



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 76305

(13) C2

(51) МПК (2006)  
A01G 1/04МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІОПИС  
ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД(54) СПОСІБ ОБРОБКИ ПОСІВНОГО МІЦЕЛІЮ ВИЩОГО БАЗИДІАЛЬНОГО ГРИБА *PLEUROTUS OSTREATUS*

1

2

(21) 20040806913

(22) 18.08.2004

(24) 17.07.2006

(46) 17.07.2006, Бюл. №7, 2006р.

(72) Поєдинок Наталія Леонідівна, Бухало Ася Сергіївна, Негрійко Анатолій Михайлович

(73) Поєдинок Наталія Леонідівна, Негрійко Анатолій Михайлович

(56) UA 53900 A, 05.02.2002

UA 53880 A, 10.01.2002

UA 53867 A, 05.12.2001

JP 2001-269053 A, 02.01.2001

JP 2001-269054 A, 02.01.2002

(57) Спосіб обробки посівного міцелію вищого базидіального гриба *Pleurotus ostreatus* шляхом впливу низькоінтенсивного лазерного випромінювання у червоній частині спектра (довжина хвилі 633нм) на посівний міцелій гриба, який **відрізняється** тим, що впливу піддається міцелій гриба, вирощений глибинним способом на рідкому середовищі при потужності випромінювання  $W=45\text{мВт}$  протягом 8 хвилин.

Винахід підноситься до біотехнології. а зокрема способу підвищення рівня антимікробної активності гриба *Pleurotus ostreatus*.

Відомі різні способи підвищення антимікробної активності бактерій і грибів [Егоров А.М., Сазыкин Ю.О. Антимікробные агенты в будущем Вклад геномики в их создание. // Антибиотики и химиотерапия. 1999. Т. 44, № 12. стр. 5-14; Производство антибиотиков. Под ред. С.М. Навашина. М. Медицина, 1970: Теофилова Е.П. Современные направления в изучении биологической активности веществ базидиальных грибов. //Прикладная биохимия и микробиология. 1998. Т. 34, № 6. стр. 594-608]:

зміна компонентів живильних середовищ;  
харчові добавки по ходу ведення процесу біосинтезу;

оптимізація масообміну, що сприяє поглинанню живильних речовин продуцентом і асрування;

контроль в'язкості середовища;  
вибір штаму (природна селекція);

індукований мутагенез;

генетична модифікація штаму-продуцента.

Комплексний підхід у рішенні цих питань, як правило, дає найбільший ефект. Оптимальне сполучення перерахованих методів і підходів при розробці технологічних параметрів процесу культивування дозволяє в десятки разів збільшити біологічну продуктивність мікроорганізмів.

Світло (у видимій частині спектра) уже давно відомий у біотехнології як екологічно чистий природний регуляторний фактор. Його використовують у технологіях глибинного культивування міцеліа-

льних грибів (р. *Aspergillus*) [Использование видимого света в биотехнологии. 2002. Современная микология в России. 1 съезд микологов. С.294]. Було встановлено, що світло 650 і 530нм суттєво впливає на утворення регуляторів росту й інтенсивність ростових процесів цього гриба, а також є модифікатором ліпідного і вуглеводного складу грибних спор. Зміни, викликані світлом, мали пролонговану дію і можуть передаватися в наступну онтогенетичну стадію від спор до міцелію. У міцелія, вирощеного з модифікованих під дією світла спор, також зберігається здатність до прискореного росту, спостерігається зміна у вуглеводному і ліпідному складі, а отже й у складі й активності ферментів, що мають пряме відношення до метаболізму. Крім того, змінювалась й активність екзоферментів, а саме целлюлозолітичного комплексу. Показано, що характер біохімічних змін у клітках грибів залежить як від довжини хвилі, так і від інтенсивності світла, причому зниження інтенсивності світла супроводжувалося посиленням його регуляторного впливу. Таким чином, варіюючи параметри освітлення можна одержати спори заданої якості.

Вплив світлового випромінювання з довжиною хвилі 448нм через 120-130 годин після інокуляції сприяло збільшенню утворення плодових тіл *Schizophyllum commune* пропорційно експозиції в інтервалі 0-550 сек. [Perkins J.H. Morphogenesis in *Schizophyllum commune*. 1. Effects of white light //Plant Physiol. - 1969. - 44, n 12. - P. 1706-1711; Perkins J.H. Morphogenesis in *Schizophyllum commune*. 11. Effects of monochromatic light //Plant Physiol.- 1969.

(13) C2

(11) 76305

(19) UA

- 44. n 12.-P. 1712-1726].

Для *Flammulina velutipes* найбільш ефективним стимулятором біологічної активності виявилось світло з довжиною хвилі 550-660нм [Aschan-Aberg K. The production of trust-bodies in *Gollybia velutipes*. III. Influence of the qualsty of light //Physiol. Plant. - 1960. - 13. N 2. - P. 276-279].

Недоліком цих методів можна вважати обмежену можливість цілеспрямованого впливу на внутрішньоклітинні процеси і регулювання процесів біосинтезу при використанні звичайних некогерентних джерел світла.

Відомі технології, що використовують лазери, як джерела світла для підвищення біосинтетичної активності різних живих організмів. Перевагою лазерного випромінювання є можливість створення високої спектральної яркості випромінювання, яка не досягається при використанні звичайних некогерентних джерел світла і можливість цілеспрямованого впливу лазера на внутрішньоклітинні процеси і регулювання процесів біосинтезу, обумовлену селективним впливом монохроматичного світла на електрони фоточутливих структур і фоторецептори в мікробіологічних об'єктах і внутрішньоклітинні процеси в мікроорганізмів за участю хромофорних структур і збудження часток (радикалів, перекисів).

Відомі факти, що свідчать про стимулюючу дію УФ-променів (джерело - лазер ЛГИ-21) на біологічну активність та урожайність штамів *Agaricus bisporus* і *Polyporus arcularius* [Н. А. Бисько, А. С. Бухало, С. П. Вассер і ін. Вищі їстівні базидіоміцети в поверхневій та глибинній культурі. Наукова Думка. 1983]. Міцелій гриба *A. bisporus* інокулювали на живильне середовище (сусло-агар) у кварцеві пробірки і поміщали на 3 доби в термостат, де підтримувалася температура на рівні 24-25°C. На 4-у добу колонії гриба, які досягали 1-2мм в діаметрі, опромінювали, використовуючи експозиції 10сек. 1 і 5хв. Стимулююча дія лазерного опромінювання зростала зі збільшенням щільності енергії випромінювання в межах від 0.16 до 4.80Дж/см<sup>2</sup>. При опроміненні міцелію гливи звичайної γ променями (5-10 крад) спостерігали деяке збільшення урожайності плодових тіл [Rygava et al. Vliv ozareni mycelia nf vynosi hlivy ustricne. Pest. Zamh. 1975.- 13. N I. - p. 85-86].

Для *Polyptirus arcularius* найбільш ефективним у якості морфогенетичного фактора виявилось УФ-випромінювання з довжиною хвилі 350-395нм [Kitamoto J. et. al. An action spectrum for photoinduction of pileus formation in basidiomycete. *Favolus arcularius* //Planta. - 1973.- 119.N I. - P.81-84].

Недоліком цих способів маємо вважати таке: УФ-випромінювання є одним із видів електромагнітних випромінювань по довжині хвилі, що розташоване між видимим світлом і рентгєнівськими променями. Збудження атомів в макромолекулах при УФ-випромінюванні робить їх високореакційноздатними і викликає різноманітні фотохімічні реакції. Найважливішою з них є димеризація пиримідинів. Це супроводжується розірванням водневих зв'язків між ланками ДНК та локальною денаатурацією дволанкової молекули ДНК, то призводить до зміни її конфігурації. Іонізація атомів, що входять до складу макромолекули ДНК, під

впливом у променів дає поштовх до проходження різноманітних радіаційно-хімічних реакцій, що ведуть до змін їх макромолекул. Як наслідок цих процесів - виникнення небажаних мутацій, зникнення корисних ознак та поява небажаних [І. А. Захаров, С. В. Ковальюкова. Т. І. Кожина і ін. Мутаційний процес у грибів. Наука, 1980].

Відомі способи стимулювання росту дріжджів і *E. coli* шляхом впливу низькоінтенсивною лазерною випромінювання у видимій частині спектру (He-Ne лазер 632.8нм). Величина ефекту стимуляції залежить також і від інтенсивності світла даної довжини хвилі [Т.І.Кару. Про молекулярний механізм терапевтичної дії випромінювання низькоінтенсивною лазерного світла. Докл. Акад. Наук 1986. Т.291. №5. стор. 1245-49.]

Відомий спосіб активації проростання базидіоспор *Hericum erinaceus* і росту, отриманих з цих базидіоспор моноспорових культур, який оснований на впливі на базидіоспори лазерного випромінювання (He-Ne лазер) у червоній області спектру в дозах від 45 до 230мДж/см<sup>2</sup>. В результаті проведених маніпуляцій збільшується кількість пророслих спор у 10-10<sup>-5</sup> разів у різних штамів, зменшується час їх проростання, збільшується швидкість росту моноспорових культур [Деклараційний Патент України № 36013 А від 16.04.2001р.].

Відомі способи інтенсифікації росту та плодоношення вищих базидіальних їстівних грибів *Pleurotus ostreatus*, *Lentinus edodes* та *Hericum erinaceus*, які базуються на впливі на посівний міцелій цих видів грибів лазерного світла у червоній та зеленій областях спектру [Деклараційний Патент України №53880 від 17.02.2003; Деклараційний Патент України №53900 від 17.02.2003; Деклараційний Патент України №53867 від 17.02.2003: Н.Л. Поєдинок и др. Использование лазерного излучения при культивировании некоторых видов съедобных грибов //Биотехнология, 2003. № 3: Fan Cihui. Yan nan Zhi wii yan jiu //Acta bot. Yunnamica. - 1983. - 5. N 2. - P. 201-205].

Однак, до сьогоднішнього дня не вивчений вплив низького-інтенсивного лазерного світла на антимікробну активність вищих базидіоміцетів.

В основу винаходу способу підвищення антимікробної активності *Pleurotiis ostreutus* у глибинній культурі покладена задача активізації біологічної активності грибного міцелію впливом лазерного випромінювання (He-Ne лазер) у червоній частині спектра (довжини хвилі 633нм) на посівний інокулюм у режимі W=45мвт протягом 8 хвилин. У результаті проведених маніпуляцій антимікробна активність грибного міцелію вирощеного в глибинній культурі до ряду тест-культур мікроорганізмів підвищується в кілька разів, накопичення грибної біомаси збільшується на 10%.

Поставлена задача вирішується шляхом впливу лазерного випромінювання (He-Ne лазер) у червоній частині спектра (довжина хвилі 633нм) на посівний інокулюм > режимі W=45мвт протягом 8 хвилин. Посівний міцелій вирощували глибинним способом на рідкому середовищі (8° пивне сусло). Отриманий міцелій разом з культуральною рідиною поміщали тонким шаром на дно стерильної чашки Петри й опромінювали вищевказаним способом. Відразу після лазерної обробки міцелій у

кількості 5% від обсягу середовища висівали на нове рідке живильне середовище (10 пивне сусло) для ферментації. Відбір проб робили на 6, 17 і 21 доба ферментації.

Визначення антимікробної активності ті проводили у відношенні 12 тест-організмів методом дифузії в агарі. Антимікробну активність визначали в культуральній рідині й в екстрактах міцелію. Культуральну рідину закапували в лунки. Диски з нанесеними розчинами концентратів підсушували і поміщали на газони тест-організмів. Після 20 годин інкубації визначали зони затримки росту тест-організмів.

Суть винаходу, що заявляється, пояснюється прикладами.

Приклади застосування лазерною випромінювання для збільшення виходу біомаси при глибинному культивуванні. Посівний міцелій вирощували на рідкому пивному суслі 8° по Балингу на качалці (120-150про/хв) протягом 5 діб. Опромінювали вищевказаним способом і інокулювали колби з ферментаційним середовищем вищевказаного складу і інкубували на качалці в тім же режимі.

Отримані результати (Таблиця 1) дозволяють затверджувати, що опромінення інтенсифікує міцеліальний ріст гриба на зазначеному середовищі і сприяє накопиченню більшої кількості (на 10%) біомаси на одиницю об'єму середовища у всіх варіантах досліду.

Таблиця 1

Накопичення біомаси при глибинному культивуванні опроміненого і неопроміненого міцелію *Pleurotus ostreatus*

Час інкубації, доба	Опромінений міцелій			Неопромінений міцелій		
	7	14	21	7	14	21
Середня кількість сухого міцелію на колбу, г	6,80	7,95	10,4	6,32	6,52	9,10
Середня кількість кислого міцелію на колбу, мг	200	136	133	130	130	190

Приклади застосування низького-інтенсивного лазерного світла для підвищення рівня антимікробної активності *Pleurotus ostreatus* при глибинному культивуванні. Антимікробну активність визначали паралельно з визначенням кількості біомаси в тих же колбах вищевказаними методами.

Порівняння антимікробної активності в досліді і контролі (Таблиця 2) дозволило установити, що лазерне опромінення інокулюма в зазначеному режимі дозволяє на 10-20% збільшити антимікробну активність стосовно наступних мікроорганізмів: MRSA, MSSA, *Bacillus mycoides*, *Bacillus pumilus*,

*Micrococcus luteus*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Comamonas terrigena*, *Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli*.

Представлені в прикладах показники застосування лазерного випромінювання для підвищення біологічної активності вищою базидіального гриба *Pleurotus ostreatus* показують, що лазерне випромінювання з довжиною хвилі 633нм у режимі W=45мвт протягом 8 хвилин дозволяє прискорити ріст міцелію і накопичення біомаси на 10%, збільшити антимікробну активність до досліджених тест-організмів на 10-20%.

Таблиця 2

Антимікробна активність опроміненого і неопроміненого міцелію *Pleurotus ostreatus* (діаметри затримки зон росту тест-мікроорганізмів у мм)

Тест-культура	Опромінений міцелій			Неопромінений міцелій		
	7 доби	14 доби	21 доба	7 доби	14 доби	21 доба
MRSA	8	18	17	7	13	16
MSSA	9	11	11	7	10	11
<i>Bacillus mycoides</i>	12	16	18	8	16	16
<i>Bacillus pumilus</i>	9	11	12	-	11	9
<i>Micrococcus luteus</i>	8	8(9)	12(14)	7	-(7)	7(10)
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Сліди	10	9	-	7	7
<i>Comamonas terrigena</i>	8	8	11	-	7	9
<i>E. coli</i>	-	-(11)	8(15)	-	-(9)	7(13)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	8(14)	12(13)	-	8(15)	7(13)
<i>Sacchar. Cerevis.</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Candida albicans</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Aspergillus niger</i>	-	-	-	-	-	-

Примітка: (-) - відсутність антимікробної активності;  
- у дужках приведені діаметри зон гноблення росту (мм)

