутливості до синього світла (488,0 нм), і одержаний з них міцелій не відрізнявся своєю активністю від контролю. Опромінення решти видів як червоним (632,8 нм), так і синім світлом на всіх указаних фазах розвитку призводить до значного підвищення активності посівного міцелію. Активацію посівного міцелію *F. velutipes, G. applanatum* і *P. ostreatus* слід проводити на експоненціальній та стаціонарній фазах росту, а *G. lucidum* – у стаціонарній. Опромінення спор *H. erinaceus* лазерним світлом з довжиною хвилі 488,0 нм призводить до максимальної стимуляції ростових процесів, і накопичення біомаси зростає майже в 3 рази порівняно з контролем. Фотостимуляція червоним і синім світлом однаково ефективна на всіх вивчених стадіях онтогенезу *L. edodes.*

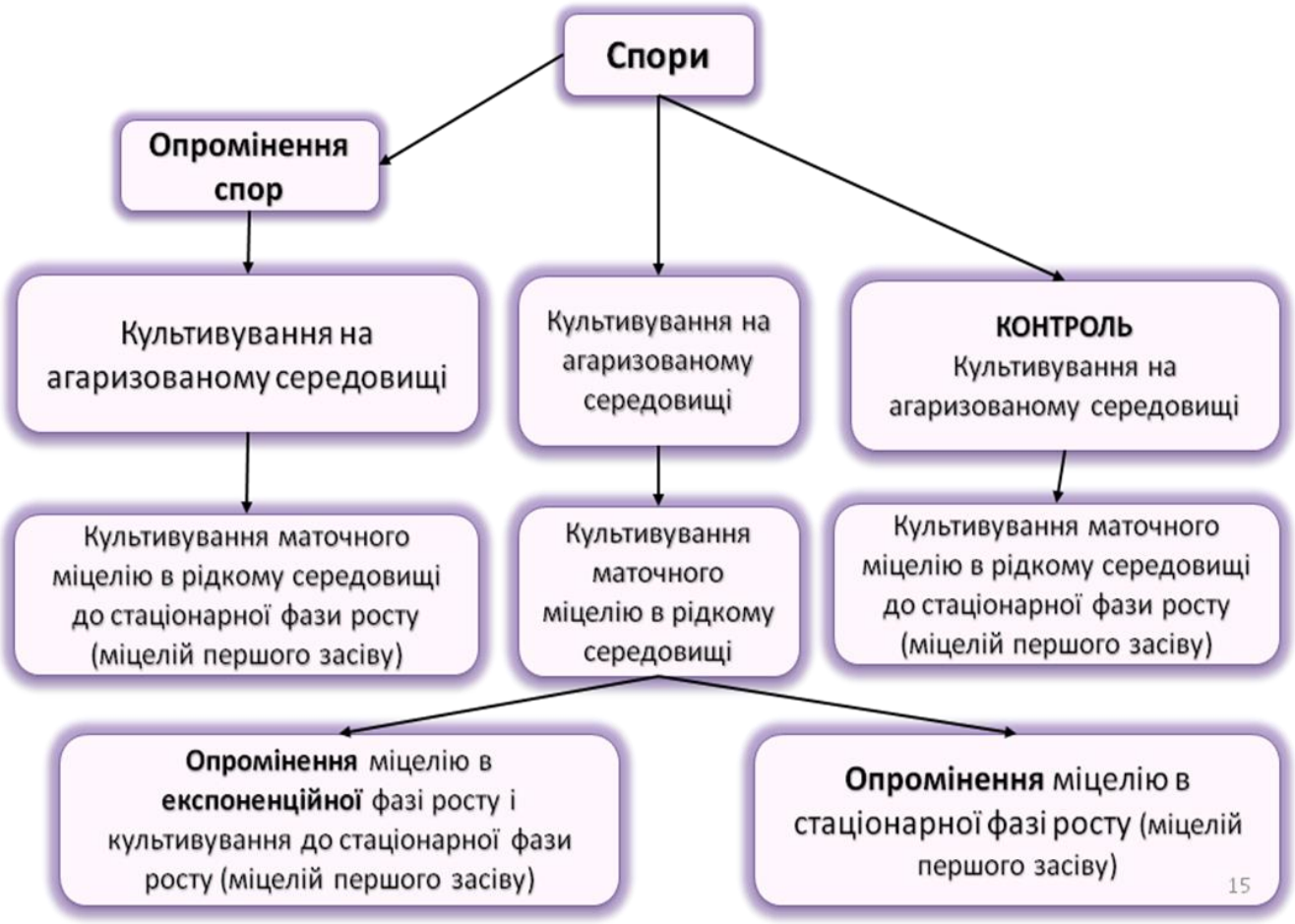

Рис. 5. Схема активації посівного матеріалу і отримання міцелію першого засіву

Ефективність когерентного світла низької інтенсивності на 5-40% вища порівняно з некогерентним для *C. militaris*, *F. velutipes, G. applanatum, G. lucidum, H. erinaceus, I. obliquus, L. edodes. M. conica, M. esculenta* та *P. ostreatus.* Нами вперше отримані дані про фоточутливість грибів з роду *Morchella* [Поединок и др., 2013]. На відміну від інших вивчених видів синє світло не викликало у них достовірних змін швидкості росту й накопичення біомаси (табл. 3).

Таблиця 2

Ріст макроміцетів (накопичення біомаси, г/л сухої біомаси) при використанні посівного матеріалу, опроміненого низькоінтенсивним лазерним світлом на різних фазах онтогенезу

Вид	Посівний міцелій, опромінений на стадіях онтогенезу									Контроль, не опромінений посівний міцелій
	Спори			Експоненціальна фаза росту			Стаціонарна фаза росту			
	632,8 нм	514,0 нм	488,0 нм	632,8 нм	514,0 нм	488,0 нм	632,8 нм	514,0 нм	488,0 нм	
F. velutipes	4,7±0,3*	2,0±0,1*	5,1±0,4*	4,5±0,3*	1,8±0,2*	**5,9±0,2***	5,0±0,3*	2,5±0,1	**5,7±0,1***	3,2±0,1
G. applanatum	8,9±0,5*	6,0±0,3	6,2±0,3	**9,3±0,2***	6,2±0,4	**9,0±0,5***	**8,7±0,3***	5,9±0,4	**9,5±0,5***	6,1±0,2
G. lucidum	10,0±0,5*	3,0±0,1*	10,9±0,6*	9,6±0,3*	6,9±0,2	8,0±0,1*	**11,5±0,6***	9,3±0,2*	**12,1±0,3***	6,9±0,3
H. erinaceus	**13,2±0,4***	2,4±0,2*	**15,0±0,6***	11,3±0,7*	3,3±0,2*	12,6±0,3*	8,8±0,1*	8,3±0,5*	9,8±0,3*	5,8±0,2
L. edodes	**14,6±0,*3**	13,0±0,5*	**15,7±0,3***	13,9±0,4*	12,4±0,1*	**15,3±0,5***	**15,1±0,3***	13,7±0,6*	**16,0±0,8***	6,3±0,4
P. ostreatus	16,2±0,7*	11,9±0,2	14,5±0,8*	**19,2±0,9***	13,9±0,6	14,6±0,4*	**18,4±0,7***	17,1±0,7*	15,1±0,3*	11,7±0,5

Таблиця 3

Вплив когерентності світла на ріст міцелію (% зміни біомаси по відношенню до контролю)

Вид	Довжина хвилі, нм					
	632,8 нм к	625.0 нм н	514.5 нм к	522.0 нм н	488.0 нм к	463.0 нм н
C. militaris	19,5±0,15*	11,6±0.24*	7,8±0,17*	1,6±0,4*	**25,9±0,21***	11,9±0,18*
F. velutipes	56,2±1,8*	36,3±0,37*	-11,6±1,0*	0	**78,1±1,1***	44,2±0,4*
G. applanatum	**42,7±1,2***	26,6±0,27*	0	0	**55,7±1,8***	37,6±0,4*
G. lucidum	66,7±1,4*	41,7±1,1*	34,9±0,28*	26,0±0,28*	**75,3±0,6***	20,0±0,36*
H. erinaceus	51,9±3,3*	36,5±4,2*	43,1±0,8*	31,0±0,36*	**68,9±2,8***	43,5±0,58*
I. obliquus	17,2±0.18*	9,7±0.14*	2.2±0.1*	5.3±0.2*	**56.9±2.0***	23,6±0.69*
L. edodes	**139,9±2,5***	93,4±0,8*	117,5±2,3*	87,7±1,7*	**153,9±3,0***	104,2±3,3*
M. conica	**19,6±0,27***	13,9±0,2*	0	0	0	0
M. esculenta	**32,7±1,9***	11,9±0,31*	0	0	0	0
P. ostreatus	**57.3±2,1***	44,8±1,2*	46.1±0,6	43,6±0,5	29,1±0,5*	24,8±0,3*

Примітка: * - зазначено статистично достовірні відмінності по відношенню до опромінення некогерентним світлом ($p < 0,05$), результати представлені, як M±n n = 4-5

Імпульсне світло викликає більшу активацію посівного міцелію макроміцетів порівняно з безперервним, яка виражалась у додатковій стимуляції росту, що призводило до збільшення накопичення біомаси міцелію в усіх використаних в роботі діапазонах довжин хвиль у макроміцетів *C. militaris, G. lucidum, H. erinaceus, L. edodes* та *P. ostreatus.* Опромінення посівного міцелію зеленим імпульсним світлом не викликало змін ростових показників у *I. obliquus, G. applanatum, M. conica, M. esculenta*, які були індиферентні до безперервного світла з довжиною хвилі 514 нм. Ми не відмітили достовірної зміни інгібуючого ефекту зеленого світла на ріст *F. velutipes* після опромінення в указаному режимі.

На особливу увагу заслуговує той факт, що проведена нами фотоактивація посівного матеріалу дозволяє знизити кількість його внесення в субстрат у 4 рази (з 5% до 1,2%). При цьому накопичення біомаси *G. lucidum, H. erinaceus, L. edodes* і *P. ostreatus* достовірно вище, ніж при внесенні 5% неопроміненого посівного матеріалу.

Вперше для грибів установлено, що зменшення кількості активізованого інокулюму, що вноситься, сприяє зростанню стимулюючого ефекту. При 1,2% інокуляції субстрату накопичення біомаси *P. ostreatus* зростає більше ніж на 240% порівняно з неопроміненим контролем в тій самій концентрації, тоді як при внесенні 5% активованого посівного матеріалу – всього на 80%. Аналогічна тенденція спостерігається у *G. applanatum, G. lucidum* і *H. erinaceus*.

Одержані нами нові для макроміцетів дані про можливості передачі викликаних світлом змін від спор на наступні онтогенетичні стадії розвитку вегетативного міцелію стали логічною основою для проведення подальших досліджень тривалого збереження фотоіндукційної активності посівного міцелію при зберіганні і пересівах (пасажах). Посівний глибинний міцелій, опромінений в оптимальному для кожного штаму режимі на стаціонарній фазі росту, зберігали в темноті при температурі +5ºС. Посів на рідке поживне середовище (5% від об’єму середовища) проводили одразу ж після опромінення, а потім кожні 24 год. Культивували глибинним способом до стаціонарної фази. Показником активності посівного міцелію вважали накопичення біомаси на певному об’ємі середовища.

Аналіз одержаних результатів показав, що достовірне зниження індукованої активності посівного міцелію починається вже в перші 24 год збереження у видів *F. velutipes, H. erinaceus* та *I. obliquus*. Посівний міцелій *C. militaris, G. applanatum, P. ostreatus* і *L. edodes* починає втрачати свою активність через 24 год після опромінення. Причому в *P. ostreatus* вона залишається незмінною перші 24 год, а у *G. lucidum* 48 год. Однак, через 72 год активність посівного міцелію у всіх штамів знижується до рівня контролю. Це необхідно враховувати при використанні методів фотоактивації в біотехнологіях культивування макроміцетів і для максимальної інтенсифікації технологічних етапів їхнього культивування: інокуляцію ферментаційних середовищ активованим посівним матеріалом треба проводити в максимально короткий термін після опромінення.

Нами одержані дані про динаміку змін фотоіндукційної активності посівного міцелію макроміцетів після кількох пересівів, що дозволило рекомендувати використання його для *C. militaris. F. velutipes, G. lucidum, P. ostreatus* і *L. edodes* для

двох поступових інокуляцій, а для *G. applanatum, H. erinaceus* і *I. obliquus* – тільки для однієї.

Чинники, що визначають реалізацію фотостимулюючого ефекту в процесі культивування

Знання чинників, що впливають на експресію генів і реалізацію фотоіндукованих змін у макроміцетів, є невід'ємною складовою успішного використання штучного світла в біотехнологіях культивування макроміцетів. У роботах авторів, які досліджували мікроміцети, було визнано, що характер середовища, на якому вирощували гриби і спосіб культивування, визначає, чи буде світло стимулювати чи зменшувати темп росту грибів [Carlile, 1965; Ilmen et al., 1997; Chovanec, 2001; Friedl et al., 2008; Schuster et al., 2007; Tisch, 2010, 2014].

Нами вперше одержані дані, які свідчать про безсумнівний вплив способу культивування макроміцетів на процеси, що визначають кількісні зміни росту, спричинені світлом. Достовірної відмінності у швидкості росту опроміненого міцелію на агаризованому середовищі від контролю не знайдено у *L. edodes, M. conica* та *M. esculenta* за всіх режимів опромінення. У *C. militaris, F. velutipes, G. lucidum* та *I. obliquus* не відмічено різниці в лінійній швидкості росту по відношенню до контролю при опроміненні зеленим світлом. У *G. applanatum* змін швидкості росту на агаризованому середовищі не знайдено після обробки міцелію як синім, так і червоним світлом. Аналіз поверхневого росту міцелію макроміцетів на рідкому середовищі шляхом визначення біомаси міцелію, що виріс, показав достовірні відмінності цього показника за тих самих режимів світлових впливів по відношенню до контролю. В даному випадку відсутність достовірних відмін між експериментом і контролем для деяких макроміцетів при рості на агаризованих середовищах пояснюється різницею їхніх морфологічних змін у відповідь на світлові впливи. При визначенні лінійної швидкості росту не враховуються такі важливі показники росту, як висота і щільність міцелію. Для одержання найбільш стимулюючого ефекту від опромінення глибинне культивування є найбільш прийнятним. Зростання накопичення біомаси при культивуванні в динамічному режимі варіювало в залежності від штаму і режиму опромінення від 12 до 200% порівняно з культивуванням на тому самому середовищі в стаціонарному режимі.

Беручи до уваги згаданий вище взаємозв'язок між фотоіндукційною активністю грибів та їхнім метаболізмом, припустили, що концентрації основних джерел живлення можуть впливати на ступінь змін інтенсивності росту макроміцетів, викликаних світлом. Для експериментальної перевірки цього припущення нами було вивчено накопичення біомаси макроміцетів на рідкому глюкозопептонному середовищі з різними концентраціями глюкози (10, 30 и 50 г/л) при використанні посівного міцелію (5% об'єму), опроміненого низькоінтенсивним червоним світлом (632,8 нм). Цей режим опромінення було обрано як один з найефективніших для активації посівного матеріалу вивчених видів макроміцетів. Культивування проводили в стаціонарному режимі. У всіх досліджуваних штамів макроміцетів найбільш стимулюючий ефект після опромінення спостерігався при рості на середовищі з 10 г/ глюкози (табл. 4). Зростання концентрації глюкози в 3 и 5

разів знижувало збільшення накопичення біомаси порівняно з контролем у *H. erinaceus* на 19 и 31% та у *P. ostreatus* на 10 и 23% відповідно. Цей чинник ініціював припущення, що опромінення низькою інтенсивністю призводить до змін трофіки макроміцетів, що виражається в зростанні ефективності споживання джерела вуглецю на середовищах із зниженим вмістом глюкози, порівняно з неопроміненим контролем.

Таблиця 4

Вплив концентрації джерела вуглецю на фотоіндуковану стимуляцію росту макроміцетів

Вміст глюкози, г/л	Біомаса, г/л		% зростання біомаси
	Контроль	Опромінення	
C. militaris			
10	4,5±0,1	5,9±0,2*	31,1
30	6,0±0,2	7,4 ±0,3*	23,5
50	6,3±0,2	7,8 ±0,1*	23,8
G. lucidum			
10	5,1±0,3	7,1 ±0,1*	39,2
30	9,6±0,4	12,5 ±0,2*	30,2
50	10,0±0,3	13,1± 0,4*	30,0
L. edodes			
10	4,0±0,1	7,9±0,2*	97,5
30	8,3±0,2	14,4 ±0,3*	73,5
50	11,2±0,4	16,8± 0,3*	50,0
H. erinaceus			
10	4,5±0,2	7,8±0,1*	73,0
30	6,2±0,3	9,5±0,2*	53,8
50	8,5±0,1	12,1±0,3*	42,2
P. ostreatus			
10	5,3±0,2	8,7±0,2*	64,1
30	11,7±0,1	18,1±0,4*	54,7
50	13,6±0,3	19,2±0,3*	41,2

Примітка: ***** – зазначено статистично достовірні відмінності між експериментом і контролем ($p < 0,05$), результати представлені, як M±n, n = 4-5

Для перевірки цього прпущення було проведено вивчення споживання глюкози при культивуванні опромінених і контрольних штамів на середовищах із різною концентрацією глюкози. Критерієм оцінки цього параметра слугувала величина економічного коефіцієнта. Одержані дані підтвердили наше припущення (рис. 6). Ефективність споживання глюкози як контрольними, так і опроміненими штамами макроміцетів, була вищою на середовищі, яке містило 10 г/л глюкози. Це можна пояснити з екологічної точки зору адаптацією організму до негативних змін навколишнього середовища. Проте, нами вперше встановлено, що підвищення

економічного ефекту у фотоактивованих штамів макроміцетів значно більше виражено при низькому вмісті джерела вуглецю. Якщо у контрольних штамів макроміцетів ефективність освоєння субстрату на середовищі з 10 г/л глюкози вище на 10% порівняно з культивуванням на середовищі з 30 г/л глюкози, то у експериментальних штамів на 30-45% порівняно із середовищем з 30 г/л глюкози та на 35-56% з 50 г/л глюкози.

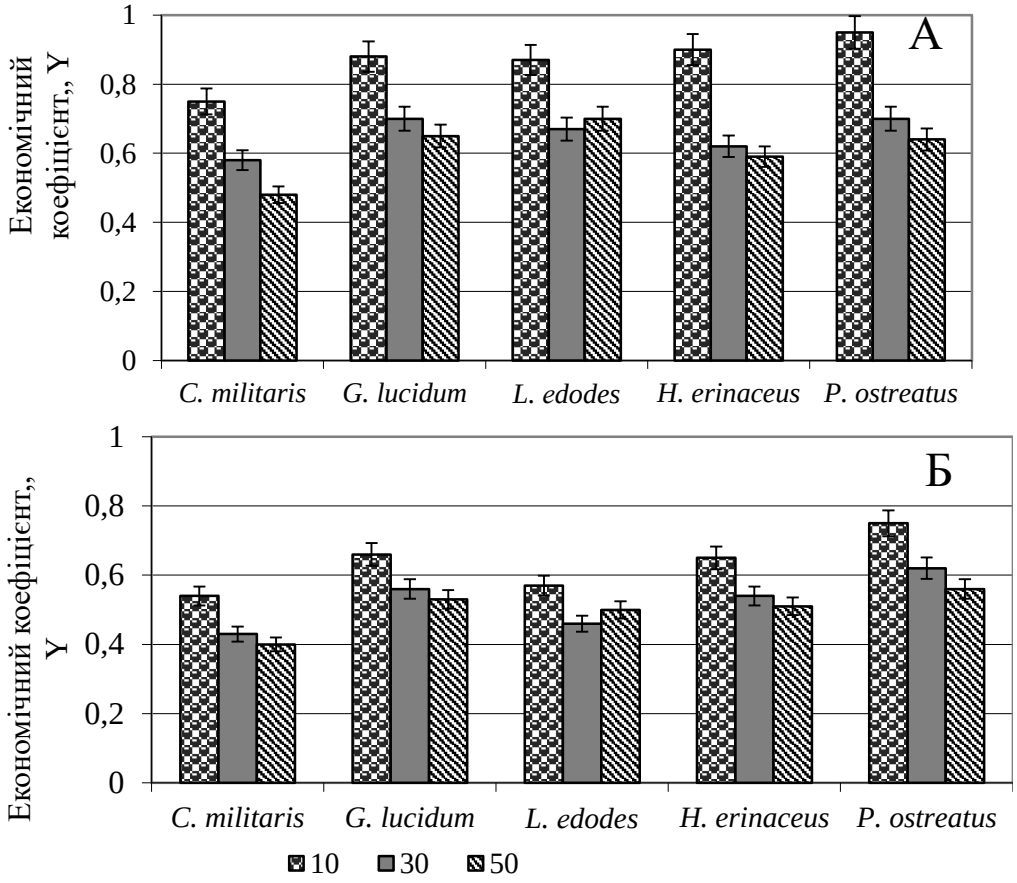

Рис. 6. Ефективність споживання глюкози штамами макроміцетів на середовищах із різними концентраціями глюкози
Примітка: А – опромінені штами, Б – контрольні, без опромінення

Фоточутливість метаболізму азоту в грибів вивчена недостатньо, але деякі дослідники вважають, що може існувати зв'язок між світлом і азотним обміном [Innocenti et al., 1983; Sommer, 1987; Ricci et al., 1991]. Нами проведено вивчення впливу різних концентрацій азоту (1, 3 і 4 г/л) на фотоіндуковану ростову активність макроміцетів. Опромінення здійснювали низькоінтенсивним лазерним світлом з довжиною хвилі 632,8 нм. Дослідження проводили на глюкозопептонному середовищі, яке у якості джерела вуглецю містило 30 г/л глюкози та відповідні концентрації пептону.

Одержані нами результати не показали достовірного впливу концентрації азоту на фотоіндуковану стимуляцію росту макроміцетів. І все ж таки, ми припустили, що концентрація азоту може впливати на реалізацію інших фотоіндукованих змін біологічної активності цих грибів, таких, наприклад, як синтез різних біологічно активних сполук і ферментів, що не завжди корелює з їхньою ростовою активністю.

Інтенсифікація культивування їстівних і лікарських макроміцетів при поверхневому та глибинному культивуванні на рідких поживних середовищах

Нами було встановлено, що короткочасне опромінення посівного міцелію різних макроміцетів світлом низької інтенсивності активізує ріст їхнього вегетативного міцелію, тому ми зробили припущення, що використання фотоактивованого міцелію дозволить скоротити терміни їхнього культивування й збільшити синтез біологічно активних речовин. Дослідження динаміки накопичення біомаси *G. lucidum*, *I. obliquus*, *L. edodes, P. ostereatus* і *H. erinaceus* при глибинному культивуванні встановило, що опромінення посівного міцелію призводить до скорочення лаг-фази і зростання швидкості росту культури і, як наслідок, скорочується період культивування до виходу на стаціонарну фазу росту на 2-4 доби.

Дослідження вчених, які розробляли технології глибинного культивування лікарських макроміцетів з родів *Ganoderma* та *Lentinus,* показали, що зростання кількості біомаси, як правило, супроводжується збільшенням синтезу як екзо-, так і ендополісахаридів [Babitskaya et al., 2000; Puchkova et al., 2001; Tang et al., 2002]. Тому ми припустили, що фотоіндукована стимуляція росту у макроміцетів, які відносяться до аско- та базидіоміцетів, може супроводжуватися збільшенням синтезу полісахаридів. Для перевірки цього припущення дослідження можливості використання світла низької інтенсивності для збільшення синтезу полісахаридів проводили в стаціонарних умовах на рідкому поживному середовищі. Об'єктами досліджень були штами базидіоміцетів *G. lucidum* і *L. edodes*, широко відомих у наш час як продуценти полісахаридів, а також аскоміцети *C. miliaris, C. sinensis, M. conica* та *M. esculenta* як відносно нові об'єкти сучасних біотехнологій [Поединок и др., 2007-2013]. Нами вперше було встановлено, що опромінення посівного міцелію *G. lucidum* і *L. edodes* як когерентним, так і некогерентним світлом низької інтенсивності в усіх використаних діапазонах довжини хвиль спричиняло збільшення синтезу полісахаридів. Достовірна перевага когерентного світла перед некогерентним відмічена при аналізі ростових характеристик (накопичення біомаси) у *G. lucidum* і *L. edodes,* як правило, не супроводжувалась аналогічним додатковим збільшенням синтезу ендополісахаридів (рис. 7).

На особливу увагу заслуговують одержані нами дані про вплив опромінення у використаних в дослідженнях режимах на синтез полісахаридів представниками аскоміцетів. На відміну від базидіоміцетів *G. lucidum* і *L. edodes,* опромінення світлом низької інтенсивності різної когерентності в синьому діапазоні довжини хвиль *C. militaris* і *C. sinensis* індукувало зростання накопичення біомаси, але не змінювало рівня синтезу ендополісахаридів і знижувало кількість екзомеланінів на 30-63% при опромінені світлом усіх довжин хвиль. Аскоміцети *M. conica* та *M. esculenta* виявляли чутливість тільки до червоного світла, яке викликало стимуляцію як росту, так і синтезу полісахаридів.

Імпульсне світло виявилося більше ефективним, ніж безперервне тієї ж довжини хвилі й когерентності для стимуляції синтезу екзополісахаридів у *G. lucidum, L. edodes, M. conica.* У *C. militaris* і *C. sinensis* він також пригнічував синтез полісахаридів, як і безперервний.

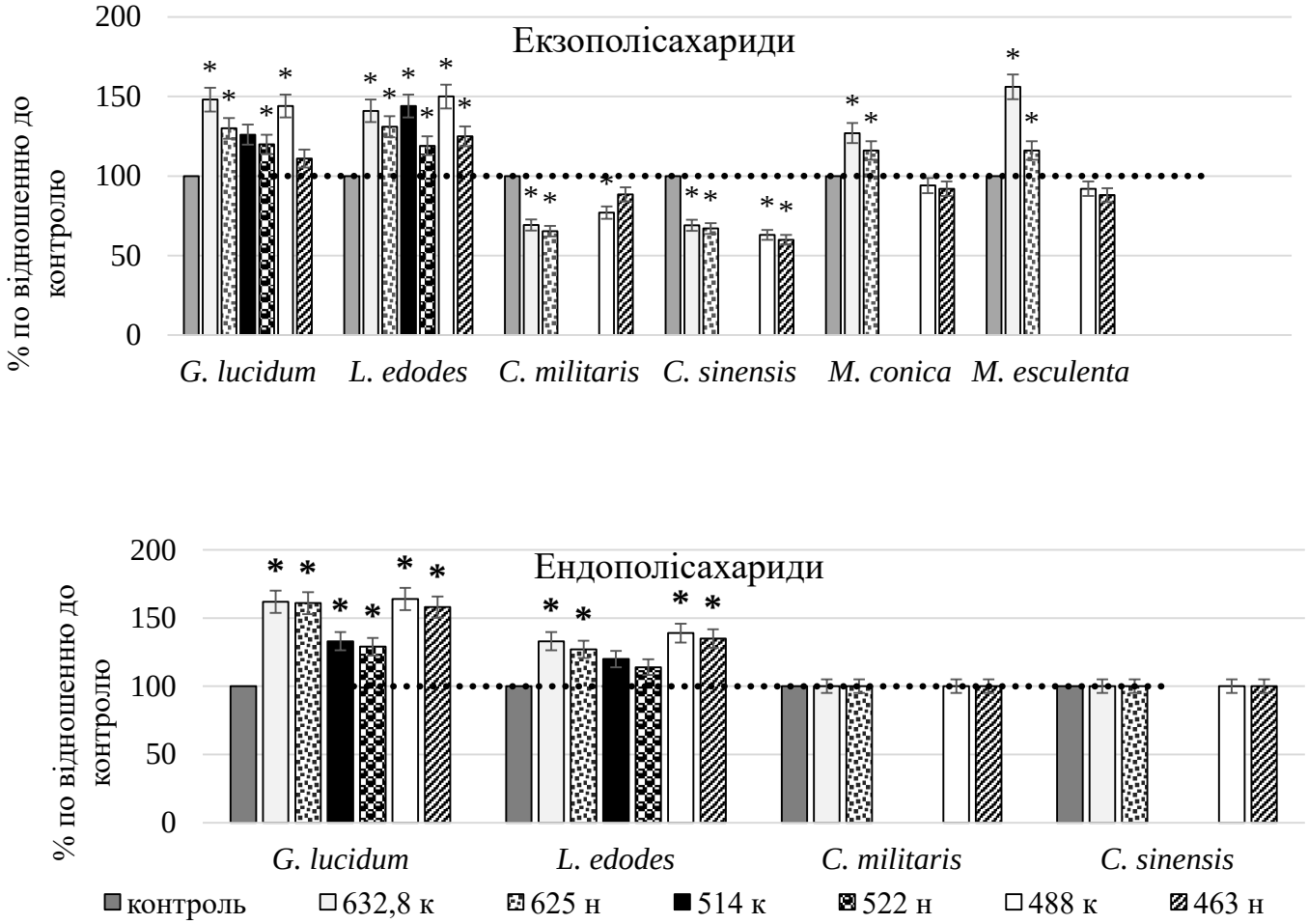

Рис. 7. Вплив світла низької інтенсивності на біосинтез полісахаридів
Примітка: * – зазначено статистично достовірні відмінності по відношенню до контролю ($p < 0,05$), результати представлені, як M±n, n = 4-5

Нами показано, що короткочасне опромінення посівного міцелію низькоінтенсивним світлом значно впливає на процентне співвідношення вуглеводів як в екзо-, так і в ендополісахаридах у вивчених нами представників різних класів макроміцетів: базидіоміцетів *G. lucidum* і *L. edodes* та аскоміцетів *C. sinensis* і *C. militaris* (табл. 5). Залежність цього показника від способу культивування підтверджується одержаними нами даними. Вони свідчать, що трансформація світлової енергії, яку поглинали грибні клітини, в значній мірі визначається подальшими умовами вирощування гриба. Представлені види, відповідно до характеру фотоіндукційної зміни співвідношення їхніх основних мономерів у полісахаридах, можна чітко розділити на дві групи: *G. lucidum* і *L. edodes* (базидіоміцети) та *C. sinensis* і *C. militaris* (аскоміцети). У базидіоміцетів *G. lucidum* та *L. edodes* фотоіндукована активність посівного міцелію при поверхневому культивуванні проявляється у збільшенні процентного вмісту галактози в полісахаридах та зниженні рівня маннози, а при глибинному культивуванні відмічено зворотнє співвідношення цих вуглеводів. У аскоміцетів *C. militaris* і *C. sinensis* основні відмінності біохімічних реакцій на аналогічні режими світлових впливів від представників базидіоміцетів проявляються на рівні ендополісахаридів,

що виражається у зменшенні частки галактози при поверхневому та маннози при глибинному культивуванні.

Таблиця 5

Порівняльний аналіз зміни вуглеводного складу полісахаридів у різних видів макроміцетів після опромінення

Вид		Полі-сахариди	Спосіб культивування					
			поверхневе			глибинне		
			галактоза	манноза	глюкоза	галактоза	манноза	глюкоза
Базидіоміцети	*G. lucidum*	Екзо-	∧	∨	—	∨	∧	∨
		Ендо-	∧	∨	—	∨	∧	∨
	L. edodes	Екзо-	∧	∨	—	∨	∧	∨
		Ендо-	∧	∨	—	∨	∧	∨
Аскоміцети	*C. militaris*	Екзо-	∧	∨	∧	∨	∧	∨
		Ендо-	∨	∨	∧	∧	∨	∧
	C. sinensis	Екзо-	∧	∨	∧	∨	∧	∨
		Ендо-	∨	∨	∧	∨	∨	∧

Примітка: (∧) – збільшенні кількості вуглеводу; (∨) – зменшення кількості вуглевода; (—) – відсутність достовірних змін.

Відомо, що адаптація різних мікроорганізмів до різних екологічних факторів супроводжується відповідними змінами жирнокислотного складу клітинних ліпідів, що обумовлено змінами в проникності їхніх мембран, метаболізмі жирних кислот і активності перекісних процесів [Weete,1979; Феофилова, 1985; Merja, 1995; Stahl, 1996]. Тому нами була висунута гіпотеза, що одним з механізмів, який забезпечує здатність грибів до фоторецепції світла різного типу, є відповідні зміни в їхньому жирнокислотному профілі та в ступені ненасиченості клітинних ліпідів. Вона базувалась на теорії про те, що одним з важливих компонентів окислювально-відновної системи клітини є ненасичені жирні кислоти клітини, що являють собою субстрат для додаткового створення вільних радикалів у клітині під дією опромінення. Для перевірки цієї гіпотези було проведено дослідження впливу опромінення на зміну жирнокислотного профілю *C. militaris*, *C. sinensis* і *G. lucidum* як перспективних об’єктів сучасної біотехнології. Аналіз одержаних результатів дозволив вперше для макроміцетів встановити загальну тенденцію до зниження коефіцієнта ненасиченості жирних кислот у міцелії при використанні фотоактивованного інокулюму (табл. 6). Утім, вміст ненасичених жирних кислот залишається вище насичених, що є важливим при створенні комерційних препаратів на основі цих грибів [Макаренко и др., 2012].

Таблиця 6

Вплив опромінення на жирнокислотний склад ліпідів макроміцетів

Вид	Насиченість	Контроль	632,8 нм	488,0 нм
C. militaris	$\sum_1/\sum_2$	3,87	2,28	2,49
	К ненасиченості	**1,48**	**1,20**	**1,28**
C. sinensis	$\sum_1/\sum_2$	2,28	2,93	1,62
	К ненасиченості	**0,98**	**0,81**	**0,74**
G. lucidum	$\sum_1/\sum_2$	8,09	3,5	4,3
	К ненасиченості	**1,69**	**1,51**	**1,49**

Встановлено, що низькоінтенсивне світло у видимій частині спектра може бути використано в біотехнології глибинного культивування *I. obliquus*, відомого продуцента меланіну. Виявлена позитивна кореляція між накопиченням біомаси міцелію та синтезом меланіну (рис. 8).

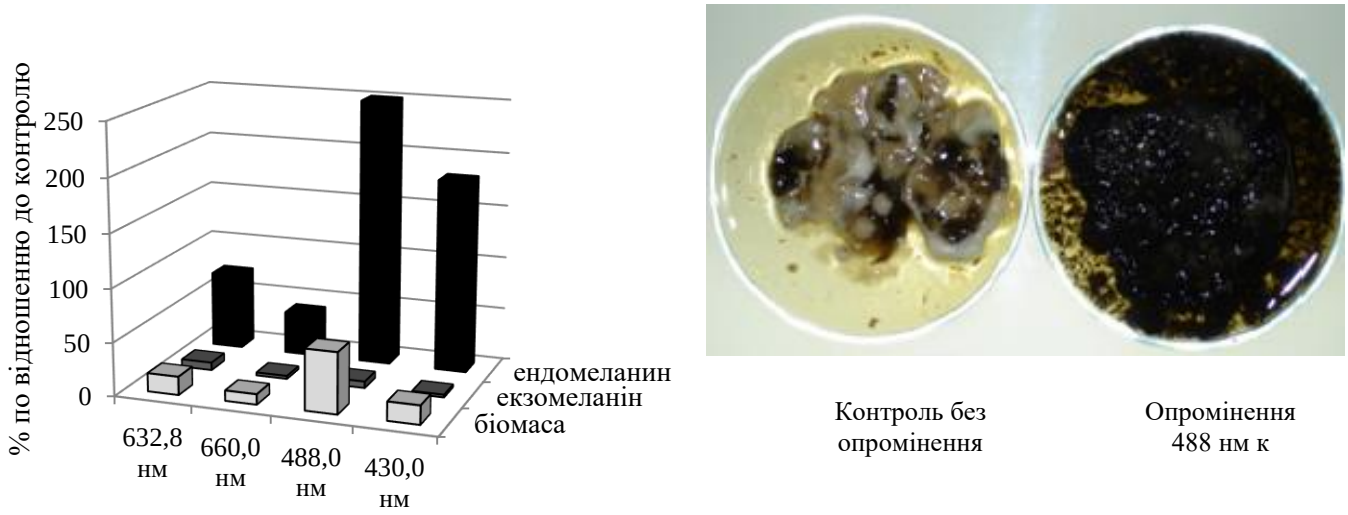

Рис. 8. Вплив світла низької інтенсивності на ріст і синтез меланіну *I. obliquus*

Максимальну стимуляцію росту, яка виражалася у зростанні біомаси міцелію, спричиняло опромінення посівного матеріалу синім когерентним світлом – 56,9% по відношенню до контролю. При цьому кількість ендомеланіну зростала на 250,0%. Опромінення некогерентним світлом тієї самої довжини хвилі було менш ефективним – збільшення біомаси становило 17,6%, а ендомеланіну – 181,0%. Стимулююча активність червоного світла була значно нижчою. Фотоіндуковане збільшення синтезу екзомеланіну було незначним і складало всього 2,5-7,2%. Вивчення динаміки накопичення меланіну показало, що його синтез досягає стаціонарної фази після опромінення лазерним світлом з довжиною хвилі 488 нм на 9-у добу, тоді як у контролі та за інших режимів опромінення на 12-у добу культивування переходу в стаціонарну фазу не було відмічено. Таким чином,

опромінення посівного матеріалу в указаному режимі дозволило не тільки значно збільшити вихід біомаси і меланіну, але й скоротити час культивування. Використання імпульсного світла з довжиною хвилі 632,8 і 488 нм дозволило одержати додатковий стимулюючий ефект порівняно з безперервним опроміненням у тих самих діапазонах довжини хвиль, який виражався в збільшенні виходу меланіну на 67 и 26% відповідно.

Оскільки деякі дослідники вважають, що світло може впливати на метаболізм азоту у грибів [Innocenti et al., 1983; Sommer et al., 1987; Ricci et al., 1991; Correa et al., 2003], ми припустили, що концентрація азоту може впливати на фотоіндукцію біосинтетичної активності *I. obliquus.* Для перевірки цієї гіпотези ми вивчали біосинтетичну активність цього макроміцета на середовищах з різними концентраціями азоту (2 і 4 г/л пептону). Встановлена достовірна залежність фотостимуляції синтезу меланіну від концентрації джерела азоту в середовищі. Зниження концентрації азоту збільшує стимулюючий ефект НІЛВ з довжиною хвилі 488 нм більше, ніж у 2 рази (рис. 9).

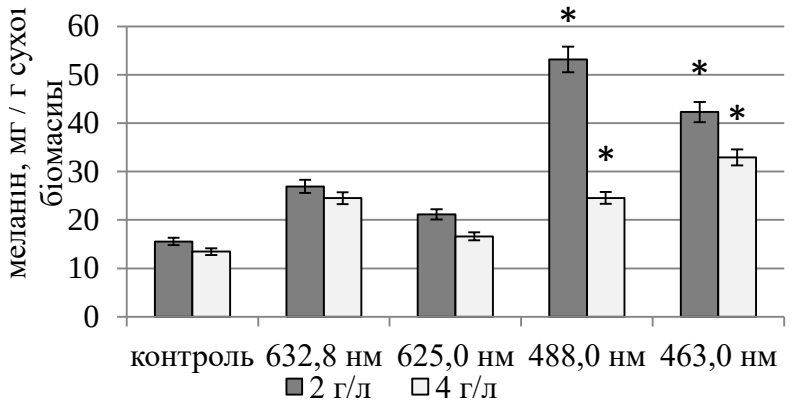

Рис. 9. Вплив концентрації джерела азоту на фотоіндукцію меланіну *I. obliquus*
Примітка: * – зазначено статистично достовірні відмінності накопичення меланіну на середовищах з різними концентраціями азоту ($p < 0,05$), результати представлені, як M±n, n = 4-5

Дослідження ферментативної активності макроміцетів є одним з важливих підходів для розуміння їх фізіологічних, біохімічних особливостей для подальшого використання їхнього багатообіцяючого потенціалу. Інформація про ферментативну активність *I. obliquus*, включаючи антиоксидантні ферменти та ферменти, які відповідають за синтез пігментів, майже відсутня. Меланіногенез регулюється ферментами, такими як тирозиназа та поліфенолоксидаза [Chen et al., 2005]. Головними ферментами, які забезпечують антиоксидантний захист клітин і підтримання концентрації активних форм кисню на фізіологічному рівні, є каталази та пероксидази, що розкладають пероксид водню [Gaetani et al., 1996; Ruis et al., 1997]. Особливо цікавим було вивчення впливу низькоінтенсивних короткочасових світлових дій на активність ферментів, що каталізують синтез меланіна, поза- та внутрішньоклітинних поліфенолоксидази та тирозинази. Максимальний стимулюючий ефект на активність як поза-, так і внутрішньоклітинних ферментів мало синє когерентне світло. Опромінення збільшувало активність внутрішньоклітинних поліфенолоксидази та тирозинази в 25 та 27 разів, а позаклітинних – у 6 и 2 рази відповідно. Однак достовірної зміни співвідношення цих ферментів не спостерігається (внутрішньоклітинна тирозиназа:

внутрішньоклітинна поліфенооксидаза = 1 : 10). Ці обидва ферменти беруть участь у синтезі меланіну і в нормі функціонують взаємозв'язано. Очевидно, що для нормального метаболізму суттєвим є збереження певного співвідношення між активностями цих ферментів. Відмічена позитивна кореляція між активністю ферментів, що регулюють меланіногенез, та синтезом меланіну. Вивчення активності ферментів, які здійснюють антиоксидантний захист клітин, після опромінення посівного міцелію в різних діапазонах довжин хвиль й когерентності дозволило встановити, що як синє, так і червоне світло із лазерних джерел і LED інгібували активність позаклітинної пероксидази. У той же час когерентне світло збільшувало активність внутрішньоклітинної пероксидази в 15-20 разів. Опромінення *I. obliquus* когерентним світлом як в синьому, так і червоному діапазонах довжин хвиль, навпаки, збільшувало активність позаклітинної каталази в 30 разів по відношенню до контролю, тоді як некогерентне світло не викликало значних змін. Світлові впливи у досліджуваних режимах практично не змінювали активності внутрішньоклітинної каталази.

В цілому, одержані нами результати з впливу низькоінтенсивного опромінення на активність ферментів *I. obliquus* вписуються в сучасні уявлення про універсальні механізми фоторегуляції живих організмів [Karu, 2008, 2011], згідно з якими фотохімічні реакції обумовлені збудженням електронів у атомах поглинаючої світло речовини. На молекулярному рівні це виражається у вигляді фотоіонізації речовини, її відновлення чи фотоокислення, фотодисоціації молекул, у їх перебудові – фотоізомеризації. Світло вибірково поглинається пігментною речовиною, що знаходиться у клітинах. Меланін поглинає світло найбільш активно в синьо-фіолетовій області, каталаза, порфирин та його похідні – в червоній [Зубкова, 1978]. Згідно із сучасними нам гіпотетичними моделями механізму дії фітохрома на молекулярному рівні, первинні відповіді реакції, спричинені сигналами фітохромів, пов'язані зі зміною мембранної проникності, а вторинні — з активацією хромосомного апарату та ферментативною активністю [Цыганкова и др., 2004; Neff et al., 2000]**.**

Деякі дослідники вважають, що у рослин стимуляційний ефект НІЛВ проявляється більш контрастно за умов лімітації джерел живлення та кисню [Иванов и др., 2001]. Вони пов'язують антистресорну дію когерентного опромінення із зростанням активності дихальних ферментів (супероксидмутази, пероксидази, каталази та ін.). Нами вперше встановлено, що використання живильних середовищ із зниженим вмістом джерела азоту доцільно для підвищення фотоіндукованого стимулюючого ефекту при одержанні позаклітинної каталази, тирозинази та поліфенолоксидази, внутрішньоклітинної пероксидази.

Оскільки вивчення впливу короткочасового опромінення міцелію *I. obliquus* світлом із різними характеристиками на меланіногенез і активність ферментів установило значну різноманітність реакцій на такі впливи, де один і той самий режим опромінення, який стимулював синтез одних ферментів, був індиферентний або пригнічував синтез інших, параметри й режими світлової обробки посівного міцелію слід корегувати в співвідношенні із цільовими біологічно активними компонентами. Механізми регуляції метаболічних шляхів біоактивних компонентів

за допомогою світла з різними діапазонами довжин хвиль і когерентності мають бути об’єктом систематичного контролю в залежності від конкретних біотехнологічних завдань.

Вперше проведено вивчення впливу світла низької інтенсивності на антимікробну активність макроміцетів і можливість його використання для інтенсифікації технологічних етапів культивування грибів-продуцентів антимікробних компонентів і збільшення виходу кінцевого продукту. Об’єктами дослідження були 4 штами з 4 видів базидіальних грибів: *F. velutipes* 3923, *P. ostreatus* 531, *G. lucidum* 1908 і *G. applanatum* 1552. Встановлено, що низькоінтенсивне світло з енергією 230 мДж/см^2, одержане з лазерних і світлодіодних джерел, значно впливає на антимікробну активність *F. velutipes, P. ostreatus, G. lucidum* і *G. applanatum* при глибинному культивуванні (рис. 10).

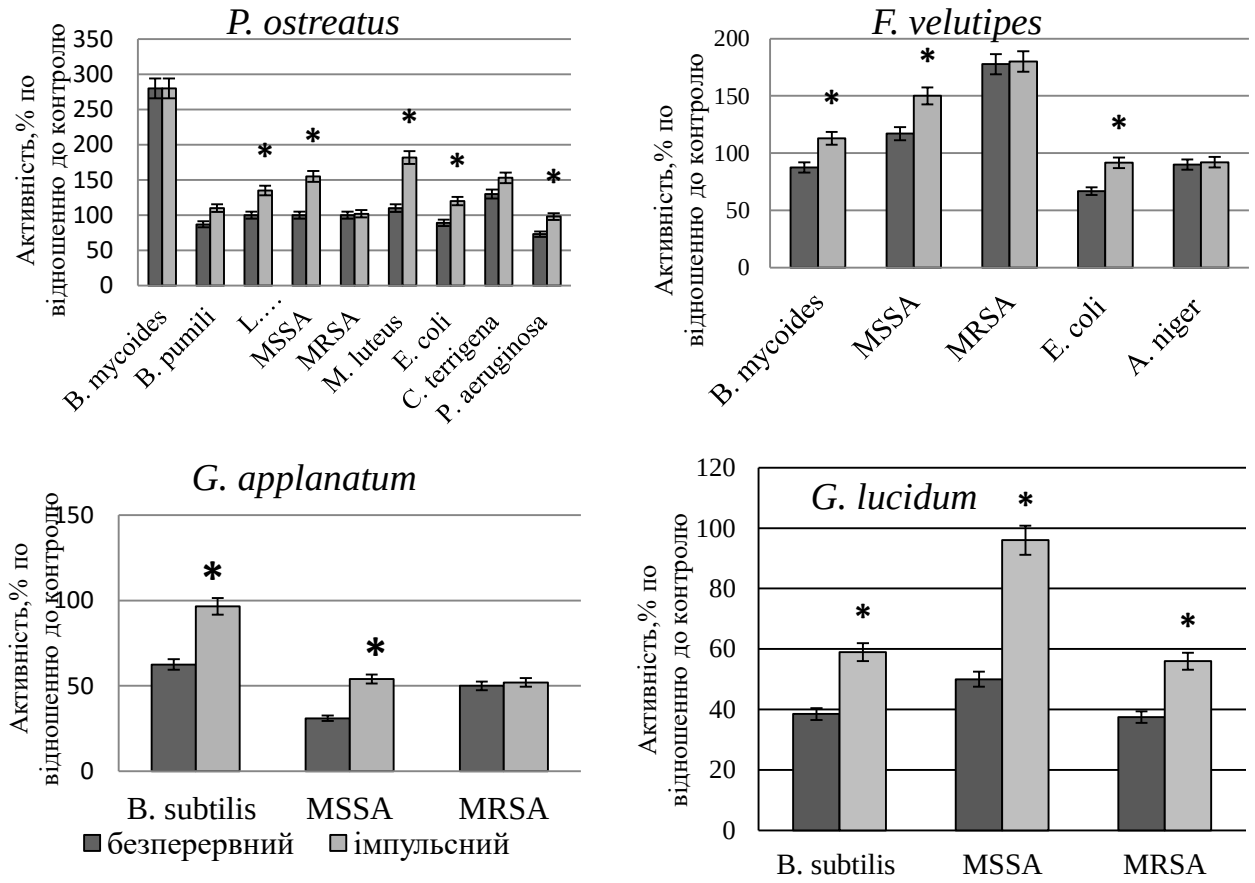

Рис. 10. Вплив безперервного та імпульсного опромінення (632,8 нм) на антимікробну активність макроміцетів

Примітка: * – зазначено статистично достовірні відмінності по відношенню до опромінення безперервним світлом ($p < 0,05$), результати представлені, як M±n, n = 4-5

Короткочасне опромінення посівного міцелію в червоному й синьому діапазонах довжин хвиль сприяло скороченню періоду культивування до появи антимікробної активності. Когерентне (лазерне) світло мало великий стимулюючий ефект порівняно з некогерентним (LED). Опромінення ним у заданих режимах збільшувало інгібуючу активність культуральної рідини по відношенню до різних

тест-культур для *F. velutipes* на 60-150%, *P. ostreatus* – 100-238%, *G. applanatum* – 30-87% та *G. lucidum* – 30-70%. Однак використання світлодіодних джерел дозволило одержати досить високі показники антимікробної активності у *P. ostreatus* (37-180%) і *F. velutipes* (20-100%). Діаметри пригнічення росту бактерій зростали до 72% при опроміненні імпульсним світлом порівняно із безперервним. Це, поза сумнівом, свідчить на користь його використання в біотехнологіях культивування макроміцетів для підвищення активності антимікробних компонентів.

Таким чином, проведені нами дослідження фоточутливості макроміцетів до світла низької інтенсивності з різними характеристиками дозволили встановити загальні закономірності та індивідуальні особливості їхніх реакцій на світлові дії і визначити ефективні параметри світлової обробки, які дозволяють одержувати найбільшу стимуляцію росту й цілеспрямовано регулювати біологічну активність.

Інтенсифікація технологічних процесів твердофазного культивування макроміцетів

Аналіз досвіду використання штучного світла для стимуляції біологічних процесів у рослинництві та грибництві показав, що він обмежений методами, які ґрунтуються на постійному освітленні культур на різних стадіях морфогенезу. Останнє потребує встановлення спеціального освітлення на великих площах, додаткових витрат енергії та обслуговування. Тоді як дослідження, проведені на клітинах різних біологічних об’єктів, показали, що короткочасне опромінення (від долей секунди до десятків хвилин) низькоінтенсивним світлом у відносно малих дозах (10^2-10^3 Дж/м^2) сприяє макроефекту, який довго зберігається [Кару, 2008]. Тому нами вперше були розроблені нові методи фотоінтенсифікації технологічних процесів поверхневого культивування макроміцетів на твердих субстратах шляхом короткочасного опромінення посівного матеріалу світлом низької інтенсивності на прикладі *P. ostereatus, L. edodes, F. velutipes*, *H. erinaceus* і *C. militaris*, які мають низку переваг порівняно із раніше відомими [Nanba et al., 2002; Abe, 2007; Masuno, 2010; Miyazaki et al., 2011; Myoung-Jun, 2011]. Для цього нами проводилось дослідження ефективності використання посівного матеріалу, активізованого шляхом короткочасного опромінення світлом низької інтенсивності для збільшення швидкості обростання ними субстратів. Враховувались тривалість процесів формування примордіїв, кількість і габітус плодових тіл, урожайність і динаміка плодоношення.

Повне обростання субстратних блоків *L. edodes* скорочувалось на 20 діб при використанні світла низької інтенсивності в червоному й зеленому діапазонах довжини хвиль і на 30 діб при використанні синього світла, одержаного як із лазерного джерела, так і LED. Активізація посівного міцелію *P. ostreatus* у всіх режимах опромінення, а *F. velutipes* в синьому діапазоні довжини хвиль і червоному

(лазерний), дозволило скоротити час інкубації до повного обростання субстрату на 5 діб. Опромінення посівного матеріалу *H. erinaceus* червоним і синім світлом різної когерентності дало можливість скоротити вказаний етап культивування на 10 діб (табл. 7).

Таблиця 7

Режими активації посівного міцелію макроміцетів для стимуляції росту і плодоношення

Вид	Світлодіоди			Лазери		
	625 нм	522 нм	463 нм	632,8 нм	514,5 нм	488 нм
A. bisporus	▲(19/-)	**O**	**O**	▲(19/-)	**O**	**O**
F. velutipes	**O**	**O**	50/6	▲57/8	**O**	▲63/12
H. erinaceus	▲57/14	**O**	▲57/12	47/14	**O**	▲55/15
L. edodes	48/30	**O**	▲67/35	53/30	**O**	▲75/40
P. ostreatus	36/6	**O**	▲50/5	▲50/6	41/4	▲56/6

Примітка: ▲ – значний стимулюючий ефект; **O** – стимулюючий ефект незначний або відсутній; % збільшення врожайності / скорочення тривалості культивування (доба)

У ході вивчення процесу формування плодоношення у цих макроміцетів встановлено більш ранній початок плодоношення на субстратах, інокульованих міцелієм, активізованим за різних режимів опромінення. У *L. edodes* плодоношення починалось на 35-40 діб раніше при використанні для стимуляції ростових процесів синього світла, на 30 діб – червоного та на 10-15 діб – зеленого. У *P. ostreatus* період до початку плодоношення, в залежності від режиму активізації посівного матеріалу, скорочувався на 4-6 діб, у *H. erinaceus* – на 11-15 діб, у *F. velutipes* – на 4-12 і у *C. militaris* – на 10-14 (рис. 11 і 12).

На основі вивчення характеру обростання субстрата, інокульованого різними дозами опроміненого й неопроміненого міцелію *A. bisporus* і *P. ostereatus*, встановлено, що передпосівна обробка зернового міцелію світлом дозволяє не тільки (як мінімум у 2 рази) знизити кількість посівного міцелію, доданого у субстрат, але при цьому й збільшити врожайність плодових тіл. Урожайність *P. ostereatus* збільшується вже при мінімальній дозі внесення опроміненого міцелію (1,2%) порівняно із максимальною дозою внесення неопроміненого міцелію (5%) і становить 27,1 і 20,6% відповідно. При 5%-ній інокуляції опроміненим міцелієм урожайність зростає на 43%, а при 1,2%-ній інокуляції опроміненим міцелієм – на 60% порівняно із тими самими дозами неопроміненого міцелію (табл. 8).

Рис. 11. Ріст *F. velutipes* після опромінення посівного міцелію синім світлом (30 доба).

Рис. 12. Ріст макроміцетів після опромінення посівного міцелію
Примітка: *P. ostreatus* – 25 доба; *L. edodes* – 120 доба; *C. militaris* – 70 доба.

Таблиця 8

Вплив дози внесення посівного матеріалу на врожайність *P. ostreatus* та *A. bisporus*

P. ostreatus			*A. bisporus*		
Кількість посівного міцелію, %	Урожайність, %		Кількість посівного міцелію, %	Урожайність, %	
	контроль	опромінення 625 нм		контроль	опромінення 625 нм
5	20,6	29,5	0,3	21,1	25,0
2,5	18,4	27,9	0,15		25,0
1,2	16,9	27,1			

У *A. bisporus* відмічено зростання кількості плодових тіл гриба першого сорту на 18,0% при інокуляції компосту стандартною дозою опроміненого міцелію та на 8,6% при інокуляції половиною стандартної дози опроміненого міцелію. Таким чином, світло низької інтенсивності може виступати як стимулятор біологічної активності не тільки у видів грибів, що здійснює формування плодових тіл за умов чергування темноти й світла, але й таких як, наприклад, *A. bisporus*, який не потребує світла на жодній стадії онтогенезу.

Результати короткочасного впливу світла низької інтенсивності з різними спектральними характеристиками на розвиток макроміцетів продемонстрували пролонгованість фотоіндукційної стимуляції їхньої ростової активності, яка передавалась від спор до міцелію, аж до формування плодових тіл, що підтверджує доцільність використання такого підходу для модифікації існуючих біотехнологій твердофазного культивування.

Розроблені методи не менш ефективні й економічні, ніж методи фотостимуляції біологічної активності макроміцетів шляхом тривалого освітлення на різних стадіях онтогенезу, які пропонують інші дослідники [Nanba, et. al., 2002; Abe, 2007; Masuno, 2010], оскільки не потребують устаткування приміщення спеціальними системами освітлення, додаткових площ для їхнього розміщення, енерговитрат і обслуговуючого персоналу. Висока ефективність впровадження розроблених нами способів і підходів фотоактивації посівного матеріалу та його використання в технологіях культивування макроміцетів, крім сказаного вище, досягається за рахунок таких встановлених нами фактів:

- перспективність використання енергоефективних систем опромінення на основі світловипромінюючих діодів, які дозволяють одержувати показники стимуляції росту й розвитку макроміцетів, порівняно з використовуваними для тих самих цілей більш дорогих і менш доступних джерел лазерного світла;
- скорочення термінів обростання субстрату й тривалість періоду плодоношення (*F. velutipes* – на 6-12 діб, *H. erinaceus* – на 12-15 діб, *L. edodes* – на 30-40 діб і *P. ostreatus* – на 4-6 діб), що дозволяє скоротити витрати на підтримку мікроклімату приміщення й зменшити вірогідність інфікування субстратів сторонньою мікрофлорою;
- зменшення кількості опроміненого посівного міцелію при інокуляції скорочує кількість зерна й трудовитрати на його приготування;
- збільшення врожайності плодових тіл *F. velutipes* – на 50-63%, *H. erinaceus* – на 47-57%, *L. edodes* – на 67-75%, *P. ostreatus* – на 40-56% і *A. bisporus* – на 10-19%;
- поліпшення якості і товарного виду плодових тіл (збільшення плодових тіл першого сорту в *A. bisporus* на 18%) підвищить їхню вартість.

ВИСНОВКИ

Розроблено новий напрямок використання штучного світла низької інтенсивності в біотехнології культивування їстівних і лікарських грибів. Встановлено, що короткочасне низькоінтенсивне випромінювання у видимій частині спектра стимулює ростову та біосинтетичну активність макроміцетів, яка має пролонговану дію, охоплюючу подальші онтогенетичні стадії від спор до

міцелію. На основі цього запропоновані високоефективні методи цілеспрямованої регуляції біосинтетичної активності макроміцетів і біотехнологічної інтенсифікації різних етапів їхнього вирощування за допомогою світла низької інтенсивності різної когерентності та спектрального складу, які дозволяють індукувати проростання спор, скоротити терміни культивування, зменшити кількість посівного матеріалу при інокуляції субстратів, збільшити вихід біомаси та біологічно активних компонентів при глибинному культивуванні і врожайність плодових тіл та їхню якість при твердофазному вирощуванні.

Основні результати роботи подані у таких висновках:

1. Розроблені наукові основи дослідження фоточутливості макроміцетів на різних стадіях онтогенезу до світла низької інтенсивності у видимому діапазоні довжини хвиль з різними спектральними, енергетичними характеристиками, з максимально точно визначеними параметрами. В процесі експериментального вивчення показані можливості використання економічних джерел випромінювання на основі твердотілих світлодіодів для стимуляції біологічної активності макроміцетів.
2. За результатами вивчення фоточутливості макроміцетів до світла низької інтенсивності з різними характеристиками визначена специфіка реакцій макроміцетів відділів *Ascomycota* та *Basidiomycota* на опромінення безперервним та імпульсним світлом різної когерентності та довжини хвиль. Встановлено, що синє і червоне світло різної когерентності викликє стимуляцію росту різної інтенсивності у всіх вивчених базидіальних макромицетов і у аскомицета *Cordyceps militaris*. Експериментально визначені ефективні параметри світлової обробки, що дозволяє отримувати найбільший стимулюючий ефект на ростову активність.
3. Вперше для макроміцетів встановлена перевага використання низькоінтенсивного лазерного випромінювання замість некогерентного світла низької інтенсивності та імпульсного світла різної когерентності порівняно із безперервним для стимуляції росту, антимікробної та ферментативної активності, синтезу меланіну і полісахаридів, яка виражається в додатковому підвищенні ростових показників і виходу біологічно активних речовин (10-150%).
4. Встановлена пролонгованість змін ростової активності спор і вегетативного міцелію макроміцетів, викликаних короткочасним опромінюванням світлом низької інтенсивності, які передаються на наступні фази онтогенезу та не потребують подальшої активізації світлом.
5. З’ясована динаміка фотоіндукованї активності посівного міцелію при зберіганні і послідовних пересівах. Показано, що швидкість росту активованого міцелію знижується до рівня контролю вже через 72 год його зберігання після опромінення і через два послідовних пересіви в усіх штамів макроміцетів.
6. Встановлено, що реалізація фотостимулуюючого впливу залежить від способу культивування макроміцетів і складу поживного середовища. Короткочасне опромінення світлом низької інтенсивності викликає зміну трофіки макроміцетів, яка виражається в збільшенні ефективності споживання джерела вуглецю на 25-46%.

7. Вперше для *Inonotus obliquus* експериментально доведена доцільність використання поживних середовищ із зниженим вмістом азоту для підвищення фотоіндукованого стимулюючого ефекту при отриманні меланіну, поліфенолоксидази, позаклітинних каталази і тирозинази, а також внутрішньоклітинної пероксидази. Показано, що зниження в 2 рази концентрації азоту в середовищі для культивування дозволяє більш ніж в 2 рази збільшити вихід меланіну та в 10 разів підвищити активність позаклітинної каталази порівняно з контролем. Відмічена позитивна кореляція між активністю ферментів, які регулюють меланіногенез, та синтезом меланіну.

8. Виявлені зміни у жирнокислотному профілі міцелію макроміцетів після опромінення світлом низької інтенсивності, котрі полягають у зменшенні кількості ненасичених жирних кислот. Визначена висока ефективність використання лазерного світла з довжинами хвиль 488,0 і 632,8 нм для стимуляції синтезу *Cordyceps militaris* поліненасиченої пальмітолеїнової кислоти (збільшення в 6-7 разів порівняно з неопроміненим контролем) та *Cordyceps sinensis* – мононенасиченої незамінної олеїнової кислоти (збільшення на 64%), які мають практичне значення в медицині і косметології.

9. Встановлено, що короткочасне опромінення посівного міцелію низькоінтенсивним світлом значно впливає на процентне співвідношення вуглеводів як в екзо-, так і ендополісахаридах у *Cordyceps militaris, C. sinensis, Ganoderma lucidum* і *Lentinus edodes*. Продемонстровані раніше невідомі тенденції до зміни вуглеводного складу полісахаридів під дією короткочасних світлових впливів у макроміцетів, які відносяться до аско- та базидіоміцетів, що дозволяє висловити припущення про специфіку фоторецепторних систем макроміцетів цих таксонів.

10. Встановлена перспективність використання світла низької інтенсивності різної когерентності в червоному та синьому діапазонах довжини хвиль для регуляції антимікробної активності *Flammulina velutipes, Pleurotus ostreatus, Ganoderma lucidum* і *G. applanatum.* Короткочасне опромінення посівного міцелію у встановлених режимах скорочує період культивування міцелію грибів до появи антимікробної активності (до 7 діб) і підвищує інгібіторну активність культуральної рідини по відношенню до різних тест-культур для *Flammulina velutipes* на 60-150%, *Pleurotus ostreatus* - 100-238%, *Ganoderma applanatum* - 30-87% і *G. lucidum* - 30-70%. Діаметри зон пригнічення росту бактерій при використанні імпульсного світла збільшуються до 72%, в порівнянні з безперервним.

11. Продемонстровано перспективність фотоактивації посівного матеріалу *Pleurotus ostreatus, Lentinus edodes, Flammulina velutipes, Hericium erinaceus* і *Agaricus bisporus* для інтенсифікації біотехнологічних засад отримання плодових тіл. Розроблено методи, які дозволяють підвищити врожайність плодових тіл на 10-75% та поліпшити їх якість і товарний вигляд. Експериментально доведено, що світло низької інтенсивності може виступати як стимулятор біологічної активності не тільки у грибів, що потребують світла на етапі формування плодових тіл, але й для такого вида, як *Agaricus bisporus*, у якого всі етапи плодоутворення проходять при відсутності світла.

12. Встановлені ефективні режими використання світлодіодних джерел для індукції проростання спор *Agaricus bisporus, Flammulina velutipes, Ganoderma lucidum, Inonotus obliquus, Lentinus edodes* та *Pleurotus ostreatus,* для стимуляції росту *Cordyceps militaris, Flammulina velutipes, Ganoderma applanatum, G. lucidum, Hericium erinaceus, Lentinus edodes, Morchella conica, M. esculenta* та *Pleurotus ostreatus*, підвищення антимікробної активності *Flammulina velutipes, Ganoderma applanatum, G. lucidum* та *P. ostreatus*, для активності позаклітинної тирозинази , полііфенолоксидази і синтезу меланінів у *Inonotus obliquus*, полісахаридів у *Ganoderma lucidum, Lentinus edodes, Morchella conica* та *M. esculenta.*

13. Розроблені наукові засади використання світла низької інтенсивності в сучасних мікобіотехнологіях для підвищення продуктивності процесу культивування.

ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ

1. Розроблена технологія використання світла низької інтенсивності у видимому діапазоні довжин хвиль для стимуляції росту та регуляції біосинтетичної активності їстівних і лікарських макроміцетів: *Agaricus bisporus, Lentinula edodes, Flammulina velutipes, Hericium erinaceus, Pleurotus ostreatus, Inonotus obliqus, Ganoderma applanatum, Ganoderma lucidum, Cordyceps militaris, Cordyceps sinensis, Morchella esculenta* і *Morchella conica* може бути запропонована для використання в біотехнологічній практиці та грибівництві для скорочення тривалості культивування, зменшення кількості посівного матеріалу, регуляції ферментативної активності, збільшення накопичення біомаси та підвищення врожайності плодових тіл грибів, синтезу меланіну, полісахаридів і жирних кислот, при розмноженні цінного посівного матеріалу.

2. Розроблений метод фотоіндукції проростання спор може застосовуватись при експериментальних дослідженнях в галузі генетики та фізіології грибів, прискореному виведенні нових штамів-продуцентів, відновленні в культурі різних видів макроміцетів та інтродукції їх в природні місця існування для збереження біорізноманіття.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Статті у фахових та міжнародних журналах:

1. Poyedinok N. L. Stimulation with low-intensity laser light of basidiospore germination and growth of monocaryotic isolates in Medicinal Mashroom *Hericium erinaecus* (Bull.: Fr.) Pers. (*Aphyllophoromycetideae*) / N. L. Poyedinok, J. V. Potemkina, A. S. Buchalo, A.M. Negriyko, A.Ph. Grygansky // Int. J. Med. Mushr. – 2000. − V. 2, N 4. – P. 339−342. (*Особистий внесок дисертанта: ідея роботи, участь у плануванні і проведенні експериментальних досліджень, самостійний аналіз та узагальненні результатів, написання статті*).

2. Поєдинок Н. Л. Проростання базидіоспор їстівного гриба *Hericium erinaceus (Bull. Fr.) Pers.* (*Aphyllophoromycetideae*) за різних умов зберігання / Н. Л. Поєдинок // Укр. ботан. журн. − 2002. − Т. 59, № 3. − С. 304−308. (*Особистий внесок дисертанта: ідея роботи, самостійне планування і проведення*

експериментальних досліджень, аналіз та узагальнення результатів, написання статті).

3. Poyedinok N.L. The action of argon and helium-neon laser radiation on growth and fructification of culinary-medicinal mushrooms *Pleurotus ostereatus* (Jacq.:Fr.) Kumm., *Lentinus edodes* (Berk.) Singer, and *Hericium erinaceus* (Bull.:Fr.) Pers. / N. L. Poyedinok , A.S. Buchalo, A.M. Negriyko J.V., Potemkina, O.B. Mykchaylova // Int. J. Med. Mushr. – 2003. - V.5. - P. 293–299. (*Особистий внесок дисертанта: ідея роботи, участь у плануванні і проведенні експериментальних досліджень, аналізі та узагальненні результатів, написання статті*).

4. Поединок Н.Л. Использование лазерного излучения при культивировании некоторых видов съедобных базидиомицетов / Н.Л. Поединок, Ж.В. Потёмкина, А.С. Бухало, А.М. Негрийко, О.Б. Михайлова // Биотехнология. – 2003. – №2. – С. 59–64. (*Особистий внесок дисертанта: ідея роботи, участь у плануванні і проведенні експериментальних досліджень, аналізі та узагальненні результатів, здобувачем самостійно підготовлено статтю*).

5. Поединок Н. Л. Рост и плодоношение *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. в результате воздействия аргонового и гелий-неонового лазера / Н. Л. Поединок, А. М. Негрейко, Ж.В. Потёмкина, А.С. Бухало // Микология и фитопатология. – 2004. – Т. 38, № 1. – С. 83−88. (*Особистий внесок дисертанта: ідея роботи, участь у плануванні і проведенні експериментальних досліджень, аналізі та узагальненні результатів, самостійне написання статті*).

6. Поединок Н.Л. Интенсификация технологических этапов культивирования съедобного гриба вешенки обыкновенной / Н.Л. Поединок, Н.А. Бисько, О.Б. Михайлова, Ж.В. Потёмкина, А.М. Негрийко // Биотехнология. – 2004. - №5. – С. 64–67. (*Особистий внесок дисертанта: самостійне планування експериментів, участь в проведенні експериментальних досліджень, самостійний аналіз, узагальнення результатів і написання статті*).

7. Поединок Н.Л. Световой фактор в биотехнологии культивирования ксилотрофных лекарственных грибов / Н. Л. Поединок, А. М. Негрейко // Проблемы лесоведения и лесоводства. – 2005. – Вып.63. – С.424-426. (*Особистий внесок дисертанта: самостійне планування експериментів, участь в проведенні експериментальних досліджень, самостійний аналіз, узагальнення результатів і написання статті*).

8. Бабицкая В.Г. Влияние условий глубинного культивирования лекарственного гриба *Ganoderma lucidum* (Curt.:Fr.)P.Karst (рейши) на образование полисахаридов / В.Г. Бабицкая, В.В. Щерба, Т.А. Пучкова, Д.А. Смирнов, Н.А. Бисько, Н.Л. Поединок // Биотехнология. – 2007. – №6. - С. 34−42. (*Особистий внесок дисертанта: участь у плануванні і проведенні експериментальних досліджень щодо впливу світла на біосинтетичну активність Ganoderma lucidum, аналізі та узагальненні результатів, написанні статті*).

9. Круподьорова Т.А. Антимікробна активність штамів *Ganoderma applanatum* (Pers.:Wallr.) PAT та *G. Lucidum* (Curt.: Fr.) P. Karst. в умовах глибинного культивування / Т. А. Круподьорова, Н. А. Бісько, Н. Л. Поєдинок, Н.Ю. Митропольская, Б.Ф. Васильева, О.В. Ефременкова // Укр. ботан. журн. – 2008. –

Т. 6, № 4. – С. 590−594. *(Особистий внесок дисертанта: участь у плануванні і проведенні експериментальних досліджень, аналізі та узагальненні результатів, написанні статті*).

10. Poyedinok N. L. Light regulation of growth and biosynthetic activity of ling zhi or reishi medicinal mushroom, *Ganoderma lucidum* (W. Curt: Fr.) P. Karst. (*Aphyllophoromycetideae*), in pure culture / N. L. Poyedinok, O. B. Mykhailova, A. S. Buchalo, A. M. Negriyko // Int. J. Med. Mushr. – 2008. – V. 10, N 4. – P. 369−378. (*Особистий внесок дисертанта: ідея роботи, участь у плануванні і проведенні експериментальних досліджень, аналізі та узагальненні результатів, написання статті*).
11. Smirnov D. A. Some biologically active substance from a mycelial biomass of medicinal caterpillar fungus *Cordyceps sinensis* (Berk.) Sacc. (*Ascomycetes*). / D. A. Smirnov, V. G. Babitskaya, T. A. Puchkova, V.V. Shcherba, N.A. Bisko, N.L. Poyedinok // Int. J. Med. Mushr. – 2009. – V. 11, N1. − P. 69-76. (*Особистий внесок дисертанта: участь у плануванні і проведенні експериментальних досліджень, аналізі та узагальненні результатів, написанні статті*).
12. Дьяков М.Ю. Морфологические признаки природных штаммов некоторых видов макромицетов и биологический анализ антимикробной активности в условиях глубинного культивирования / М. Ю. Дьяков, О. В. Камзолкина, О.В. Штаер, Н.А. Бисько, Н. Л. Поединок, О.Б. Михайлова, О.В. Тихонова, Т.Е Толстихина, Б.Ф Васильева, О.В. Ефременкова // Микология и фитопатология. – 2010. − Т. 44, №.3. − С. 225−240. (*Особистий внесок дисертанта: участь у плануванні і проведенні експериментальних досліджень, аналізі та узагальненні результатів, написанні статті*).
13. Puchkova T.A. Polysaccharides of medicinal caterpillar fungus, *Cordyceps sinensis* (Berk.) Sacc. (*Ascomycetes*): Production and composition / T. A. Puchkova, V. G. Babitskaya, V. V. Shcherba, N. A. Bisko, N. L. Poyedinok // Int. J. Med. Mushr. − 2010. – V. 12, N 4. − P. 419−425. (*Особистий внесок дисертанта: участь у плануванні і проведенні експериментальних досліджень, аналізі та узагальненні результатів, написанні статті*).
14. Трухоновец В.В. Рост и плодоношение базидиального гриба *Hericium erinaceus* (Bull.: Fr.) на растительных субстратах / В.В. Трухоновец, Н.А. Бисько, Н.Л. Поединок, О.Б. Михайлова, Н.Ю. Митропольская, Т.А Колодий, И.А. Булавкина, Д.В. Плащигская // Труды БГТУ. серия Лесное хозяйство. – 2012. – С. 277-281. (*Особистий внесок дисертанта: участь у плануванні і проведенні експериментальних досліджень, аналізі та узагальненні результатів, написанні статті*).
15. Поединок Н. Л. Световая регуляция роста и меланинообразования у *Inonotus obliquus* (Pers.) Pilat / Н. Л. Поединок // Biotechnologia Acta. – 2013. − V. 6, N 2. − P. 115−120. (*Особистий внесок дисертанта: ідея роботи, планування і проведення експериментальних досліджень, аналіз та узагальнення результатів, написання статті.)*
16. Михайлова О.Б. Деякі біологічні властивості гриба *Cordyceps militaris* (L.; Fr.) (*Ascomycota*) як продуцента лікарських речовин / О. Б. Михайлова,

Н. Л. Поединок // Biotechnologia Acta. – 2013. − V.6, N 3. − P. 100−109. (*Особистий внесок дисертанта: участь у плануванні і проведенні експериментальних досліджень, аналізі та узагальненні результатів, написанні статті*).

17. Поединок Н. Л. Использование искусственного света в биотехнологиях культивирования грибов / Н. Л. Поединок // Biotechnologia Acta. – 2013. − V.6, N 6. − P. 58−70. (огляд). *(Особистий внесок дисертанта: самостійно проведено підбір літературних та власних даних, їхній аналіз та узагальнення, сформульовано висновки до роботи, написання статті.)*
18. Poyedinok N. L. Effects of light wavelengths and coherence on basidiospores germination / N. L. Poyedinok, O. B. Mykhailova, A. M. Negriyko // J. Microbiol. Biotech. Food Sci. – 2015. – V. 4, N 4. – P. 352-357. (*Особистий внесок дисертанта: ідея роботи, участь у плануванні і проведенні експериментальних досліджень, аналізі та узагальненні результатів, самостійне написання статті*).
19. Poyedinok N. L. Induction of antimicrobial activity of some macromycetes by low-intensity light / N. L. Poyedinok, O. B. Mykchaylova, A. M. Negriyko, I. A. Dudka, B. F. Vasilyeva, O. V. Efremenkova // Biotechnologia Acta – 2015. - V. 8, N 1. – P. 63-70. (*Особистий внесок дисертанта: ідея роботи, участь у плануванні і проведенні експериментальних досліджень, аналізі та узагальненні результатів, самостійне написання статті.*)
20. Poyedinok N. L. Effect of light wavelengths and coherence on growth, enzymes activity and melanin production of liquid cultured *Inonotus obliquus* (Ach.:Pers.) Pilát / N. Poyedinok, O. Mykchaylova, T. Tugay, A. Tugay, A. Negriyko, I. Dudka // Appl. Biochem. Biotechnol. – 2015. – V. 176, N 2. – P. 333-343. (*Особистий внесок дисертанта: ідея роботи, участь у плануванні і проведенні експериментальних досліджень, аналізі та узагальненні результатів, написання статті*).
21. Поединок Н. Л. Влияние на ростовую активность посевного материала культивируемых макромицетов низкоинтенсивного лазерного излучения /Н.Л. Поединок, О.Б. Михайлова, В.М. Ходаковский, И.А. Дудка // Мікробіологія и біотехнологія – 2015. – Т. 29, № 1. – С. 77-86. (*Особистий внесок дисертанта: ідея роботи, участь у плануванні і проведенні експериментальних досліджень, самостійний аналіз та узагальнення результатів, написання статті*).

Статті, опубліковані в наукових збірниках і журналах

22. Poyedinok N. L. Influence of low-intensity laser radiation on the growth and development of *Hericiun erinaceus* (Bull.:Fr.) Pers. and *Pleurotus ostreatus* (Jacq.:Fr.) Kumm / N. L. Poyedinok, A. Negrijko, J. Potemkina, A.Ph. Grygansky // Int. J. Med. Mushr. – 2001. – V. 3, N 2−3. – P. 199. (*Особистий внесок дисертанта: ідея роботи, участь у плануванні і проведенні експериментальних досліджень, самостійний аналіз та узагальнення результатів, написання статті*).
23. Поединок Н.Л. Изучение влияния низкоинтенсивного лазерного света на антимикробную активность *Pleurotus ostereatus* (Jacg.:fr.)Kumm. / Н.Л. Поединок, О.В. Ефременкова, Ж.В. Потёмкина, И.В. Толстых, О.Б. Михайлова // Успехи медицинской микологии: материалы первого всероссийского конгресса по медицинской микологии, Москва, 20-21 февраля 2003 г. / Национальная Академия

Микологии; редкол.: Ю.В. Сергеев [и др.]. – М.: Национальная академия микологии, 2003. – Т.1. - С. 293-295. (*Особистий внесок дисертанта: ідея роботи, участь у плануванні і проведенні експериментальних досліджень, самостійний аналіз та узагальнення результатів, написання статті*).

24. Поединок Н.Л. Световой фактор в биотехнологии культивирования лекарственных грибов / Н.Л. Поединок // Успехи медицинской микологии: материалы второго всероссийского конгресса по медицинской микологии, Москва, 24-25 марта 2004 г. / Национальная Академия Микологии; редкол.: Ю.В. Сергеев [и др.]. – М.: Национальная академия микологии, 2004. – Т.3. - С. 230-232. (*Особистий внесок дисертанта:самостійний аналіз та узагальнення результатів, написання статті*).
25. Поединок Н.Л. Лечебные свойства гериция шиповатого и перспективы его использования в биотехнологии и медицине / Н.Л. Поединок // Успехи медицинской микологии: материалы третьего всероссийского конгресса по медицинской микологии, Москва, 24-25 марта 2005 г. / Национальная Академия Микологии; редкол.: Ю.В. Сергеев [и др.]. – М.: Национальная академия микологии, 2005. – Т.5. - С. 276−278. (*Особистий внесок дисертанта:самостійне написання статті*).
26. Поединок Н.Л. Использование света в биотехнологии промышленного культивирования вешенки обыкновенной и шампиньона двуспорового / Н.Л. Поединок, Н.А. Бисько // Достижения, проблемы и перспективы культивирования грибов. Современные технологии. Сб. науч. тр. – Донецк, 2005. – С.24-27. (*Особистий внесок дисертанта: самостійне написання статті*).
27. Poyedinok N. L. The light factor in biotechnology cultivation of medicinal mushrooms / N. L. Poyedinok, A. S. Buchalo, O. V. Efremenkova, A. M. Negriyko // Int. J. Med. Mushr. – 2005. − V. 7, N 3-4. − P. 448−449. (*Особистий внесок дисертанта: ідея роботи, участь у плануванні і проведенні експериментальних досліджень, самостійний аналіз та узагальнення результатів, написання статті*).
28. Бисько Н.А. Интенсификация технологических этапов промышленного культивирования шампиньона двуспорового / Н.А. Бисько, Н.Л. Поединок Б.Ф. Петренко, А.М. Негрейко // Агро ХХ1. – 2006. - №0709. - С. 24-36. (*Особистий внесок дисертанта: участь у плануванні і проведенні експериментальних досліджень, самостійний аналіз, узагальнення результатів і написання статті*).
29. Поединок Н.Л. Биосинтетическая активность некоторых высших лекарственных грибов после световых воздействий / Н.Л. Поединок, О.В. Ефременкова, О.Б. Михайлова, А.М. Негрейко // Успехи медицинской микологии: материалы пятого всероссийского конгресса по медицинской микологии, Москва, 28-30 марта 2007г. / Национальная Академия Микологии; редкол.: Ю.В. Сергеев [и др.]. – М.: Национальная академия микологии, 2007. – Т. 9 – С. 176−178. (*Особистий внесок дисертанта: ідея роботи, участь у плануванні і проведенні експериментальних досліджень, самостійний аналіз та узагальнення результатів, написання статті*).

30. Поединок Н. Л. Световая регуляция роста грибов *Inonotus obliquus*, *Ganoderma lucidum* и видов рода *Morchella* / Н. Л. Поєдинок // Рациональное использование и воспроизводство лесных ресурсов в системе устойчивого развития: межд. научно-практ. конференция, 5−7 сен. 2007 г.: Материалы. − Гомель, 2007. − С. 296−301. (*Особистий внесок дисертанта: ідея роботи, самостійно проведено експерименти, аналіз даних та написано статтю*).
31. Бабицкая В.Г. *Cordyceps militaris* – объект современной биотехнологии / В.Г. Бабицкая, В.В. Щерба, Т.С. Гвоздкова, Н.А. Бисько, Т.А. Пучкова, О.В. Осадчая, Н.Л. Поєдинок // Успехи медицинской микологии: материалы пятого всероссийского конгресса по медицинской микологии, Москва, 28-30 марта 2007 г. / Национальная Академия Микологии; редкол.: Ю.В. Сергеев [и др.]. – М.: Национальная академия микологии, 2007. – Т. 9. – С. 212−214. (*Здобувачем разом із співавторами проведено експерименти, аналіз даних та написано статтю*).
32. Бабицкая В.Г. Физико-химические свойства полисахаридов, выделенных из мицелия местных штаммов *Ganoderma lucidum* / В.Г. Бабицкая, В.В. Щерба, Д.А. Смирнов, Н.А. Бисько, Т.В. Филимонова, Н.Л. Поединок // Успехи медицинской микологии: материалы пятого всероссийского конгресса по медицинской микологии, Москва, 28-30 марта 2007 г. / Национальная Академия Микологии; редкол.: Ю.В. Сергеев [и др.]. – М.: Национальная академия микологии, 2007. – Т. 9. – С. 139−141. (*Здобувачем разом із співавторами проведено експерименти, аналіз даних та написано статтю*).
33. Бухало А.С. Скрининг штаммов лекарственных макромицетов в коллекции культур шляпочных грибов / А.С. Бухало, Н.Л. Поединок, О.Б. Михайлова, М.Л. Ломберг // Успехи медицинской микологии: материалы пятого всероссийского конгресса по медицинской микологии, Москва, 28-30 марта 2007 г. / Национальная Академия Микологии; редкол.: Ю.В. Сергеев [и др.]. – М.: Национальная академия микологии, 2007. – Т. 9. – С. 228–230. (*Здобувачем разом із співавторами проведено експерименти, аналіз даних та написано статтю*).
34. Babitskaya V. G. The influence of different factors on the polysaccharide accumulation of *Ganoderma lucidum* / V. G. Babitskaya, N. A. Bisko, N. L. Poyedinok, T. A. Puchkova // Int. J. Med. Mushr. − 2007. – V. 9, N 3-4. − P. 274. (*Особистий внесок дисертанта: участь у плануванні і проведенні експериментальних досліджень щодо впливу світла на синтез полісахаридів Ganoderma lucidum, аналізі та узагальненні результатів, написанні статті*).
35. Poyedinok N. L. The activity of certain medicinal mushrooms after light influence / N. L. Poyedinok, A. S. Buchalo, O. B. Mykhailova, A. M. Negriyko // Int. J. Med. Mushr. – 2007. − V. 9, N 3-4. − P. 342-343. (*Особистий внесок дисертанта: ідея роботи, участь у плануванні і проведенні експериментальних досліджень, самостійний аналіз та узагальнення результатів, написання статті*).
36. Бісько Н.А. Фактори регуляції біосинтетичної активності лікарських грибів / Н.А. Бісько, Н.Л. Поєдинок, А.М. Негрійко, Ж.В. Потьомкина, В.Г. Бабицькеа, В.В. Щерба, О.Б. Михайлова // Пріоритети наукової співпраці ДФФД і БФФД. Матеріали спільних конкурсних проектів Державного фонду фундаментальних досліджень і Білоруського республіканського фонду фундаментальних

досліджень (« ДФФД-БРФФД – 2005). – К.: ДІА, 2007. – С. 312–325. (*Особистий внесок дисертанта: участь у плануванні і проведенні експериментальних досліджень аналізі та узагальненні результатів, самостійне написання статті*).

37. Поєдинок Н. Л. Енергоефективні системи штучного освітлення у технологіях вирощування їстівних та лікарських грибів / Н. Л. Поединок, А.М. Негрійко, Н. А. Бисько, О. Б. Михайлова, В.М. Ходаковський, Ж.В. Потьомкина // Наука та інновації. – 2013. - Т.9, № 3. - С. 46-59. (*Особистий внесок дисертанта: ідея роботи, участь у плануванні і проведенні експериментальних досліджень. Здобувачем самостійно проведено аналіз та узагальнення результатів та самостійно підготовлено статтю*).

Монографія:

38. Поединок Н. Л. Влияние света на морфогенез и метаболизм макромицетов /А.С. Бухало, В.Г. Бабицкая, Н.А. Бісько, И.А. Дудка, Н.Ю. Митропольская, О.Б. Михайлова, Н. Л. Поединок, А. М. Негрейко, Є.Ф. Соломко // [под ред. С. П. Вассера] − Биологические особенности лекарственных макромицетов в культуре. Т. 1. – К.: Альтепрес, 2011. – С. 164−211. (*Особистий внесок дисертанта: проведено підбір літературних та власних даних, їхній аналіз та узагальнення, сформульовано висновки до роботи, разом із співавтором підготовлено главу*).

Тези, опубліковані за матеріалами докторської дисертації:

39. Поединок Н. Л. Использование низко-интенсивного лазерного излучения для обработки посевного мицелия некоторых культивируемых высших базидиомицетов / Н. Л. Поединок, Ж. С. Потемкина // Современная микология в России: первый съезд микологов России, 11-13 апр. 2002 г.: материалы съезда. – Москва, 2002. – С. 284.

40. Poyedinok N. L. Growth and yielding some edible mushrooms after their treatments by argon or helium-neon laser radiation / N. L. Poyedinok, A. Negrijko, J. Potemkina // Abstr. of International Congress of Mycology. - Paris, 2002. - P.373

41. Poyedinok N.L. Once more on the equivalency of laser and non-laser red radiation biological activity: example of *Lentinus edodes* mushroom / N. L. Poyedinok, J. Potemkina // Abstr. of XVI International School Seminar «Spectroscopy of molecules and crystals». - Crimea, Ukraine, 2003. – P. 307.

42. Poyedinok N.L. Prospects for application of low intensity laser light in cultivation of edible mushrooms / N. L. Poyedinok, A. M. Negrijko, J. Potemkina // Abstr. of XIV Congress of European Mycologists. – Katsiveli, Yalta, Crimea, Ukraine, 2003. - P.109-110.

43. Poyedinok N. L. The effect of low-intensity laser radiation on antibiotic activity of *Pleurotus ostreatus* (Jacg.:fr) Kumm. in submerged culture / N. L. Poyedinok, O. V. Efremenkova, A. S. Buchalo, S.P. Wasser // Abstr. of Fifth International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products. − China, 2005. − P. 141−142.

44. Поединок Н.Л. Способы интенсификации культивирования съедобных и лекарственных грибов / Н.Л. Поединок, Н.А. Бисько // Материалы Научно-

практической конференции «Грибоводство и смежные биотехнологии. Инновации для инвестиций», . – Москва, ВВЦ, Центр «Москва», 2005. - С.12-13

45. Поединок Н.Л. Рост *Ganoderma lucidum* в глубинной и поверхностной культуре после световых воздействий / Н.Л. Поединок, А. Сиваш, А.М. Негрейко // Современное состояние и перспективы развития микробиологии и биотехнологии: межд. конф., 1-2 июня 2006 г.: материалы. – Минск – Раков, 2006. – С.164-169
46. Бабицкая В.Г. Оптимизация условий глубинного культивирования *Ganoderma lucidum* (рейши) для получения полисахаридов / В.Г. Бабицкая, Н.Л. Поединок, Н.А. Бисько, Т.А. Пучкова // Современное состояние и перспективы развития микробиологии и биотехнологии: межд. конф., 1-2 июня 2006 г.: материалы. – Минск – Раков, 2006. – С.180–181.
47. Negriyko A.M. Laser manipulation by small absorbing hot particles / A.M. Negriyko, N. L. Poyedinok, J.V. Potemkina, V.V. Khodakovskiy, O.Yu. Rapp // Abstr. of International Conference on Laser Applications in Life Sciences. - Moscow, Russia, 2007. - P. 38.
48. Бабицкая В.Г. Физиологически активные соединения грибов рода *Cordyceps* / В. Г. Бабицкая, Н. А. Бисько, Д.А. Смирнов, В.В. Щерба, Т.А. Пучкова, Н. Л. Поединок // Современная микология в России: 2 съезд микологов России, 16-18 апреля 2008 г.: материалы, [ред. Ю.Т. Дьяков и др.] – М.: Национальная академия микологии, 2008. − Т. 2. – С. 324.
49. Бабицкая В.Г. Грибы рода *Cordyceps* – продуценты биологически активных соединений / В.Г. Бабицкая, В.В. Щерба, Н.А. Бисько Н.Л. Поединок // Современное состояние и перспективы развития микробиологии и биотехнологии: VI Межд. науч. конф. 2-6 июня 2008 г.: материалы, [под ред. Э.И. Коломиец]. – Мн.: изд. И.П. Логвинов, 2008. – Т. 2. − С. 284–286.
50. Пучкова Т.А. Влияние условий культивирования на образование полисахаридов грибом *Cordyceps militaris* / Т.А. Пучкова, В.Г. Бабицкая, В.В. Щерба, Н.А. Бисько Н.Л. Поединок // Современное состояние и перспективы развития микробиологии и биотехнологии: VI Межд. науч. конф. 2-6 июня 2008 г.: материалы, [под ред. Э.И. Коломиец]. – Мн.: изд. И.П. Логвинов, 2008. – Т. 2. − С. 293–296.
51. Поединок Н. Л. Влияние света на рост и биосинтетическую активность *Cordyceps militaris* и *Cordyceps sinensis* / Н. Л. Поединок, О. Б. Михайлова, Т. А. Пучкова, Н.А. Бисько, В.Г. Бабицкая, В.В. Щерба // Современное состояние и перспективы развития микробиологии и биотехнологии: VI Межд. науч. конф. 2-6 июня 2008 г.: материалы, [под ред. Э.И. Коломиец]. – Мн.: изд. И.П. Логвинов, 2008. – Т. 2. − С. 118−120.
52. Поединок Н. Л. Фоторегуляция биосинтетической активности макромицетов-продуцентов биологически активных веществ / Н. Л. Поединок, О. Б. Михайлова, О. П. Ефременкова //Иммунопатология, аллергология, инфектология: Междисциплинарный микологический форум, 23-24 апреля 2009: материалы форума. – Москва, 2009. − № 2. – С. 166.

53. Михайлова О.Б. Биотехнологические аспекты культивирования видов рода *Morchella* на жидких питательных средах / О. Б. Михайлова, Н. Л. Поединок, А. С. Бухало //Иммунопатология, аллергология, инфектология: Междисциплинарный микологический форум, 23-24 апреля 2009: материалы форума. – Москва, 2009. − № 2. – С. 167.
54. Poyedinok N. L. The influence of light on the growth and biosynthetic activity of medicinal fungi *Cordyceps militaris* (L.:Fr.) Link. and *Cordyceps sinensis* (Berk.)Sacc. Link. / N. L. Poyedinok, O. B. Mykchaylova, N. A. Bisko // Abstr. of The 5 International medicinal mushroom conference. − China Nantong. – 2009. − P. 261.
55. Поединок Н.Л., Регуляция биосинтерической активности видов р.*Morchella* / Н.Л. Поединок, О.Б. Михайлова, А.С. Бухало, О.В. Ефременкова, Т.А. Пучкова // Current problems in microbiology and biotechnology: The National Scientific Conference with International Participation, Chisinau, Republic of Moldova, oct. 5−6, 2009 y., Acad. de Ştiinţe a Moldovei, Inst. de Microbiologie şi Biotehnologie; com. şt. intern. Duca Gheorghe (preş.), Furdui Teodor, Zveaghinţev D.G. [et al.]; com. org. Rudic Valeriu, Cepoi Liliana, Usatai Agafia [et al.]. – Ch.: S.n. (Tipogr. «Elena-V.I.» SRL), 2009. – P. 136-138.
56. Поединок Н.Л. Регуляция биосинтеза меланина у *Inonotus obliquus* (Pers.) PilÁt. / Н.Л. Поединок // Иммунопатология, аллергология, инфектология: Междисциплинарный микологический форум, 14-15 апреля 2010: материалы форума. – Москва, 2010. − № 1. – С. 29–30.
57. Михайлова О.Б. Ферментативная активность новых интродуцированных штаммов базидиомицетов / О.Б. Михайлова, Н.Л. Поединок, М.Ю. Дьяков, О.В. Камзолкина // Иммунопатология, аллергология, инфектология: Междисциплинарный микологический форум, 14-15 апреля 2010: материалы форума. – Москва, 2010. − № 1. – С.259-260.
58. Пучкова Т.А. Сравнительная характеристика ферментативной активности макромицетов разных экологических и систематических групп // Т.А. Пучкова, Н.А. Бисько, Т.В. Филимонова, Т.В. Черноок, О.В. Осадчая, Н.Л. Поединок // Иммунопатология, аллергология, инфектология:. Междисциплинарный микологический форум, 14-15 апреля 2010: материалы форума. – Москва, 2010. − № 1. – С. 31.
59. Потёмкина Ж.В. Светодиодные источники света для интенсивной технологии выращивания съедобных и лекарственных грибов / Ж.В. Потёмкина, А.М. Негрейко, Н.Л. Поединок // Abstr. of XX International School Seminar «Spectroscopy of molecules and crystels». - Beregove, Crimea, Ukraine, 2011. – С. 51.
60. Potemkina J. V. Spectral properties of LEDs based light source for application in mushroom cultivation / J. V. Potemkina, N. L. Poyedinok // Материалы IV Международной конференции «Функциональная база наноэлектроники». – Харьков-Кацивели, Украина, 2011. -С. 113.
61. Поединок Н. Л. Лазеры в современной биотехнологии / Н. Л. Поединок, Н. А. Бисько, В. Трухоновец, О. Б. Михайлова // Микробиологическая биотехнология – наукоемкое направление современных знаний: межд. науч. конф., 6−8 июля, 2011 г.: материалы. − Кишинев, Молдова, 2011. – С. 202−203.

62. Поединок Н.Л. Фоторегуляция роста и меланинообразования у *Inonotus obliquus* (Pers) Pilat. / Н.Л. Поединок, О.Б. Михайлова // Микробиологическая биотехнология – наукоемкое направление современных знаний: межд. науч. конф., 6−8 июля, 2011 г.: материалы. − Кишинев, Молдова, 2011. – С. 204–205.
63. Поединок Н.Л. Перспективы использования искусственного света в биотехнологиях культивирования лекарственных макромицетов / Н.Л. Поединок, О.Б. Михайлова, А.М. Негрейко // Успехи медицинской микологии: материалы шестого всероссийского конгресса по медицинской микологии, Москва, 8-10 апреля 2014 г. / Национальная Академия Микологии; редкол.: Ю.В. Сергеев [и др.]. – М.: Национальная академия микологии, 2014. – Т.12. – С. 257–258.
64. Михайлова О.Б. Научные основы создания перспективних биотехнологий культивирования лекарственных макромицетов *Piptoporus betulinus* (Bull.) P. Karst и *Flammulina velutipes* (Curtis) Singer / О.Б. Михайлова, Н.Л. Поединок // Успехи медицинской микологии: материалы шестого всероссийского конгресса по медицинской микологии, Москва, 8-10 апреля 2014 г. / Национальная Академия Микологии; редкол.: Ю.В. Сергеев [и др.]. – М.: Национальная академия микологии, 2014. – Т.12. – С. 242-243.

Патенти на винаходи:

65. Патент на винахід № 76305 Україна, A01G 1/04. Спосіб обробки посівного міцелію вищого базидіального гриба *Pleurotus ostreatus* / Н. Л. Поєдинок, А.С. Бухало, А.М. Негрійко (Україна); заявник та власник Інститут ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України - № а 20040806913; заявл.18.08.2004; опубл. 17.07.2006, Бюл. №7. – 6 с. (*Особистий внесок дисертанта: ідея роботи, участь у плануванні та виконання основної частини експериментальних досліджень, самостійній аналіз та узагальнення результатів, написання патенту*).
66. Патент на винахід № 82960 Україна, C07K 5/00 A61K 36/06. Спосіб одержання субстанції меланіну / Н. Л. Поєдинок, В.В. Щерба, А.М. Негрійко, Н.В. Іконнікова, О. Б. Михайлова (Україна); заявники та власники Н. Л. Поєдинок, А.М. Негрійко - № а 2007 02087; заявл.27.02.2007; опубл. 26.05.2008, Бюл. №10. – 8 с. (*Особистий внесок дисертанта: ідея роботи, участь у плануванні та виконання основної частини експериментальних досліджень, самостійний аналіз та узагальнення результатів, написання патенту.)*
67. Патент на винахід № 102450 Україна, A01G 1/04 (2006.01). Спосіб одержання біомаси та білка харчового призначення зморшка конічного (*Morchella conica*) / Н. Л. Поєдинок, О. Б. Михайлова, Н.А. Бісько (Україна); заявник та власник Інститут ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України - № а 2011 14418; заявл.06.12.2011; опубл. 10.07.2013, Бюл. №13. – 5 с. (*Особистий внесок дисертанта: ідея роботи, участь у плануванні та виконання основної частини експериментальних досліджень, самостійний аналіз та узагальнення результатів, написання патенту.)*
68. Патент на корисну модель № 26074 Україна, A01G 1/04 A01H 15/00 C12N 1/14. Спосіб стимуляції росту та підвищення продуктивності гриба печериці двоспорової (*Agaricus bisporus* (J.Lge) Imbach. / Н. Л. Поєдинок, Н.А. Бісько, А.М. Негрійко, Б.Ф. Петренко (Україна); заявники та власники Н. Л. Поєдинок, Н.А.

Бісько, А.М. Негрійко - № а 2005 06467; заявл.01.07.2005; опубл. 10.09.2007, Бюл. №14. – 10 с.: іл. 2. (*Особистий внесок дисертанта: ідея роботи, участь у плануванні та виконання основної частини експериментальних досліджень, самостійний аналіз та узагальнення результатів, написання патенту.)*

69. Деклараційний патент № 36013 А Україна, 6 A01G1/04. Спосіб активації проростання спор вищого базидіального гриба *Hericium erinaceus* / Н.Л. Поєдинок, А.М. Негрійко, А.С. Бухало (Украина); заявник та власник Інститут ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України − № 99105730; заявл. 20.10.1999; опубл. 16.04.2001, Бюл. № 3. – 4 с.: іл. 1. (*Особистий внесок дисертанта: ідея роботи, участь у плануванні та виконання основної частини експериментальних досліджень, самостійний аналіз та узагальнення результатів, написання патенту.)*
70. Деклараційний патент № 53867 А Україна, 7 A01G1/64. Спосіб стимуляції росту, розвитку і плодоношення вищого базидіального їстівного гриба *Hericium erinaceus* (Bull.: Fr.)Pers / Н.Л. Поєдинок, А.С. Бухало, Ж.В. Потьомкина, А.М. Негрійко (Україна); заявники та власники Інститут ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України, Інститут фізики НАН України - № 2001128349; заявл. 05.12.2001; опубл. 17.02.2003; бюл.2. – 6 с. (*Особистий внесок дисертанта: ідея роботи, участь у плануванні та виконання основної частини експериментальних досліджень, самостійний аналіз та узагальнення результатів, написання патенту.)*
71. Деклараційний патент № 53900 А Україна, 7 A01G1/04. Спосіб активації посівного міцелію їстівного гриба гливи звичайної (*Pleurotus ostereatus*) / Н.Л. Поєдинок, А.С. Бухало, Ж.В. Потьомкина (Україна); заявник та власник Інститут ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України - № 2002020954; заявл. 05.02.2002; опубл. 17.02.2003; бюл.2. – 4 с. (*Особистий внесок дисертанта: ідея роботи, участь у плануванні та виконання основної частини експериментальних досліджень, самостійний аналіз та узагальнення результатів, написання патенту.)*
72. Деклараційний патент № 53880 А Україна, 7 A01G1/64. . Спосіб стимуляції росту, розвитку і плодоношення вищого базидіального їстівного гриба *Lentinus edodes* (Berk.)Sing. / Н.Л. Поєдинок, А.С. Бухало, Ж.В. Потьомкина, А.М. Негрійко (Україна); заявник та власник Інститут ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України - № 2002010279; заявл. 10.01.2002; опубл. 17.02.2003; бюл.2. – 6 с. (*Особистий внесок дисертанта: ідея роботи, участь у плануванні та виконання основної частини експериментальних досліджень, аналіз та узагальнення результатів, написання патенту.)*
73. Деклараційний патент на корисну модель № 16930 Україна, 7 A01G1/04. Спосіб інтенсифікації технологічних етапів промислового культивування гриба гливи звичайної (*Pleurotus ostreatus*) / Н.Л. Поєдинок, А.С. Бухало, Н.А. Бісько, О.Б. Михайлова, Ж.В. Потьомкина, А.М. Негрійко (Україна); заявники та власники Н.Л. Поєдинок, А.М. Негрійко - № 2004010295; заявл. 15.01.2004; опубл. 15.09.2006; бюл.9. – 6 с. (*Особистий внесок дисертанта: ідея роботи, участь у плануванні та виконання основної частини експериментальних досліджень, самостійний аналіз та узагальнення результатів, написання патенту.)*

АНОТАЦІЯ

Поєдинок Н.Л. Біотехнологічні основи інтенсифікації культивування їстівних і лікарських макроміцетів за допомогою світла низької інтенсивності. – Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.20 – біотехнологія. – ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України», Київ, 2015.

Розроблений новий напрямок використання штучного світла низької інтенсивності в біотехнологіях культивування їстівних і лікарських грибів. Вперше встановлено, що короткочасне низькоінтенсивне випромінювання у видимій частині спектра викликає стимуляцію ростової та біосинтетичної активності макроміцетів, яка має пролонговану дію та може передаватися на подальшу онтогенетичну стадію від спор до міцелію. Запропоновані відсутні раніше високоефективні екологічно чисті методи цілеспрямованої регуляції біосинтетичної активності макроміцетів і інтенсифікації технологічних етапів їхнього вирощування за допомогою світла низької інтенсивності різної когерентності та спектрального складу, які дозволяють індукувати проростання спор, скоротити терміни культивування, зменшити кількість посівного матеріалу при інокуляції субстратів, збільшити вихід біомаси та біологічно активних компонентів при глибинному культивуванні й врожайність плодових тіл та їхню якість при твердофазному вирощуванні.

Ключові слова: макроміцети, низькоінтенсивне світло, опромінення, фотоіндукована активність, стимуляція.

АННОТАЦИЯ

Поединок Н.Л. Биотехнологические основы интенсификации культивирования съедобных и лекарственных макромицетов с помощью света низкой интенсивности. – Рукопись.

Диссертация на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.00.20 – биотехнология. – ГУ “Институт пищевой биотехнологии и геномики НАН Украины”, Киев, 2015.

Диссертация посвящена разработке биотехнологических основ интенсификации культивирования съедобных и лекарственных макромицетов с помощью света низкой интенсивности.

Для исследования фоточувствительности макромицетов и определения режимов фотостимуляции их биологической активности были разработаны экспериментальные установки на основе свет излучающих диодов и лазеров, позволяющие получать свет с различными спектральными, энергетическими, поляризационными характеристиками, с максимально точно определенными параметрами.

На основе полученных данных экспериментально доказана гипотеза, что пусковой механизм индуцированных низкоинтенсивным светом биологических реакций, описанный у других биологических объектов разного уровня организации, присущ и макромицетам. Полученные экспериментальные данные свидетельствуют,

что кратковременное (от нескольких секунд до десятков минут) низкоинтенсивное излучение в малых дозах (45-230 мДж/см^2) способствует макроэффекту, который долго сохраняется. Впервые выявлено, что основные изменения, вызванные кратковременным облучением светом низкой интенсивности у макромицетов на разных стадиях онтогенеза имеют пролонгированное действие и не требуют дальнейшей активизации светом.

Определена специфика реакций макромицетов отделов *Ascomycota* и *Basidiomycota* на облучение непрерывным и импульсным светом разной когерентности и длин волн. Показаны ранее неизвестные тенденции изменений углеводного состава полисахаридов представителей этих таксонов под действием кратковременных световых воздействий. На этом основании высказана гипотеза о специфике их фоторецепторных систем. Выявлены изменения в жирнокислотном профиле макромицетов после облучения светом низкой интенсивности, которые заключались в тенденции уменьшения ненасыщенности жирных кислот.

Впервые для макромицетов установлено преимущество использования низкоинтенсивного лазерного излучения вместо некогерентного света низкой интенсивности и импульсного света разной когерентности по сравнению с непрерывным для стимуляции роста, антимикробной и ферментативной активности, синтеза меланина и полисахаридов, которое выражается в дополнительном увеличении ростовых показателей и выхода биологически активных веществ.

Выявленны значительные изменения уровня активности ферментов *Inonotus obliquus* после воздействий красного и синего НИЛИ, включая катализирующие синтез меланина (вне- и внутриклеточные полифенолоксидазы и тирозиназы), что впервые для макромицетов подтвердило установленные ранее для других биологических объектов закономерности, заключающиеся в избирательном поглощении света содержащимися в клетках пигментными веществами.

В процессе экспериментального изучения показаны возможности и определены эффективные режимы использования экономичных источников излучения на основе твердотельных светодиодов для индукции прорастания спор *A. bisporus, F. velutipes, G. lucidum, I. obliquus, L. edodes* и *P. ostreatus,* стимуляции роста *C. militaris, F. velutipes, G. applanatum, G. lucidum, H. erinaceus, L. edodes, M. conica, M. esculenta* и *P. ostreatus*, антимикробной активности *F. velutipes, G. applanatum, G. lucidum* и *P. ostreatus*, активности внеклеточной тирозиназы, полифенолоксидазы и синтеза меланинов у *I. obliquus*, полисахаридов у *G.lucidum, L.edodes, M. conica* и *M. esculenta.*

Изучена динамика фотоиндуцированной активности посевного мицелия при хранении и последовательных пересевах. Установлено, что реализация фотостимулирующего эффекта зависит от способа культивирования макромицетов и состава питательной среды. Кратковременное облучение светом низкой интенсивности вызывает изменение трофики макромицетов, которое выражается в увеличении эффективности потребления источника углерода.

Экспериментально доказано, что свет низкой интенсивности может выступать как стимулятор биологической активности не только у грибов, нуждающихся в

освещении на этапе формирования плодовых тел, но и для такого вида, как *Agaricus bisporus*, который все этапы плодообразования проходит в темноте.

Разработано новое направление использования искусственного света низкой интенсивности в биотехнологиях культивирования съедобных и лекарственных грибов. Впервые предложены отсутствовавшие ранее, высокоэффективные экологически чистые методы целенаправленной регуляции биосинтетической активности макромицетов и интенсификации технологических этапов их выращивания с помощью света низкой интенсивности разной когерентности и спектрального состава, позволяющие индуцировать прорастание спор, сократить сроки культивирования, уменьшить количество посевного материала при инокуляции субстратов, увеличить выход биомассы и биологически активных компонентов при глубинном культивировании, урожайность плодовых тел и их качество при твердофазном выращивании.

Ключевые слова: макромицеты, низкоинтенсивный свет, облучение, фотоиндуцированная активность, стимуляция.

SUMMARY

Poyedinok N.L. Biotechnological principles of intensifying the cultivation of edible and medicinal macromycetes by low-intensity light. – Manuscript.

Thesis for Doctor of Science degree in Biology (Dr. Sci. Biol.), specialty 03.00.20 – biotechnology. – Institute for Food Biotechnology and Genomics of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 2015.

A new concept of using low-intensity artificial light in biotechnology of cultivation of edible and medicinal mushrooms has been developed. For the first time it has been found that short-term low-intensity irradiation in the visible part of the spectrum has stimulated growth and biosynthetic activity of macromycetes. Such stimulation has a prolonged effect and is capable of being transferred to further ontogenetic stage from the spores to the mycelium. The author has suggested original and highly environmentally friendly methods of purposefully regulating biosynthetic activity of macromycetes and intensifying the stages of their growing using low-intensity light of different coherence and spectral composition. It allowed inducing spore germination, shortening the cultivation time, reducing the amount of seed to inoculate substrates, increasing the biomass yield and bioactive components in submerged cultivation as well as the yield of fruit bodies and their quality in solid cultivation.

Keywords: macromycetes, low-intensity light, irradiation, photoinduced activity, stimulation.

Підписано до друку 21.09.2015р.
Наклад 100 прим.
Надруковано ТОВ «Олександріна»
м. Київ, вул. Антоновича,180
тел. (044) 521-00-74.