

ІНТЕНСИФІКАЦІЯ РОСТУ БАЗИДІЄВОГО ГРИБА *SCHIZOPHYLLUM COMMUNE* ЗА ДОПОМОГОЮ ЛАЗЕРНОГО ОПРОМІНЕННЯ

К.С. Решетник, Д.С. Юськов

Донецький національний університет імені Василя Стуса (м. Вінниця, Україна)
e-mail: k.reshetnyk@donnu.edu.ua; ORCID: 0000-0001-7419-9401
e-mail: dima8941@gmail.com; ORCID: 0000-0001-5015-1526

Досліджено ростові процеси базидієвого гриба *Schizophyllum commune* за дії лазерного опромінення. Для визначення швидкості росту штамів *S.c.-01*, *S.c.-02*, *S.c.-03* гриба *S. commune* міцелій культивували на агаризованому середовищі (КГА) з різними концентраціями глюкози (10, 8, 6 і 4 г/дм³). З метою вивчення впливу лазерного опромінення на ріст гриба *S. commune* міцелій опромінювали за допомогою LED лазерів: BRP-3010-5, з випромінюванням червоного спектра з довжиною хвилі 635 нм; BVP-3010-5 — синього спектра з довжиною хвилі 405 нм та BGP-3010-5 — зеленого спектра з довжиною хвилі 532 нм. Визначено ефективні режими фотоактивації міцелію когерентним світлом. Отримано результати, які дають змогу стверджувати, що найефективнішим для всіх досліджуваних штамів цього виду є опромінення міцелію червоним світлом з довжиною хвилі 635 нм (енергія опромінення 51,1 мДж/см²) тривалістю 10 с. За цих умов опромінення для штамів *S.c.-01*, *S.c.-02*, *S.c.-03* *S. commune* швидкість радіального росту міцелію зростає від 63,8 до 84,3%. Ефективним також виявилось лазерне опромінення міцелію синім світлом з довжиною хвилі 405 нм (енергія опромінення 51,1 мДж/см²) тривалістю 10 с. Середня швидкість росту підвищилася для штамів *S.c.-03*, *S.c.-01* та *S.c.-02* на 71,8 — 52,7%. Визначено оптимальну концентрацію глюкози (8 г/дм³), значення якої є меншим від стандартного (10 г/дм³), яке використовують для середовища КГА. Вперше було встановлено, що використання середовища КГА з концентрацією глюкози 8 г/дм³ у комплексі з лазерним опроміненням червоним (довжина хвилі 635 нм) або синім (405 нм) світлом з енергією опромінення 51,1 мДж/см² дає змогу значно підвищити середню швидкість радіального росту міцелію.

Ключові слова: фотоактивація, швидкість росту, поверхнєве культивування, лікарські макроміцети.

ВСТУП

Нині лігноцелюлозні рослинні субстрати, основна частина яких є відходами сільського господарства, дедалі більше привертають увагу як дешевий ресурс для виробництва альтернативних видів енергії, зокрема біогазу. Однією з основних проблем, що постає під час виробництва біоетанолу, є висока вартість процесу ферментативного гідролізу [1]. Оскільки перетворення біомаси, зокрема гідроліз полісахаридів у бродильні цукри, залежить від ефективності ферментних сумішей [2],

завдяки оптимізації складу можна покращити ефективність гідролізу та зменшити кількість ферментів. Багато грибів можуть розкладати різновиди целюлози і геміцелюлози шляхом секреції відповідних ферментів. Гриби роду *Trichoderma* доволі часто використовують для виробництва комерційної целюлози [3]. Проте ці ферменти потребують додаткової ферментної добавки для ефективного і повного гідролізу складних лігноцелюлозних матеріалів [4; 5]. Зважаючи на вищевикладене, відкритим залишається пошук альтернативних грибів для виробництва економічно ефективних

ферментів і розробки ефективніших ферментних сумішей.

Одним з таких грибів може бути *S. commune*, оскільки він володіє комплексом гідролітичних та окиснювальних ферментів [6; 7]. Необхідною умовою для використання *S. commune* як продуцента гідролітичних та окиснювальних ферментів є виділення його з природних умов, зберігання в чистій культурі та створення оптимальних умов культивування. Метою роботи було вивчення ростових процесів базидієвого гриба *S. commune* за дії лазерного опромінення.

АНАЛІЗ ОСТАННІХ ДОСЛІДЖЕНЬ І ПУБЛІКАЦІЙ

Наукова література надає багато інформації щодо спектральної чутливості грибів і механізмів фоторецепції світла [8]. Проте існує зовсім мало відомостей стосовно чутливості грибів до зеленого світла та його практичного використання під час їх культивування. Відомо, що зелене світло інгібувало проростання спор *Pleurotus sapindus* Kalchbr. [9]. Встановлено, що величина ефекту стимуляції залежить також від інтенсивності світла вказаної довжини хвилі [10]. Відомим є спосіб активації проростання базидіоспор *Hericium erinaceus* (Bull.) Pers. і росту, отриманих із цих базидіоспор, моноспорових культур, його основою є вплив на базидіоспори лазерного випромінювання (He-Ne-лазер) у червоній області спектра в дозах 45–230 мДж/см². Результатом є збільшення кількості пророслих спор у 10–10⁵ разів у різних штамів, зменшення часу їх проростання та збільшення швидкості росту моноспорових культур [11]. Нами не було знайдено даних щодо впливу когерентного світла на ростові процеси базидієвого гриба *S. commune*, що й визначило мету нашого дослідження.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Дослідження проводили на кафедрі ботаніки та екології Донецького національного університету імені Василя Стуса (ДонНУ імені Василя Стуса). Для дослі-

дження були використані три штами із колекції культур базидієвих грибів кафедри ботаніки та екології ДонНУ імені Василя Стуса, що входять до відділу *Basidiomycota*. Для визначення швидкості росту штамів S.c.-01, S.c.-02, S.c.-03 гриба *S. commune* міцелій культивували на агаризованому середовищі (КГА) з різними концентраціями глюкози (10, 8, 6 і 4 г/дм³). Центр поверхні щільного живильного середовища чашки Петрі інокулювали міцеліальним диском діаметром 5 мм, завжди однієї щільності і віку. Радіус колоній вимірювали у протилежних один до одного напрямках через визначені проміжки часу. Кількість вимірів залежала від швидкості росту гриба.

Швидкість радіального росту (Vr) розраховували за Е.Ф. Соломко [12]:

$$Vr = \frac{a-b}{t_1-t_0}, \quad (1)$$

де: a – радіус колонії наприкінці росту, мм; b – радіус колонії на початку фази лінійного росту, мм; t_1-t_0 – тривалість лінійного росту, діб.

З метою вивчення впливу лазерного опромінення на ріст штамів S.c.-01, S.c.-02, S.c.-03 гриба *S. commune* міцелій культивували впродовж 7 діб на КГА у стандартних чашках Петрі (діаметром 9 см). Для лазерного опромінення використовували пристрій, що був сконструйований співробітниками кафедри ботаніки та екології ДонНУ імені Василя Стуса. Пристрій складається з восьмигранної дзеркальної призми, що сприймає промінь LED лазерів: BRP-3010-5, з випромінюванням червоного спектра з довжиною хвилі 635 нм; ВВР-3010-5 з випромінюванням синього спектра з довжиною хвилі 405 нм та ВГР-3010-5 з випромінюванням зеленого спектра з довжиною хвилі 532 нм (виробник лазерів BOB LASER Co., Китай) і відбиває його на транспортерну стрічку, на якій розміщується чашка Петрі з міцелієм. Потужність кожного лазера становить 100 мВт. Пристрій має два електродвигуни, що відповідають за рух дзеркальної призми та транспортерної стрічки. Керування пристроєм здійснюється за допомо-

Опромінення міцелію досліджуваних видів макроміцетів

Варіант опромінення	Тривалість опромінення, с			Енергія опромінення, мДж/см ²
	Червоне світло (довжина хвилі 635 нм)	Синє світло (довжина хвилі 405 нм)	Зелене світло (довжина хвилі 532 нм)	
1 (контроль)	0	0	0	0
2	5	0	0	25,05
3	0	5	0	25,05
4	0	0	5	25,05
5	10	0	0	51,1
6	0	10	0	51,1
7	0	0	10	51,1
8	15	0	0	77,3
9	0	15	0	77,3
10	0	0	15	77,3
11	20	0	0	102,5
12	0	20	0	102,5
13	0	0	20	102,5

гою панелі управління, оснащеної кнопками для регулювання часу опромінення та вибору необхідного лазера з відповідною довжиною хвилі світла. Міцелій опромінювали у такий спосіб: чашка Петрі з міцелієм рухається на транспортній стрічці під променем світла з встановленою довжиною хвилі: 635, 405 та 532 нм, отримуючи необхідну енергію опромінення (25,05–102,5 мДж/см²), залежно від мети нашого дослідження. Опромінення міцелію тривало 5, 10, 15 та 20 с. Потім за допомогою стерильної сталевий трубки з колонії міцелію вирізали міцеліальні диски діаметром 5 мм та здійснювали інокуацію на живильне середовище (КГА) відповідного складу. Для інокуації контрольних чашок Петрі застосовували неопромінену культуру. Опромінення міцелію проводили в декількох варіантах (табл.).

Усі досліді проводили у трикратній повторюваності. Для визначення вірогідності впливу лазерного опромінення на активність каталази застосовували метод дисперсійного аналізу. Порівняння середніх значень здійснювали методом Даннета [13]. Обробку проводили за допомогою пакета статистичних програм, створених

на кафедрі фізіології та біохімії рослин ДонНУ імені Василя Стуса [14].

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

На сьогодні в літературних джерелах немає інформації щодо впливу світла на вказаний вид гриба. Нами вперше отримано результати, які дають підстави стверджувати, що найефективнішим для цього виду макроміцета є опромінення міцелію червоним світлом з довжиною хвилі 635 нм (енергія опромінення 51,1 мДж/см²) тривалістю 10 с. За цих умов опромінення оптимальна реакція у відповідь на дію світла спостерігалась для штаму S.c.-03 – швидкість радіального росту міцелію зросла на 84,3% порівняно з контролем. Для штамів S.c.-01 та S.c.-02 швидкість росту збільшилась на 73,5 та на 63,8% відповідно. Також нами було виявлено реакцію міцелію у відповідь на дію червоного світла з довжиною хвилі 635 нм (енергія опромінення 25,05 мДж/см²) тривалістю 5 с. Зокрема, за цих умов опромінення швидкість росту міцелію збільшилась на 46,8, 41,1 та 33,3% для штамів S.c.-03, S.c.-01 та S.c.-02 відповідно. Для макроміцета *S. commune* ефективним також виявилось лазерне опромі-

нення синім світлом з довжиною хвилі 405 нм (енергія опромінення 51,1 мДж/см²) тривалістю 10 с. Середня швидкість росту збільшилася для штамів S.c.-03, S.c.-01 та S.c.-02 на 71,8, 61,7 та 52,7% відповідно. Опромінення зеленим світлом з довжиною хвилі 532 нм (енергія опромінення 51,1 мДж/см²) тривалістю 10 с сприяло незначному збільшенню середньої швидкості росту міцелію для усіх досліджуваних штамів. Вплив на швидкість радіального росту усіх досліджуваних штамів *S. commune* опромінення тривалістю 5 с (виняток — довжина хвилі 635 нм), 15 та 20 с червоним (довжина хвилі 635 нм), синім (405 нм) та зеленим (532 нм) світлом з енергією опромінення у межах 25,05–102,5 мДж/см² був незначним (рис. 1 — а, б, в).

Зважаючи на результати проведених досліджень, для подальшої роботи було

відібрано штам S.c.-03 гриба *S. commune*, швидкість росту якого за опромінення червоним світлом з довжиною хвилі 635 нм (енергія опромінення 51,1 мДж/см²) тривалістю 10 с збільшувалася на 84,3%, а за опромінення синім світлом з довжиною хвилі 405 нм (енергія опромінення 51,1 мДж/см²) тривалістю 10 с — на 71,8%. Для інших досліджуваних штамів зміна швидкості радіального росту була дещо меншою. Це, можливо, пояснюється індивідуальною реакцією штамів на дію світла певної довжини хвилі, що обумовлено їхніми епігенетичними особливостями, сформованими внаслідок тривалого впливу різних екологічних чинників.

Відомо, що існує взаємозв'язок між фотоіндукованою активністю грибів та їх метаболізмом, відповідно, концентрації компонентів основних джерел живлення

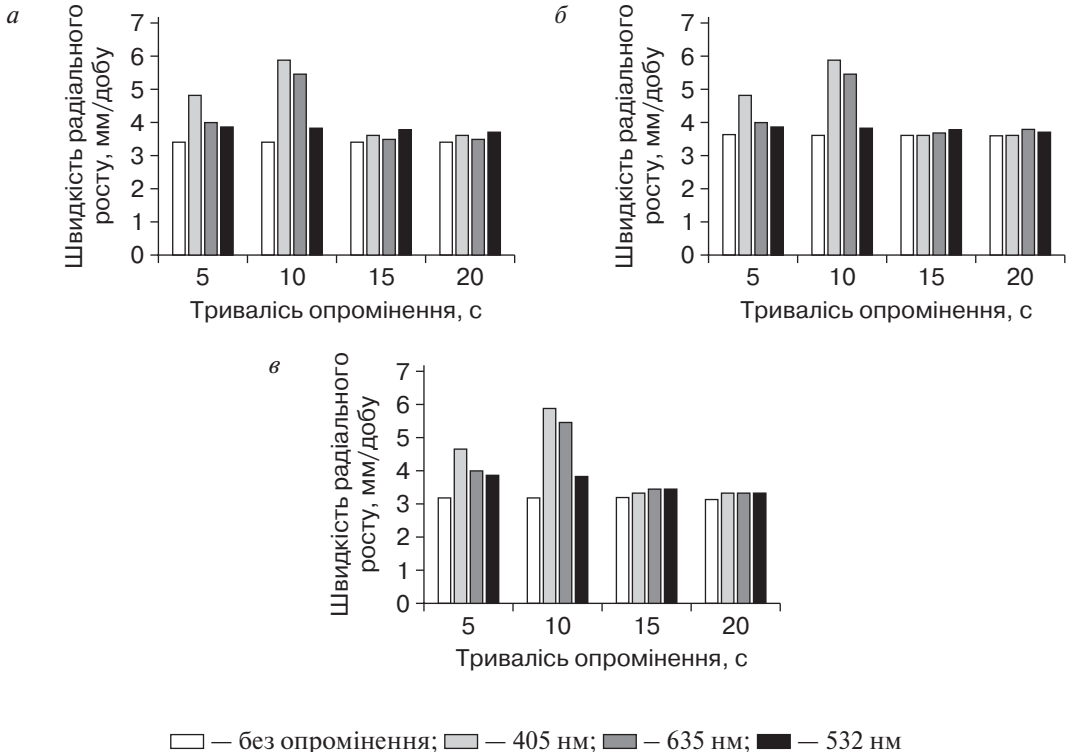


Рис. 1. Вплив лазерного опромінення на швидкість радіального росту міцелію гриба *Schizophyllum commune* на середовищі КГА: а — штам S.c.-01; б — штам S.c.-02; в — штам S.c.-03

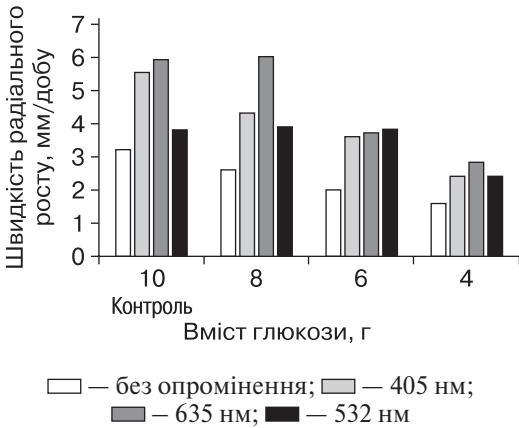


Рис. 2. Середня швидкість радіального росту міцелію *Schizophyllum commune* S.c.-03 за різних спектрів опромінення на середовищі КГА з різними концентраціями глюкози

можуть впливати на зміни інтенсивності росту і біологічну активність макроміцетів, що викликано лазерним опроміненням. Отже, нами було досліджено швидкість радіального росту міцелію, культивованого поверхнево за різних спектрів опромінення впродовж 10 с на середовищах з різними концентраціями глюкози (8, 6 і 4 г/дм³).

Було встановлено, що для штаму S.c.-03 гриба *S. commune* ефективним є використання середовища КГА з концентрацією глюкози 8 г/дм³ (замість 10 г/дм³ на контролі) у комплексі з опроміненням з червоним світлом довжиною хвилі 635 нм (енергія опромінення 51,1 мДж/см²). За цих умов швидкість радіального росту міцелію збільшилася на 87,5% порівняно з контролем. Лазерне опромінення синім світлом з довжиною хвилі 405 нм (енергія опромінення 51,1 мДж/см²) збільшило середню швидкість росту на 34,4%. Опромінення зеленим світлом з довжиною хвилі 532 нм (енергія опромінення 51,1 мДж/см²) сприяло збільшенню середньої швидкості росту міце-

лію лише на 21,8%. Використання середовища КГА з концентраціями 6 та 4 г/дм³ у комплексі з лазерним опромінення міцелію червоним (довжина хвилі 635 нм), синім (405 нм) та зеленим (532 нм) світлом з енергією опромінення 51,1 мДж/см² не спричиняло істотного впливу на середню швидкість радіального росту штаму S.c.-03 гриба *S. commune* (рис. 2).

ВИСНОВКИ

Аналіз результатів проведених нами досліджень щодо впливу лазерного опромінення міцелію базидієвого гриба *S. commune* надав змогу визначити ефективні режими фотоактивації міцелію когерентним світлом. Вперше отримано результати, які дають підстави стверджувати, що найефективнішим для усіх досліджуваних штамів цього виду є опромінення міцелію червоним світлом з довжиною хвилі 635 нм (енергія опромінення 51,1 мДж/см²) тривалістю 10 с. За цих умов опромінення для штамів S.c.-01, S.c.-02, S.c.-03 *S. commune* швидкість радіального росту міцелію збільшилася від 63,8 до 84,3%. Ефективним також виявилось лазерне опромінення міцелію синім світлом з довжиною хвилі 405 нм (енергія опромінення 51,1 мДж/см²) тривалістю 10 с. Середня швидкість росту збільшилася для штамів S.c.-03, S.c.-01 та S.c.-02 на 71,8–52,7%. Було визначено оптимальну концентрацію глюкози (8 г/дм³), значення якої є меншим від стандартного (10 г/дм³), що використовують для середовища КГА. Було встановлено, що використання середовища КГА з концентрацією глюкози 8 г/дм³ у комплексі з лазерним опроміненням червоним (довжина хвилі 635 нм) або синім (довжина хвилі 405 нм) з енергією опромінення 51,1 мДж/см² дає змогу значно підвищити середню швидкість радіального росту міцелію.

ЛІТЕРАТУРА

- Margeot A. et al. New improvements for lignocellulosic ethanol. *Curr Opin Biotechnol.* 2009. No. 20. P. 372–380.
- Van Dyk J.S., Pletschke B.I. A review of lignocellulose bioconversion using enzymatic hydrolysis and synergistic cooperation between enzymes-Factors affecting enzymes, conversion and synergy. *Biotechnology Advances.* 2012. No. 30. P. 1458–1480.
- Singhania R.R. et al. Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial

- cellulases. *Enzyme and Microbial Technology*. 2010. No. 46. P. 541–549.
4. Berlin A., Maximenko V., Gilkes N., Saddler J. Optimization of enzyme complexes for lignocellulose hydrolysis. *Biotechnology and Bioengineering*. 2007. No. 97. P. 287–296.
 5. Ahamed A., Vermette P. Enhanced enzyme production from mixed cultures of *Trichoderma reesei* RUT-C30 and *Aspergillus niger* LMA grown as fed batch in a stirred tank bioreactor. *Biochemical Engineering Journal*. 2008. No. 42. P. 41–46.
 6. Hummel K.M. et al. Extracellular protease production by submerged cultures of *Schizophyllum commune*. *Mycologia*. 1998. Vol. 90. No. 5. P. 883–889.
 7. Pandee P. et al. Production and properties of a fi-brinolytic enzyme by *Schizophyllum commune* BL23. *Songklanakarın Journal of Science and Technology*. 2008. Vol. 30. No. 4. P. 447–453.
 8. Corrochano L.M. Fungal photoreceptors: sensory molecules for fungal development and behaviour. *Photochemical and Photobiological Sciences*. 2007. No. 6. P. 725–736.
 9. McCracken F.I. Some factors affecting basidiospore germination of *Pleurotus sapidus*. *Canadian Journal of Botany*. 1982. Vol. 60. No. 9. P. 1658–1661.
 10. Кару Т.І. Универсальный клеточный механизм лазерной биостимуляции: фотоактивация энзима дыхательной цепи цитохром-оксидазы. *Голографія: фундаментальні дослідження, інноваційні проекти і нанотехнології*: матеріали XXVI школи по когерентній оптиці і голографії. Иркутск, 2008. С. 156–175.
 11. Поединок Н.Л. Использование искусственного света в биотехнологиях культивирования грибов. *Biotechnologia Acta*. 2013. Vol. 6. No. 6. P. 58–70.
 12. Соломко Е.Ф., Ломберг М.Л., Митропольська Н.Ю., Чоловська О.В. Ріст окремих видів лікарських макроміцетів на поживних середовищах різного складу. *Український ботанічний журнал*. 2000. Вип. 57. № 2. С. 119–125.
 13. Приседський Ю.Г. Пакет програм для проведення статистичної обробки результатів біологічних експериментів. Донецьк: ДонНУ, 2005. 84 с.
 14. Приседський Ю.Г. Статистична обробка результатів біологічних експериментів. Донецьк: Каснопея, 1999. 210 с.

REFERENCES

1. Margeot, A. et al (2009). New improvements for lignocellulosic ethanol. *Curr Opin Biotechnol*, 20, 372–380 [in English].
2. Van Dyk, J.S. & Pletschke, B.I. (2012). A review of lignocellulose bioconversion using enzymatic hydrolysis and synergistic cooperation between enzymes-Factors affecting enzymes, conversion and synergy. *Biotechnology Advances*, 30, 1458–1480 [in English].
3. Singhanıa, R.R. et al. (2010). Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases. *Enzyme and Microbial Technology*, 46, 541–549 [in English].
4. Berlin, A., Maximenko, V., Gilkes, N. & Saddler, J. (2007). Optimization of enzyme complexes for lignocellulose hydrolysis. *Biotechnology and Bioengineering*, 97, 287–296 [in English].
5. Ahamed, A. & Vermette, P. (2008). Enhanced enzyme production from mixed cultures of *Trichoderma reesei* RUT-C30 and *Aspergillus niger* LMA grown as fed batch in a stirred tank bioreactor. *Biochemical Engineering Journal*, 42, 41–46 [in English].
6. Hummel, K.M. et al. (1998). Extracellular protease production by submerged cultures of *Schizophyllum commune*. *Mycologia*, 90 (5), 883–889 [in English].
7. Pandee, P. et al (2008). Production and properties of a fi-brinolytic enzyme by *Schizophyllum commune* BL23. *Songklanakarın Journal of Science and Technology*, 30 (4), 447–453 [in English].
8. Corrochano, L.M. (2007). Fungal photoreceptors: sensory molecules for fungal development and behaviour. *Photochemical and Photobiological Sciences*, 6, 725–736 [in English].
9. McCracken, F.I. (1982). Some factors affecting basidiospore germination of *Pleurotus sapidus*. *Canadian Journal of Botany*, 60 (9), 1658–1661 [in English].
10. Karu, T.Y. (2008). Unıversalnyj kletocnyj mehanızm lazernoj byostımulıacıy: fotoaktıvacıyua enzıma dıhatelnoj cerı cytochrom-oksydazy [Universal cellular mechanism of laser biostimulation: photoactivation of the enzyme of the respiratory chain of cytochrome oxidase]. *Golografiya: fundamental'nyje issledovaniya, innovatsionnyje projekty i nanotekhnologii. Materialy KHKHVI shkoly po kogerentnoy optike i golografii [Holography: fundamental research, innovative projects and nanotechnologies. XXVI School of Coherent Optics and Holography]* (pp. 156–175). Irkutsk [in Russian].
11. Poyedynok, N.L. (2013). Yspolzovanye yskusstvennoho sveta v byotekhnolohıyakh kulıtyvırovaniya hrybov [The use of artificial light in biotechnology cultivation of mushrooms]. *Biotechnologia Acta*, 6 (6), 58–70 [in Russian].
12. Solomko, E.F., Lomberg, M.L., Mytropolska, N.Yu. & Cholovska, O.V. (2000). Rıst okremıyx vydıv lıkar-skyx makromıcetıv na pozhyvnyx seredovyshhax rıznoho skladu [Growth of certain species of medicinal macromycetes on nutrient media of different composition]. *Ukrayıns'kyı botanıchnıy zhurnal – Ukrainian Botanical Journal*, 57 (2), 119–125 [in Ukrainian].
13. Prysedskıy, Yu.H. (2005). *Paket prohram dlja provedennıya statıstıchnoji obrobky rezultatıv bıolohıchnıykh eksperymentıv [The software package for the statistical analysis of the results of biological experiments. Tutorial]*. Doneck [in Ukrainian].
14. Prysedskıy, Yu.H. (1999). *Statıstıchna obrobka rezultatıv bıolohıchnıykh eksperymentıv [Statistical processing of the results of biological experiments]*. Doneck [in Ukrainian].

Стаття надійшла до редакції журналу 10.06.2020