

НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК УКРАИНЫ
ИНСТИТУТ БОТАНИКИ ИМ. Н.Г. ХОЛОДНОГО
ГУ «ИНСТИТУТ ПИЩЕВОЙ БИОТЕХНОЛОГИИ И ГЕНОМИКИ НАН
УКРАИНЫ»

На правах рукописи

ПОЕДИНОК НАТАЛЬЯ ЛЕОНИДОВНА

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

**БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ИНТЕНСИФИКАЦИИ
КУЛЬТИВИРОВАНИЯ СЪЕДОБНЫХ И ЛЕКАРСТВЕННЫХ
МАКРОМИЦЕТОВ С ПОМОЩЬЮ СВЕТА НИЗКОЙ
ИНТЕНСИВНОСТИ**

03.00.20 – биотехнология

Диссертация на соискание научной степени доктора биологических наук

**Научный консультант
Дудка Ирина Александровна
доктор биологических наук, профессор
член-корреспондент НАН Украины**

Киев — 2015

СОДЕРЖАНИЕ

ПЕРЕЧЕНЬ УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	6
ВВЕДЕНИЕ	7
РАЗДЕЛ 1. МАКРОМИЦЕТЫ – ОБЪЕКТЫ БИОТЕХНОЛОГИИ И ФАКТОРЫ РЕГУЛЯЦИИ ИХ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ (обзор литературы).....	23
1.1. Макромицеты – продуценты пищевой биомассы и биологически активных веществ.....	24
1.1.1. Определение термина «макромицеты».....	24
1.1.2.Морфогенез макромицетов	24
1.1.3. Питательная ценность макромицетов.....	30
1.1.4. Биологически активные вещества культивируемых макромицетов и их лечебные свойства.....	39
1.2. Культивирование макромицетов.....	46
1.2.1. Принципы культивирования.....	46
1.2.2.Современные биотехнологические тенденции интенсивного культивирования съедобных и лекарственных грибов.....	48
1.2.3. Твердофазная ферментация.....	48
1.2.4. Глубинное культивирование.....	50
1.3. Факторы регуляции роста, биосинтетической активности макромицетов и методы их интенсификации.....	55
1.3.1 Оптимизация питательных сред.....	56
1.3.2 Стимуляторы роста и биосинтетической активности.....	57
1.4. Фотоморфогенез грибов.....	59
1.5. Механизмы фоторецепции у грибов.....	64
1.6. Роль источников искусственного света в исследованиях грибов.....	68
1.7. Фоторегуляция метаболизма грибов.....	69
1.8. Опыт и перспективы использования искусственного света при культивировании грибов.....	74

РАЗДЕЛ 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	82
2.1. Объекты исследования.....	82
2.2. Методы культивирования макромицетов.....	88
2.3. Определение параметров роста макромицетов.....	88
2.4. Получение плодовых тел и спорового материала макромицетов.....	90
2.5. Проращивание спор и получение моноспоровых изолятов.....	91
2.6. Анализ биомассы и культуральных жидкостей.....	92
2.7. Системы облучения макромицетов.....	106
2.8. Облучение макромицетов.....	109
2.9. Определение эффективности световых воздействий.....	112
2.10. Статистическая обработка результатов.....	112
РАЗДЕЛ 3. ПОДГОТОВКА И АКТИВАЦИЯ ПОСЕВНОГО МАТЕРИАЛА ..	113
3.1. Изучение фоточувствительности спор, закономерностей стимуляции их прорастания и роста моноспоровых изолятов.....	114
3.2. Изучение закономерностей стимуляции вегетативного мицелия макромицетов на разных стадиях морфогенеза и трансформации фотоиндуцированных изменений.....	130
3.3. Определение эффективности использования активированного посевного мицелия для получения биомассы макромицетов.....	141
3.4. Динамика фотоиндуцированной активности посевного мицелия в процессе хранения и пересевах.	145
3.4.1. Динамика фотоиндуцированной активности посевного мицелия в процессе хранения.	145
3.4.2. Динамика фотоиндуцированной активности посевного мицелия при пересевах.	147
РАЗДЕЛ 4. ФАКТОРЫ, ОПРЕДЕЛЯЮЩИЕ РЕАЛИЗАЦИЮ ФОТОСТИМУЛИРУЮЩЕГО ЭФФЕКТА В ПРОЦЕССЕ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ.....	153
4.1. Влияние способа культивирования на фотоиндуцированную ростовую активность макромицетов.	154

4.2. Влияние концентраций глюкозы на фотоиндуцированную ростовую активность макромицетов.	161
4.3 Влияние концентраций источника азота на фотоиндуцированную ростовую активность макромицетов.	165
РАЗДЕЛ 5. ИНТЕНСИФИКАЦИЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ СЪЕДОБНЫХ И ЛЕКАРСТВЕННЫХ МАКРОМИЦЕТОВ ПРИ ПОВЕРХНОСТНОМ И ГЛУБИННОМ КУЛЬТИВИРОВАНИИ НА ЖИДКИХ СРЕДАХ.....	167
5.1. Динамика накопления биомассы макромицетами при использовании фотоактивированного посевного мицелия.....	168
5.2. Влияние облучения на синтез полисахаридов.....	170
5.3. Влияние облучения на углеводный состав полисахаридов <i>G. lucidum</i> , <i>L.</i> <i>edodes</i> и <i>C. militaris</i>	177
5.4. Влияние облучения на жирнокислотный состав липидов <i>G. lucidum</i> , <i>C.</i> <i>sinensis</i> и <i>C. militaris</i>	188
5.5. Влияние облучения на физиологически активные соединения <i>G. lucidum</i> и <i>C. militaris</i>	196
5.6. Влияние света на синтез меланинов и ферментативную активность <i>I.</i> <i>obliquus</i>	197
5.7. Индукция антимикробной активности макромицетов светом низкой интенсивности.....	216
РАЗДЕЛ 6. ИНТЕНСИФИКАЦИЯ ТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ЭТАПОВ ТВЕРДОФАЗНОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ МАКРОМИЦЕТОВ.....	234
6.1. Изучение динамики развития макромицетов на агаризованных питательных средах.....	238
6.2. Методы интенсификации технологических этапов культивирования макромицетов на растительных субстратах.....	243
РАЗДЕЛ 7. ПРАКТИЧЕСКОЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	263
7.1. Методы фотоактивации прорастания базидиоспор и роста моноспоровых изолятов.....	269

7.2. Методы фотоактивации посевного мицелия для стимуляции роста макромицетов в технологиях глубинного культивирования.	271
7.3. Методы фотоактивации посевного мицелия для стимуляции синтеза полисахаридов макромицетами в технологиях глубинного культивирования.....	274
7.4. Методы фотоактивации посевного мицелия <i>I. obliquus</i> для стимуляции биосинтетической активности в технологиях глубинного культивирования.....	275
7.5. Методы фотоактивации посевного мицелия для стимуляции антимикробной активности макромицетов в технологиях глубинного культивирования.....	279
7.6. Методы фотоактивации посевного мицелия для интенсификации технологических этапов твердофазного культивирования макромицетов.	281
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	285
ВЫВОДЫ	304
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ.....	308

ПЕРЕЧЕНЬ УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АОА – антиокислительная активность

АСБ – абсолютно сухая биомасса

БАВ – биологически активные вещества

КЭ – кукурузный экстракт

K_r – скорость радиального роста

НИЛИ – низкоинтенсивное лазерное излучение

РВ – редуцирующие вещества

СН – степень ненасыщенности

ФДЭ – фотодиэлектрический эффект

ФЛ – фосфолипиды

LED – свет излучающие диоды

Y – экономический коэффициент

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность работы. Макромицеты (грибы с крупными, хорошо заметными невооруженным глазом плодовыми телами) являются источником активных компонентов, которые содержатся в аскомах и базидиомах, глубинно культивируемом мицелии и культуральной жидкости. В настоящее время их используют в качестве диетического питания (мировое производство грибов в 2012 году достигло 30 млн. тонн), пищевых добавок (потребление их стремительно растет и рыночная продукция оценивается более, чем 18 миллиардов долларов США в год), препаратов, называемых «грибные лекарственные препараты», биопрепаратов для защиты растений с инсектицидной, фунгицидной, бактерицидной, гербицидной и антивирусной активностью и космоцевтиков [245; 363; 626; 627]. Поэтому разработка новых интенсивных биотехнологий культивирования разных видов макромицетов с целью получения как плодовых тел так и биологически активных соединений с каждым годом становится все более актуальной. Создание новых технологий требует глубокого изучения факторов, регулирующих функции организма гриба, что позволит с максимальной эффективностью использовать их природный потенциал и обеспечить получение продукции желаемого качества в необходимом количестве. Учитывая ухудшение экологической ситуации, особенно остро возникает проблема поиска экологически чистых регуляторов роста и биологической активности макромицетов-продуцентов, как основы для создания высокоэффективных биотехнологий. Одним из таких экологически чистых факторов регуляции является свет.

В то время как мировая наука и практика разработала целый ряд технологий фотоинтенсификации и регуляции развития растений, которые используют как в оранжереях и тепличных хозяйствах, так при ускоренном выведении новых сортов, размножении ценного посевного материала, при теоретических исследованиях в области физиологии растений, биофизики и

генетики [147], применение искусственного света в промышленном грибоводстве ограничено использованием люминесцентных ламп, натриевых ламп высокого давления, метало-галогенных ламп, а при глубинном культивировании практически не применяется вовсе.

В то же время, для большинства макромицетов, несмотря на то, что они не относятся к фототрофным организмам, свет служит важным морфогенетическим фактором. Несмотря на значительный прогресс, который наблюдается в последние годы при изучении фоторецепции и фотоморфогенеза грибов, и накопленный фактический материал [83; 84; 257; 258; 260; 353; 354; 406; 594], важные вопросы, без которых невозможно практическое использование искусственного света в биотехнологиях культивирования съедобных и лекарственных макромицетов, остаются недостаточно изученными.

Использование света сильно осложняется неоднозначностью этого фактора для разных грибов и многообразием эффектов его проявления [217; 499]. Известно, что макромицеты в значительной степени отличаются по количеству света, необходимого для их нормального развития [260; 472; 473; 475; 476; 505]. На довольно ограниченном числе видов проводились исследования по выявлению наиболее активных участков спектра [83; 182; 183; 228; 235; 257; 258; 259; 260]. Остаётся дискуссионным вопрос, является ли когерентность лазерного излучения определяющей при воздействии на биологические объекты [77; 87; 93; 357; 391; 392; 552; 653]. При изучении влияния лазерного света на разные биологические объекты некоторыми исследователями установлена более высокая чувствительность клеток к импульсному излучению [145]. Сегодня экспериментально показано, что лазерные импульсы фемтосекундной длительности могут применяться для управления фотохимическими процессами в биологических молекулах [527; 229]. Зависимость биологического действия от длительности светового импульса экспериментально показана на живых клетках [76]. Однако, полностью отсутствует информация о чувствительности грибов к такого рода

излучениям. Это делает актуальными для макромицетов вопросы чувствительности к свету не только разных диапазонов длин волн, но и различной природы.

Известно, что чувствительность грибов к свету меняется в процессе онтогенеза [260; 471; 472; 473; 474 475], но практически отсутствует информация о времени появления у них фоточувствительности и её динамики в процессе культивирования. Новые знания о чувствительности съедобных и лекарственных макромицетов к искусственному свету на разных технологических этапах культивирования позволят более эффективно использовать природный потенциал этих грибов, и найдут практическое применение при создании высокоэффективных биотехнологий.

В связи с увеличением антропогенной нагрузки на окружающую среду современная наука и практика уделяет все больше внимания воспроизводству в культуре различных видов макромицетов и сохранению их в специальных коллекциях. Среди них есть не только продуценты биологически активных субстанций, с которыми работают селекционеры и генетики, создавая высокопродуктивные штаммы, но и исчезающие виды. При этом важную роль в этих работах имеет споровый материал, который является основой для генетических исследований грибов и интродукции их в естественные места обитания для сохранения биоразнообразия. И на этих этапах возникают проблемы с проращиванием спор в лабораторных условиях. Поэтому многие исследователи сосредоточены на изучении факторов, индуцирующих активность спор [47; 111; 113; 116; 120; 134; 140; 167; 168; 197; 231; 286; 312; 313; 314; 324; 325; 378; 400; 407; 440; 506; 523; 651; 654] но при их проращивании сталкиваются с значительными трудностями [24; 59; 105; 181; 405]. Вопрос активации их прорастания остается актуальным и сегодня.

Несмотря на возрастание интереса к использованию макромицетов в качестве продуцентов биологически активных веществ, влияние такого

важного регулятора их жизнедеятельности, как свет, на биосинтетическую активность макромицетов в настоящее время изучено весьма незначительно.

В работах исследователей, проводивших изучение влияния света на микромицеты, было признано, что характер среды, на которой выращивается гриб, и способ культивирования определяют, будет ли свет стимулировать или уменьшать темп роста грибов [236; 252; 310; 311; 368; 558; 594; 595; 596; 597]. Однако, остаются неисследованными факторы, влияющие на реализацию фотоиндуцированных изменений у макромицетов. Определение факторов, стимулирующих позитивное влияние света на ростовые процессы макромицетов, является основой для создания новых экологически чистых высокоэффективных биотехнологий целенаправленного синтеза ценных вторичных метаболитов.

В настоящее время всё больше исследователей склонны признавать, что пусковой механизм индуцированных низкоинтенсивным светом биологических реакций является единым, универсальным для всех живых организмов и обусловлен, скорее всего, универсальностью механизмов поддержания гомеостаза [387; 388; 392]. При этом наблюдается нелинейность дозовых эффектов на живые организмы, выражающаяся в виде непропорционально сильных биологических эффектов от воздействия небольших доз, что связано с повышенной чувствительностью организмов к слабым (информационным) воздействиям. Первичные химические реакции сопровождаются появлением свободных радикалов, в небольшом количестве, которые в свою очередь запускают процессы окисления биосубстратов, имеющих цепной характер. Этот момент позволяет понять переключающий (триггерный) механизм многократного усиления первичного эффекта низкоинтенсивного излучения. Известно, что основные физические и химические изменения, вызванные светом в фотоакцепторных молекулах, сопровождаются каскадом биохимических реакций в клетке, которые не требуют дальнейшей активизации светом (цепи передачи и усиления фотосигнала или клеточная сигнализация). Низкоинтенсивное излучение

стимулирует метаболическую активность клетки. Стимуляция биосинтетических процессов может быть одним из важных моментов, определяющих действие низкоинтенсивного излучения лазера на важнейшие функции клеток и тканей, процессы жизнедеятельности и регенерации (восстановления). Низкоинтенсивное световое воздействие приводит к увеличению содержания в ядрах клеток ДНК и РНК, что свидетельствует об интенсификации процессов транскрипции генов, регулирующих деление клеток.

Это первый этап процесса биосинтеза белков. Сигнальная индукция каскада биохимических изменений, регулирующих развитие, обнаружена и у микромицетов [258; 260; 424; 594; 595; 596; 597]. Доказано, что изменения, вызванные светом, имеют пролонгированное действие. Они могут передаваться на последующую онтогенетическую стадию, от спор к мицелию [39].

Новые знания о фоточувствительности макромицетов, несомненно, будут иметь ценность для понимания фундаментальных механизмов, лежащих в основе их фоторецепции и фотоиндукции, процессов изменений устойчивости и чувствительности к свету грибов из разных экологических ниш. Это станет фундаментом для научного обоснования прогноза и интенсификации биотехнологических процессов получения целевых продуктов с помощью световых воздействий низкой интенсивности. Поэтому, актуальным направлением биотехнологии макромицетов является разработка современных методов целенаправленной фотоиндукции, внедрение которых позволит сократить сроки культивирования, уменьшить количество посевного материала при инокуляции субстратов, увеличить выход биомассы и биологически активных компонентов при глубинном культивировании, повысить урожайность плодовых тел и их качество при твердофазном выращивании.

Связь работы с научными программами, планами, темами. Работа выполнялась в течение 1998-2013 годов в соответствии с планами комплексных тем научно-исследовательской работы отдела микологии Института ботаники им. Н.Г. Холодного НАН Украины, в частности, по темам «Біологічні властивості лікарських макроміцетів та шляхи біотехнологічного використання окремих видів в Україні» (№ державної реєстрації 0100U000062), «Фізіолого-морфологічна характеристика лікарських макроміцетів та їх біосинтетична активність у культурі» (№ д/р 0104U009743), «Біологічні властивості сапротрофних макроміцетів в культурі» (№ д/р 0110U001264) и в ГУ «Институт пищевой биотехнологии и геномики НАН Украины» в период с 2013 по 2015 г. в рамках научных тем «Изучение молекулярно-генетических и клеточных механизмов стойкости растений к абиотическим и абиотическим факторам для улучшения их адаптационных свойств к неблагоприятным условиям окружающей среды» (№ д/р 0112U001597) и «Изучение антибактериальной активности макромицетов» (№ д/р 0115U002083).

Финансирование работы поддержано 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 Украины на выполнение инновационного проекта «Розробка та підготовка до впровадження інтенсивної технології вирощування їстівних та лікарських грибів на основі енергоефективних систем штучного освітлення», (№ д/р 0111U003274) (2011 г.), грантом на выполнение совместного украинско-белорусского научно-технического проекта «Розробка біотехнологій інтенсифікації культивування цінних видів їстівних та лікарських грибів у

промислових умовах Білорусі та України», (№ д/р 0112U006116) (2011-2013 г.).

Цель и задачи исследования. Целью работы была разработка научных основ использования света низкой интенсивности для повышения эффективности процессов биотехнологического культивирования лекарственных и съедобных макромицетов.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить такие задачи:

- определить энергоэффективные источники искусственного света с контролируемыми спектральными и энергетическими характеристиками и режимы активации;
- разработать методические подходы фотоактивации посевного материала с последующим изучением фоточувствительности макромицетов на разных стадиях онтогенеза;
- изучить динамику фотоиндуцированной активности спор и вегетативного мицелия на разных этапах культивирования, при пересевах и определить длительность сохранения фотоиндуцированных изменений;
- выявить факторы, влияющие на реализацию фотостимулирующего эффекта в процессе культивирования
- разработать методические подходы фотоинтенсификации технологических этапов глубинного культивирования макромицетов и целенаправленной регуляции их биосинтетической активности;
- разработать методические подходы фотоинтенсификации технологических этапов твердофазного культивирования макромицетов;

- разработать практические рекомендации использования света низкой интенсивности для модификации биотехнологических аспектов культивирования съедобных и лекарственных макромицетов.

Объект исследования: биотехнологические процессы культивирования съедобных и лекарственных макромицетов *Agaricus bisporus*, *Flammulina velutipes*, *Hericium erinaceus*, *Inonotus obliquus*, *Ganoderma lucidum*, *Ganoderma aplanatum*, *Lentinus edodes*, *Pleurotus ostreatus*, *Cordyceps militaris*, *Cordyceps conica*, *Morchella esculenta* и *Morchella conica* с использованием высокоэффективных источников искусственного света

Предмет исследования: особенности стимулирующего действия низкоинтенсивного светового излучения на ростовую и биосинтетическую активность макромицетов на разных стадиях онтогенеза с перспективой использования в биотехнологиях глубинного и твердофазного культивирования.

Методы исследования: фотобиологические (подбор энергоэффективных источников искусственного света с контролируемыми спектральными, энергетическими, поляризационными характеристиками для активации посевного материала), микробиологические и микологические (культивирование макромицетов и исследования их свойств), биохимические (изучение метаболических изменений), биотехнологические.

Научная новизна полученных результатов. Разработаны научные основы использования искусственного света в биотехнологиях выращивания съедобных и лекарственных грибов. Впервые предложены высокоэффективные методы целенаправленной регуляции биосинтетической

активности макромицетов и интенсификации технологических этапов их выращивания с помощью света низкой интенсивности различной 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, а также увеличить урожайность плодовых тел и их качество при твердофазном выращивании.

На основе полученных данных предложена и экспериментально доказана гипотеза, состоящая в том, что пусковой механизм индуцированных низкоинтенсивным светом биологических реакций, описанный у других биологических объектов разного уровня организации, присущ и макромицетам. Экспериментально доказано, что кратковременное (от нескольких секунд до десятков минут) низкоинтенсивное излучение в малых дозах ($45\text{--}230 \text{ мДж/см}^2$) вызывает стимулирующий эффект, 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. Это позволило впервые разработать экологически чистые и энергоэкономичные методы интенсификации технологических этапов культивирования путем активации посевного материала макромицетов кратковременным световым воздействием.

Впервые определена длительность сохранения фотоиндуцированной активности посевного мицелия и её динамика при последовательных пересевах и хранении. Выявлено, что реализация фотостимулирующего эффекта зависит от способа культивирования макромицетов, концентрации источников азота и углерода в питательных средах. Установлено, что кратковременное облучение светом низкой интенсивности вызывает изменение трофики макромицетов, которая выражается в увеличении

эффективности потребления источника углерода, что в свою очередь повышает их фотоиндуцированную ростовую активность при культивировании на средах с более низкими концентрациями глюкозы при глубинном культивировании.

Впервые для *I. obliquus* разработана и апробирована питательная среда с пониженным содержанием азота для повышения фотоиндуцированного стимулирующего эффекта при получении меланина, каталазы, внеклеточной тирозиназы и полифенолоксидазы, а также внутриклеточной пероксидазы. Выявлены достоверно значительные изменения уровня активности ферментов *I. obliquus* после воздействий красного и синего низкоинтенсивного лазерного излучения (НИЛИ), включая катализирующие синтез меланина (вне- и внутриклеточных полифенолоксидазы и тирозиназы).

Впервые выявлены изменения в жирнокислотном профиле макромицетов после облучения светом низкой интенсивности, которые заключались в уменьшении количества ненасыщенных жирных кислот.

Определена специфика реакций макромицетов отделов *Ascomycota* и *Basidiomycota* на облучение непрерывным и импульсным светом различной когерентности и длин волн. При сравнительном анализе изменений углеводного состава полисахаридов у макромицетов, относящихся к базидиомицетам и аскомицетам, впервые установлены разные тенденции в их динамике под действием кратковременных световых воздействий, что позволило предположить существование значительных различий в их фоторецепторных системах.

Впервые для макромицетов установлено достоверное преимущество использования низкоинтенсивного лазерного излучения вместо некогерентного света низкой интенсивности и импульсного света различной когерентности по сравнению с непрерывным для стимуляции роста, антимикробной и ферментативной активности, синтеза меланина и

полисахаридов, которая выражается в дополнительном увеличении ростовых показателей и выхода биологически активных веществ (10-150%).

Разработаны высокоэффективные экологически чистые методы целенаправленной регуляции биосинтетической активности макромицетов и интенсификации технологических этапов их культивирования с помощью света низкой интенсивности.

Впервые 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*, все этапы плодообразования которого проходят в отсутствии света.

Получены новые, научно обоснованные теоретические и экспериментальные результаты исследования фоточувствительности макромицетов к свету низкой интенсивности с различными спектральными, энергетическими, поляризационными характеристиками, которые в совокупности дополняют и расширяют наши представления о фундаментальных процессах фоторецепции макромицетов.

Практическое значение полученных результатов. Получены данные, которые в совокупности определили характер фотоиндуцированных изменений у съедобных и лекарственных промышленно культивируемых макромицетов под воздействием света низкой интенсивности с различными спектральными, энергетическими, поляризационными характеристиками, что явилось основой способов активизации посевного материала для использования его для интенсификации технологических этапов глубинного и твердофазного культивирования.

Разработаны методические подходы стимуляции ростовой и биосинтетической активности путем модификации существующих биотехнологий получения биомассы, биологически активных соединений и плодовых тел макромицетов, позволяющие существенно сократить сроки

культивирования и увеличить выход целевого продукта и которые защищены 9 патентами.

Получен патент Украины на способ активации прорастания спор [Деклараційний патент № 36013 16.04.2001, Бюл. № 3]. Предлагаемый способ активации прорастания спор может найти применение в биотехнологии, при экспериментальных исследованиях в области генетики и физиологии грибов, при воспроизводстве в культуре различных видов макромицетов, сохранению их в специальных коллекциях и интродукции их в естественные места обитания.

Способы активации и обработки посевного мицелия, стимуляции роста, развития, плодоношения и антимикробной активности макромицетов могут найти применение в биотехнологиях поверхностного и глубинного культивирования для интенсификации технологических этапов [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].

Способ получения биомассы и белка пищевого назначения *Morchella conica* [Патент України на винахід № 102450 10.07.2013, Бюл. №13], который базируется фотостимуляции, может быть использован в биотехнологиях производства пищевых добавок.

Получен патент на способ повышения синтеза меланина у *I. obliquus* [Патент України на винахід № 82960 26.05.2008, Бюл. №10]. Предлагаемый способ предусматривает создание соответствующих условий облучения при росте гриба – продуцента меланиновых пигментов, которые одновременно способствуют увеличению синтеза меланиновых пигментов и повышению выхода биомассы.

Материалы диссертационной работы, касающиеся фоточувствительности макромицетов и их реакций на световые воздействия

с различными характеристиками, могут быть использованы для подготовки специалистов в области биотехнологии, микологии и фотобиологии.

Личный вклад соискателя. Диссертация является самостоятельной работой автора. На основе проведенного диссертантом информационного поиска и анализа литературы разработана концепция и рабочие гипотезы по теме диссертации, обоснована и разработана методология и программа постановки исследований, выполнена экспериментальная часть исследований, проведен анализ и обобщение полученных результатов, составлены таблицы, оформлены рисунки, сформулированы выводы и положения, изложенные в диссертации, подготовлены к печати научные статьи. Все опубликованные результаты получены с личным определяющим участием автора в постановке задач, разработке методик и методов экспериментальных исследований, подготовке и проведении экспериментов, измерений, обработке их результатов, формулировании выводов.

Коллекция шляпочных грибов Института ботаники НАН Украины, которая была создана по инициативе проф. А.С. Бухало и члена-корреспондента НАН Украины И.А. Дудки, служила базой для организации изучения фоточувствительности макромицетов и создания биотехнологических основ интенсификации их культивирования с помощью искусственного света. В исследованиях принимали участие сотрудники отдела микологии, которые являются соавторами публикаций.

Все исследования по созданию модельных систем для облучения макромицетов светом с различными спектральными, энергетическими, поляризационными характеристиками и обеспечения условий экспериментов с предельно высокими точностями воспроизведения энергетических и спектральных параметров излучения проведены совместно с членом-корреспондентом НАН Украины А.М. Негрейко и к.ф.-м.н. В.В. Ходаковским (Институт физики НАН Украины), за что автор выражает искреннюю благодарность.

Тест-культуры для исследования антимикробной активности макромицетов предоставлены Институтом по изысканию новых антибиотиков им. Г.Ф. Гаузе РАМН, на базе которого проводилось изучение полученной соискателем в результате проведения экспериментов культуральной жидкости. Сотрудники Института, к.б.н. О.В. Ефременкова и к.б.н. Б.Ф. Васильева принимали участие в определении антимикробной активности предоставленного материала, обсуждении полученных результатов, за что автор выражает искреннюю благодарность.

Изучение влияния световых воздействий на жирнокислотный состав липидов, углеводный состав полисахаридов и физиологические соединения макромицетов проводились в сотрудничестве с Институтом микробиологии НАН Беларуси. Сотрудникам д.б.н. В.Г. Бабицкой, к.б.н. В.В. Щербе, к.б.н. Т.А. Пучковой и к.б.н. Д.А. Смирнову, принимавшим участие в проведении экспериментов, автор выражает искреннюю благодарность. Личный вклад соискателя заключался в разработке теоретической основы проведения исследований, руководстве и участии в планировании и проведении экспериментов.

Во всех научных статьях, в которых опубликованы основные результаты диссертационной работы, автору принадлежит ведущая роль в планировании и проведении экспериментальных исследований, обработке, интерпретации и обобщении результатов, их теоретическом анализе, а в подавляющем большинстве статей ей принадлежит ведущая роль в их написании.

Апробация результатов диссертации. Результаты работы были представлены на: I, II и III съездах микологов России (Москва, 2002, 2008, 2012); I, II, III, IV, V, VI Всероссийских конгрессах по медицинской микологии (Москва, 2003, 2004, 2005, 2006, 2007, 2014); I, II и III Междисциплинарных микологических 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, in 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); Международной научно-практической конференции «Перспективы использования лекарственных грибов при решении медико-экологических проблем (Киев, 10-11 сентября 2004); Fifth International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products (China, 2005); Научно-практической конференции «Грибоводство и смежные биотехнологии. Инновации для инвестиций» (Москва ВВЦ, Центр «Москва», 7-12 октября 2005); Международных научных конференциях «Современное состояние и перспективы развития микробиологии и биотехнологии» (Минск, 2006, 2008); Международной научно-практической конференции «Рациональное использование и воспроизводство лесных ресурсов в системе устойчивого развития» (Гомель, 2007); Международной научно-практической конференции «Теоретические и прикладные аспекты рационального использования и воспроизводства недревесной продукции леса» (Гомель, 10-12 сентября 2008); Первой международной специализированной научно-практической конференции «Грибна індустрія-2006» (Киев, 2006); Второй международной специализированной научно-практической конференции «Грибна індустрія-2007» (Киев, 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); Международной научной конференции «Микробиологическая биотехнология – наукоемкое направление современных знаний» (Кишинев, Молдова, 6-8 июля, 2011 г.); Белорусской инновационной неделе (Минск, Беларусь, 16-17 ноября 2011); Международной научной конференции «Малые дозы» (Гомель, 26-28 сентября 2012 г.).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 73 научные работы, из которых 37 статей (из них - 21 статья опубликована профессиональных изданиях, из которых 16 публикаций в научных периодических изданиях других стран, 5 публикаций в изданиях Украины), 1 раздела в монографии, 3 патента на изобретения, 4 декларационных патента и 2 патента на корисну модель и 26 тезисов в материалах международных и всеукраинских съездов, конгрессов и конференций.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из вступления, обзора литературы, основной части (включает материалы и методы исследований, результаты собственных исследований и их обсуждение – 6 разделов), заключения, выводов и списка использованной литературы (673 наименований). Диссертация изложена на 387 страницах компьютерного текста, проиллюстрирована 45 рисунками и 47 таблицами.

РАЗДЕЛ 1

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

МАКРОМИЦЕТЫ – ОБЪЕКТЫ БИОТЕХНОЛОГИИ И ФАКТОРЫ РЕГУЛЯЦИИ ИХ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ

1.1. Макромицеты – продуценты пищевой биомассы и биологически активных веществ

Поиск новых источников физиологически активных соединений (ФАС) с целью получения эффективных и безопасных продуктов является одной из важнейших задач современной биотехнологии. Макромицеты представляют огромный потенциал в качестве источников биологически активных метаболитов углеводной, липидной, белковой природы, терпеноидов, стероидов, алкалоидов, фенольных соединений, витаминов, минеральных элементов. Наибольший интерес к этим грибам проявляют в странах Востока. Водные экстракты грибов долгое время использовались в народной медицине Кореи, Японии, России, США, Канады для лечения различных заболеваний. При этом источниками сырья являлись, прежде всего, традиционно съедобные в различных регионах мира грибы, промышленное культивирование которых ведется в больших объемах. Это *Agaricus bisporus* (шампиньон), *Lentinus edodes* (шиитакэ), *Flammulina velutipes* (зимний опенок), *Pleurotus ostreatus* (вешенка), *Trametes versicolor* (кориолус многоцветный), *Ganoderma lucidum* (трутовик лакированный или рейши), *Grifola frondosa* (грифола курчавая или мэйтаке) и другие [21; 42; 356; 412; 619; 620; 621; 622; 623; 624; 625; 626; 627; 656]. Современные исследования в разных странах показали, что шляпочные грибы являются хорошими адаптогенами, повышающими устойчивость организма к различным стрессам, обусловленным химическими загрязнениями среды, шумом, нервными и физическими перегрузками, инфекционными компонентами. Особое внимание уделяется лекарственным грибам *G. lucidum* и *L. edodes*, о

чём свидетельствует постоянное увеличение объёмов их выращивания. В настоящее время преобладает интенсивная технология, не зависящая от климатических условий, что способствует распространению этих грибов в самых различных регионах земного шара.

1.1.1. Определение термина «макромицеты»

Макромицетами называют грибы, имеющие крупные плодовые тела. Ним относятся почти все представители класса *Basidiomycetes*, а также виды нескольких порядков класса *Ascomycetes*.

1.1.2. Морфогенез макромицетов

Неотъемлемой частью создания высокоинтенсивных технологий культивирования макромицетов является знание их жизненного цикла и морфогенеза. Раскрытие механизмов, регулирующих определенные стадии развития грибного организма, и определение факторов влияющих на его жизненную активность, позволит оптимизировать и целенаправленно регулировать биотехнологические процессы и получать продукцию нужного качества в максимальном количестве.

Изучение морфогенеза высших грибов началось в середине прошлого века в период общего подъема эмбриологии [41]. В настоящее время накоплен значительный объем данных по онтогенезу грибов. Большая заслуга в этом принадлежит А. Рейндерсу, исследовавшему более 300 видов высших базидиальных грибов и опубликовавшему первую в этой области монографию [541] и ряд научно-исследовательских работ [41]. Наибольший подъем работ по морфогенезу высших базидиомицетов наблюдался в 20-30 годы прошлого столетия [254; 255; 283; 296; 330; 350; 351; 352; 410; 411; 478]. Далее наблюдался значительный спад интереса к онтогенетическим исследованиям. Изредка появлялись лишь отдельные публикации [239; 282; ;

471; 612; 629]. Особенно следует отметить исследования в этом направлении Л.Ф. Горового [41]. В его работах был представлен большой комплекс данных по сравнительной морфологии, анатомии, цитологии, биохимии и экологии высших базидиомицетов.

В настоящее время значительное развитие получили исследования экспериментального морфогенеза грибов разных таксонов. Результаты этих исследований раскрывают специфическое влияние внешних факторов, многих промежуточных продуктов метаболизма и отдельных химических веществ на процессы морфогенеза вегетативной и репродуктивной фаз роста грибов. Понимание процессов морфогенеза важно для знания биологии грибов, разработки их классификации, регулирования процессов роста и развития, установления связи между морфологической структурой и особенностями метаболических процессов, механизмов фенотипической и генетической изменчивости грибов.

Морфогенез грибов, как и других живых организмов, включает регуляцию клеточного деления, миграцию, адгезию, процессы клеточной дифференцировки и апоптоз (программируемая гибель клеток).

Развитие грибных организмов происходит в непосредственном контакте с внешней средой, поэтому они являются постоянными объектами стресс-факторов, физической и химической природы. Такие внешние факторы как голодание, вызванное недостатком или отсутствием какого-либо источника питания, условия освещения и температуры, изменение газового состава среды, механическое повреждение мицелия запускают процессы дифференцировки у грибов [161]. Обычно в природе организм находится под комплексным воздействием внешних агентов, поэтому при изучении процессов дифференцировки грибов важно вычленить фактор среды, запускающий механизмы развития, а также факторы, сопутствующие ему.

В природных условиях выживание под действием стресса скорее является правилом, чем исключением, поэтому способность

дифференцироваться можно рассматривать как адаптацию организма и способ его выживания при неблагоприятных условиях. В процессе развития под влиянием различных факторов наряду с морфоанатомической дифференцировкой происходит и биохимическая и метаболическая дифференцировка, т.е. в ответ на стресс идет формирование новых метаболических путей. Известно, что у многих грибов прекращение роста и переход к стационарной фазе развития сопряжен с биосинтезом вторичных метаболитов, таких, как пеницилловая кислота, каротиноиды, меланины и вещества вторичного обмена, таких как гиббереллины, и ряд других соединений. Они являются производными простых продуктов первичного метаболизма грибов, таких как ацетат, жирные кислоты, аминокислоты, органические кислоты цикла Кребса. Вещества вторичного обмена не свойственны животным, однако присущи микроорганизмам, растениям и грибам. Роль этих соединений до последнего времени была непонятной, тем не менее появляется все больше данных относительно их защитной функции в грибных клетках в процессе развития [174; 223].

Биосинтез вторичных метаболитов представляет собой один из многих процессов, сопровождающих клеточную дифференцировку [161]. Молекулярные механизмы, лежащие в основе обоих процессов — дифференцировки и синтезе вторичных метаболитов, еще далеко не расшифрованы, но очевидно, что появление вторичных метаболитов является результатом функционирования ферментов, чей синтез и/или активация индуцированы действием различных факторов. Еще одним способом защиты от деструктивного действия стресс-факторов является изменение структурных компонентов клеточной стенки [342]. Синтез наиболее важных структурных белков у грибов — гидрофобинов, является результатом индукции экспрессии генов под действием стрессоров.

Д. Мур с коллегами разработал механическую и математическую модель морфогенеза макромицетов [471; 472; 473; 474; 475; 476]. Он считает, что гипотезы морфорегуляции растений и животных, где особое значение

придается адгезии молекул и соединительным молекулам клеток, приемлемы и для грибов. Однако в микологии вопросы теории морфогенеза менее разработаны. Обычно морфогенез грибов классифицируют как ряд переходов из одного состояния в другое, подразумевая, что последовательная экспрессия генов контролирует весь процесс. Ф. Гарольд [343; 344; 346] сделал некоторые успехи на пути противодействия этому упрощенному подходу, подчеркнув, что последовательность протекания или осуществления биохимических процессов должно сформировать основу для понимания морфогенеза. Ионные потоки через мембраны являются отправной точкой его рассуждений, поскольку они имеют потенциал, чтобы обеспечить направленный процесс формирования организма. Собственное исследование Гарольда привело к оценке потенциальной важности электрических и химических процессов [345].

По мнению Д. Мура [471; 472; 473; 474; 475; 476], ключевыми словами на каждом этапе развития у грибов являются - восприятие, индукция и изменения. Гифы должны быть в состоянии приступить к следующему шагу, но следующий шаг не является неизбежным. Способности к восприятию могут быть генетические (например, типы спаривания) и, прежде всего, физиологические. Индукция - это процесс, посредством которого объект подвергается воздействию условий, которые помогают преодолеть некоторые препятствия на пути развития и позволяют перейти на следующий этап. Изменение происходит, когда воспринимающие ткани индуцируются. Следующий этап всегда включает в себя изменение гиф, реакцию гиф и физиологию. То есть, каждый шаг ведет к переходу воспринимающих тканей на более высокий уровень дифференцирования [599]. Дифференцированные клетки гиф требуют усиления "указания" направления их дифференциации. Это усиление является частью среды, в которой они обычно развиваются. Дифференциация гиф - несбалансированный процесс по сравнению с ростом вегетативных гиф, поэтому в большинстве путей дифференциации гиф

общий баланс организма необходимо стимулировать в направлении «дифференциации» собственной микросреды.

Морфогенез разделен на различные процессы развития (так называемые «Подпрограммы») [473; 474; 475]. Эти отдельные, или параллельные, подпрограммы работают на уровне органов (шляпка, ножка, покрывало), тканей (покровные, трама, гименофор и др.), клеток (например, базидии, парафизы, цистиды) и клеточных компонентов (например, равномерный рост клеточной стенки, рост в объеме, рост в длину, рост толщины стенки). Физиологические процессы детерминированы генетической программой и могут работать параллельно или последовательно. При их воспроизведении в правильном направлении) морфогенез приводит к ожидаемому результату. Если некоторые из подпрограмм будут отключены (генетически или через физиологический стресс), остальные все еще могут продолжаться. Это частичное выполнение программы развития создает аномальную морфологию. Гомологичные подпрограммы могут быть обнаружены у различных грибов, и крупные различия в морфологии могут быть связаны с различными способами, в которых гомологичные подпрограммы выполняются. Гибкость в выражении развития подпрограмм позволяет плодовому телу реагировать на неблагоприятные условия и образовывать споры. Это также показывает, что толерантность неточности является важным атрибутом морфогенеза грибов. Максимальной гибкостью, конечно, является то, что процесс дифференциации вегетативных гиф может быть приостановлен и происходит возврат к инвазивному мицелию. Меньшим уровнем гибкости может быть то, что отдельная функция осуществляется путем полной адаптации клеток. Общая схема морфогенеза макромицетов и процессы, вовлеченные в развитие плодовых тел и других многоклеточных структур в грибах представлена на рисунке 1.1.

Многие грибы обладают конкретной моделью морфогенеза, но у разных видов характеристики модели отличаются. Тем не менее, можно сказать, что в развивающихся тканях клетки грибов приступают к определенному процессу дифференциации в ответ на взаимодействие их внутренней генетической программы с внешними физическими (свет, температура, сила тяжести, влажность) и / или химическими сигналами из окружающей среды и других участков развивающейся структуры.

Морфогенез зависит от наличия углеродных и минеральных питательных веществ и взаимодействия с другими грибами и бактериями. Последние 50 лет обнаружены изменения сезонного характера плодоношения грибов. Средняя дата первого плодоношения теперь наступает значительно раньше, а средняя дата последнего плодоношения значительно позже, что приводит к расширению сезона плодоношения. Значительное число видов, которые ранее плодоносили только осенью, теперь плодоносят также весной. Такой анализ показывает, что относительно простые полевые наблюдения грибов могут подтвердить изменение климата, и что грибы достаточно чувствительны, чтобы реагировать на изменение климата, которое уже произошло, приспособивая к ним свои модели развития. К сожалению, хотя можно констатировать решительные шаги в изучении морфогенеза грибов, молекулярные механизмы его остаются неизвестными. Обширный геномный анализ показывает, что последовательности, имеющие решающее значение для развития многоклеточных животных и растений не встречаются в геномах грибов, и мы пока не знаем базовых процессов биологии многоклеточного развития грибных организмов [473; 474; 475]

1.1.3. Питательная ценность макромикетов

В течение тысячелетий плодовые тела высших грибов были известны как источник пищи [459]. На протяжении веков их собирали в дикой природе. К концу XX века по известным причинам (сокращение природных

лесов, техногенное загрязнение и т.д.) сбор и потребление дикорастущих грибов существенно сократились. Только в 17 веке некоторые съедобные грибы начали культивировать в искусственных условиях во Франции. Первым видом, полученным таким образом был *Agaricus bisporus* (Lange) Sing. [335]. В Азии, особенно в Японии, различные виды грибов выращивают на протяжении веков, и они широко используются в традиционной японской кухне. Общее количество съедобных и лекарственных грибов составляет более 2300 видов [452]. Большинство из них культивируются на лигноцеллюлозных отходах. Наиболее популярными являются *Agaricus* spp., *Lentinula edodes*, *Pleurotus* spp., *Volvariella volvacea*, *Hericium erinaceus*, *Auricularia* spp., *Ganoderma lucidum*, *Grifola frondosa*, *Flammulina* spp., *Tremella* spp., *Pholiota* spp. и *Coprinus* spp. [452; 464; 563]. В 2003 мировое производство грибов составило 3,2 миллиона тонн, 46% из которых выращивали в азиатских странах, 37% в европейских странах и 15% в Северной Америке [567]. Благодаря их вкусу, аромату, пищевой ценности и уникальной текстуре [222; 447; 563; 459], съедобные грибы широко используются в домашней кулинарии и в сфере общественного питания.

Наряду с экономической и экологической целесообразностью, важными аргументами в пользу дальнейшего увеличения объемов производства культивируемых грибов является их ценность как физиологически функционального пищевого продукта, а также возможность использования отдельных видов макромицетов в качестве объектов современных технологий получения диетических, лечебно-профилактических и лекарственных препаратов. Вопросам изучения химического состава и пищевой ценности, определению природы биологически активных и лекарственных веществ, изолированных из высших базидиомицетов, посвящено большое число экспериментальных работ, результаты которых обобщались и обсуждались в целом ряде обзоров и монографий [163; 227; 232; 233; 234; 244; 263; 427; 432; 468; 469; 470; 543; 624].

Питательная ценность - это понятие, отражающее всю полноту полезных качеств продукта, включающее сумму таких характеристик, как содержание пищевых веществ, биологическая и энергетическая ценность, ароматические, вкусовые достоинства и т.д. Важнейшей функцией пищи является снабжение организма физиологически функциональными, незаменимыми для человека веществами, которые обязательно должны поступать с пищей, так как не могут синтезироваться в организме человека. Таких, установленных в настоящее время наукой веществ не так уж много. К ним относятся некоторые аминокислоты, ненасыщенные жирные кислоты, микроэлементы и витамины. Поэтому вся полнота полезных качеств любого пищевого продукта может быть выяснена только после детального исследования химического состава белков, жиров, углеводов, минеральных веществ и т.д. и сопоставления содержания каждого вещества с так называемой формулой сбалансированного питания [143; 144].

Свежие плодовые тела макромицетов содержат около 90% влаги, остальное – сухая биомасса, по отношению к которой углеводы составляют около 60%, протеины 25%, жиры 5%, минеральные компоненты (зола) 10%. Питательные вещества грибов усваиваются не полностью: протеин – на 70%, жир – на 90% и углеводы – на 85%, т.е. грибы являются низкокалорийным продуктом. Количественный состав компонентов зависит от вида гриба, условий его культивирования и возраста плодового тела и может варьировать у одних и тех же видов в довольно значительных пределах [162; 163; 232; 244; 263; 356; 448; 449; 530; 610; 611]. Можно отметить ряд общих закономерностей, касающихся изменений состава в зависимости от физиологического состояния мицелия и фаз развития плодовых тел культивируемых грибов. Так, в молодых плодовых телах грибов и в биомассе активно растущего мицелия содержание белка и нуклеиновых кислот всегда выше, чем в старых плодовых телах или мицелии в стационарной фазе роста, а содержание клетчатки, напротив – увеличивается по мере старения плодовых тел или истощения источников питания мицелия. Так, например, в

молодых плодовых телах *P. ostreatus*, выросших на древесине, общий белок (N x 6,25) составляет не более 22% сухой массы, а у грибов, культивируемых на оптимизированных по составу субстратах, может достигать 35%, как у фасоли и зеленого горошка, что значительно выше, чем в большинстве злаков и овощей [162; 163]. Наиболее высоким содержанием белка среди культивируемых видов съедобных грибов отличается гумусовый сапротроф *Agaricus bisporus*, который культивируют на богатых органическим азотом компостах. Однако и для этого вида отмечен широкий диапазон варьирования состава в зависимости не только от состава субстрата и волны плодоношения, но и от соотношения массовой доли шляпок и ножек гриба в анализируемой средней пробе, поскольку их состав различается [220; 610].

Очевидно также, что в плодовых телах *Pleurotus ostreatus*, *Lentinus edodes* и других ксилотрофных видов, растущих в природных условиях или культивируемых на древесине экстенсивным методом, белка, как правило, меньше, чем при культивировании тех же видов интенсивным методом на субстратах, обогащенных азотсодержащими добавками.

В плодовых телах грибов относительно мало жиров, но много углеводов, определяемых суммарно балансным методом. Содержание углеводов составляет 16-85 г на 100 г сухой биомассы [225]. Значительная часть углеводных соединений является полисахаридами. Грибные полисахариды представлены гликогеном и такими неперевариваемыми формами, как пищевые волокна, целлюлоза, хитин, маннаны и глюканы [38; 415; 448; 449; 508], которые важны для правильного функционирования пищеварительного тракта. В съедобных грибах доминирующим является манит [600; 618], содержание которого колеблется от 3 до 30 г на 100 г сухого вещества у *Agaricus bisporus* (Lange) Sing. [340]. Помимо манита, грибы также содержат легко ассимилируемые растворимые или, как их ещё называют, свободные сахара, которых обычно не более 10 - 15%. Они представлены, в основном, глюкозой, галактозой, трегалозой, маннозами и фруктозами [600; 618]. В отдельных случаях суммарное содержание

растворимых, усвояемых сахаров и сахарных спиртов может достигать и достаточно высоких значений (30-40%), как показано, например, для *Flammulina velutipes* [641], однако основную часть суммарных углеводов всех грибов составляют полисахариды различной степени полимеризации. Трудно гидролизуемые и неперевариваемые полисахариды составляют так называемую фракцию клетчатки, куда входит азотсодержащий полимер клеточной стенки грибов - хитин, а также пигменты (меланины, хиноны).

Белок является важным компонентом сухого вещества грибов. Белковые соединения составляют более половины общего азота, и их содержание зависит от состава субстрата, возраста мицелия, времени сбора урожая и вида гриба, и колеблется между 0,8 и 3,5 г на 100 г свежего вещества или между 19,0 и 39,0 г на 100 г сухого вещества [227; 261; 630]. Белки ряда культивируемых и лекарственных грибов содержат все 18 аминокислот, входящих в формулу сбалансированного питания, из которых особую ценность представляют незаменимые: лизин, треонин, валин, триптофан, тирозин и др., содержание которых может достигать 30% от общей суммы аминокислот [244; 563]. Следует отметить, что грибной белок богат лизином и лейцином, тогда как в белках злаков эти аминокислоты находятся в незначительных количествах. Следовательно, дополняя растительную пищу грибами, можно повысить тем самым ее общую биологическую ценность.

В биомассе грибов большое количество азота содержится в небелковых соединениях и коэффициент общего азота в белке составляет 3,45-4,38 [226; 563]. Наличие небелковых веществ также связано с усвояемостью белка, которая, как правило, составляет только около 70%.

Важное место в питании наряду с белком занимают липиды, причем их ценность тем выше, чем выше содержание в их составе полиненасыщенных жирных кислот. Содержание жиров в грибах является низким. По данным ряда авторов [449; 620], содержание липидов в мицелии культивируемых грибов может достигать 15-20% и выше. Тем не менее, они содержат

ненасыщенные жирные кислоты, которые составляют более 70% от общего содержания жирных кислот. Причем преобладающими жирными кислотами в составе липидов являются полиеновые: олеиновая, линолевая и линоленовая необходимые для синтеза простагландинов. В организме липиды являются основными компонентами биологических мембран, служат главной формой запасаения энергии и углерода, могут быть предшественниками других важных соединений (простагландины, тромбоксаны, лейкотриены). Они выполняют роль защитных барьеров, предохраняющих органы и ткани от термического, электрического и др. физических воздействий, входят в состав защитных оболочек, предохраняющих от инфекций и излишней потери или накопления воды. Эти соединения обеспечивают энергетические потребности клетки, создавая резерв энергии, накапливающейся в ходе биохимических реакций. Они также выполняют важную роль водо- и термозащитного барьера, обеспечивают механическую плотность клеток.

Сравнительному исследованию липидного состава ксилотрофного базидиомицета *L. edodes*, других ксилотрофов (*P. ostreatus*, *Kuehneromyces mutabilis*) и гумусовых сапротрофов (*A. bisporus*, *A. balchaschiensis*) посвящены работы Е.П. Феофиловой и соавторов [177]. Исследования показали, что грибы в плодовых телах содержат не более 5-6% липидов, причем, как правило, содержание липидов ниже в ножке, чем в шляпке. Это может объясняться тем, что базидиоспоры, находящиеся в шляпке, очень богаты липидами. Причем, у ксилотрофов их содержание может достигать 50%, у гумусовых сапротрофов – 20%, у симбиотрофов – 30–40%. Анализ состава нейтральных и фосфолипидов *L. edodes* в сравнении с типичным ксилотрофом *P. ostreatus* и почвенным сапротрофом *A. bisporus* также выявил ряд различий. В составе нейтральных липидов *L. edodes* обнаружено повышенное содержание моноацилглицеринов (до 37 % от суммы нейтральных липидов), свободных жирных кислот (до 22 %) и низкий уровень основных запасных липидов – триацилглицеринов (до 5 %). Для

P.ostreatus эти соединения составляют 13,2%, 12,5% и 19,5%, для *A. bisporus* – 7,5%, 15,0% и 28,0% соответственно.

Значительное количество работ посвящено сравнительному исследованию фосфолипидов двух основных физиологических групп дереворазрушающих базидиомицетов, обладающих разной способностью к расщеплению лигнина. Показано [70], что грибы бурой гнили (*Gloeophyllum sepiarium*, *Piptoporus betulinus*) в среднем обладают более высоким содержанием липидов в мицелии по сравнению с грибами белой гнили (*Fomes fomentarius*, *Panus tigrinus*) - до 16 % от сухого мицелия. При этом липиды грибов белой гнили отличаются более высоким относительным содержанием фосфолипидов – до 24 % от суммы липидов.

По данным литературы [632] полярные липиды грибов в основном представлены фосфолипидами. Исходя из этого можно заключить, что большую часть общих липидов дереворазрушающих базидиомицетов составляют нейтральные липиды, в основном, триглицерины [69].

Активно изучается жирнокислотный состав липидов грибов [362; 539]. Грибы образуют насыщенные и ненасыщенные алифатические кислоты с длиной цепи преимущественно 10–24 углеродных атомов. Основной насыщенной кислотой является пальмитиновая, основной моноеновой – олеиновая, а наиболее распространенной полиеновой – линолевая. Как показали исследования Weet и соавторы [632] для большинства представителей базидиальных грибов в жирнокислотном составе липидов характерно значительное присутствие $C_{16:0}$, $C_{18:1}$ и $C_{18:2}$ кислот с преобладанием, в большинстве случаев, линолевой кислоты. Подобная закономерность позже была показана для ряда ксилотрофных базидиомицетов (*P. ostreatus*, *Flammulina velutipes* и др.), в составе липидов которых преобладают линолевая кислота ($C_{18:2}$), составляющая до 75% от суммы жирных кислот, а также пальмитиновая ($C_{16:0}$) – до 30 % [Беспалова, 2002]. У многих исследованных грибов обнаруживаются липофильные пигменты – каротиноиды, которые практически отсутствуют у низших

грибов. Имеются сообщения о значительном содержании в грибах разнообразных по структуре терпеноидов [433].

Макромицеты характеризуются высоким уровнем усвояемых минеральных компонентов [227; 272; 298; 459; 610; 611], который также зависит от вида и возраста грибов и субстрата [272; 530]. Содержание золы в съедобных грибах колеблется от 5 до 13 г на 100 г сухого вещества. Спектрографическими и атомно-абсорбционными методами анализа в составе золы плодовых тел грибов обнаружено свыше 30 различных минеральных элементов, включая и отдельные редкоземельные металлы, такие, как Ge, Li, V, Zr и другие [162; 163]. Общее содержание важных для питания человека макроэлементов, в число которых входят K, P, Na, Ca, Mg, достигает 60-70% массы золы дикорастущих и культивируемых видов съедобных грибов [263; 377]. При этом в грибах, как и в рыбных продуктах, больше всего калия и фосфора, содержание которых может составлять до 50% и 16 % массы золы соответственно [162; 163]. Особенно важно отметить, что в грибах много микроэлементов, среди которых присутствуют дефицитные в нашем питании железо, кобальт, молибден и селен, входящие в структуру коферментов, участвующих во многих биохимических обменных процессах жизнеобеспечения. Помимо этих элементов идентифицированы йод, цинк, фторсодержащие вещества, медь, ртуть и марганец [298; 459; 563].

Роль селена, как важного фактора поддержания здоровья и антиопухолевого агента рассматривается в ряде работ [323; 535; 652]. Установлено, что в зависимости от вида его содержание в грибах может составлять от 0,012 до 20 мг/кг сухой массы плодовых тел. Среди культивируемых видов съедобных грибов обращает на себя внимание достаточно высокое содержание Se в плодовых телах белого (1,4 мг/кг) и особенно коричневого (3,2 мг/ кг) шампиньона [458; 459]. Он обнаружен в плодовых телах *L. edodes* и *P. ostreatus* при интенсивном культивировании

этих видов [339; 458; 459]. Тот факт, что селен имеет противоопухолевые свойства в сочетании с хорошо известной способностью грибов накапливать этот и другие микроэлементы из субстрата или жидкой среды, позволило ряду авторов предположить, что селен-обогащенные культивируемые грибы могут занять особую нишу среди функциональных пищевых продуктов и специальных пищевых добавок, как важные источники “органического” селена [468; 469; 470; 633].

Макромицеты являются важным источником витаминов. Плодовые тела культивируемых съедобных грибов содержат аскорбиновую кислоту (витамин С), практически весь комплекс витаминов группы В, из которых особенно много ниацина; есть также жирорастворимые витамины Е (токоферол), D₂ (кальциферол) и эргостерол [165; 385; 419; 457; 458; 459; 586; 623; 624; 628]. Сравнение самых популярных видов съедобных грибов показывает, что *Boletus edulis* обладает наибольшим содержанием витаминов группы В, в то время как *Lentinula edodes* - наименьшим. Недостаток фолиевой кислоты в организме человека приводит к нарушениям функций кроветворения (анемия, лейкопения). Грибы содержат довольно много фолатов, причем их биологическая активность оказалась такой же высокой, как у фолиевой кислоты из шпината [253]. *Pleurotus ostreatus* содержит больше фолиевой кислоты, витамина В1 и В3, но меньше витамина В12, чем *Agaricus bisporus* и *Lentinula edodes*. Наибольшее содержание витамина D обнаружено у *Lentinula edodes* и *Boletus edulis*. Значительное количество витамина РР, который защищает кожу от пеллагры, идентифицировали у *Agaricus bisporus*. В 100 г свежей массы этого гриба содержится 5 мг этого витамина. Такого его количества не наблюдается в любых других продуктах питания [334].

С учетом коэффициентов перевариваемости, предложенных для грибных белков, жиров и углеводов [Crisan, Sands, 1978], результаты анализа общего химического состава позволяют рассчитать энергетическую ценность

100 г сухих грибов и установить, что в среднем она составляет около 300 Ккал. Это говорит о том, что грибы должны быть отнесены к низкокалорийным продуктам питания, богатым минеральными веществами, поскольку суммарное их содержание (зола) может достигать 10 - 12 % сухой массы.

1.1.4. Биологически активные вещества культивируемых макромицетов и их лечебные свойства

Макромицеты являются не только вкусным и полезным продуктом питания. В них содержатся различные антибиотики, гормональные и ростовые вещества, а также ряд важных для жизнедеятельности организма человека соединений. Поэтому в последние годы внимание ученых всего мира направлено на изучение возможности использования грибов в качестве источника биологически активных и лечебных веществ. К концу XX - началу XXI веков были накоплены данные, показывающие, что именно грибы благодаря большой гетерогенности физиолого-биохимических свойств могут стать основными продуцентами в биотехнологии и заменить растения, животных и бактерии. Повышенному интересу к грибам способствовали многочисленные исследования, показавшие, что эти организмы весьма перспективны как незаменимые источники для получения лекарственных препаратов, имеющих ранозаживляющую, антиспидовую, иммуномодулирующую и особенно антираковую активности. Именно на основании этих достижений к 90-м годам прошлого столетия была создана новая область медицины – фармацевтическая микология [181]. Особенности биохимической активности грибов дают возможность использовать их для получения биологически активных веществ (БАВ), продуцентами которых ранее служили растения и животные. Грибы – неисчерпаемый ресурс сырья для получения лекарственных препаратов, содержащих все БАВ,

необходимые для сохранения здоровья [369; 643]. Примером может служить тот факт, что в плодовых телах некоторых грибов в пуле липидов содержится до 90% линолевой кислоты, которая входит в состав таких известных лекарственных препаратов как «Эссенциале», «Липостабил», «Витамин F-99», получаемых в настоящее время из растений и животных. В грибах есть все необходимые микроэлементы и витамины, а также антиоксиданты с высоко выраженной способностью к обрыву цепи свободно-радикального окисления и очень ценные протекторные соединения (трегалоза и маннит), предохраняющие мембраны при стрессорных воздействиях. Их существенным достоинством является отсутствие токсичности и значительного побочного действия.

Исследование макромицетов в настоящее время продвигается в двух основных направлениях: расширение перечня видов, имеющих полезные свойства [32], и углубленное изучения всех аспектов применения БАВ того либо иного гриба. Накопленные данные о биологически активных веществах высших грибов, ядовитых и психотропных алкалоидах, антибиотиках и множестве других метаболитов совершенно оригинальной и различной химической природы, демонстрирующих определённую фармакологическую активность при исследовании на животных и в современных тест-системах неоднократно обобщались в литературе [163; 165; 186; 278; 382; 427; 432; 468; 495; 496; 562; 572; 582; 623; 624].

Среди компонентов, которые определяют биологическую активность макромицетов, наибольшее значение имеют полисахариды, терпеноиды и иммуномодулирующие протеины.

В последнее время грибы используют для получения липидов – аналогов растительных масел, полиненасыщенных жирных кислот (линоленовой, арахидоновой и др.), пигментов (β -каротина, ликопина, астаксантина), регуляторов роста растений (гиббереллинов, абсцизовой кислоты), фосфолипидов (фосфатидилхолина, фосфатидилэтаноламина), для получения антиоксидантов и полисахаридов, а также энтеросорбентов.

Источниками сырья являются, прежде всего, традиционно съедобные в различных регионах мира грибы, промышленное культивирование которых ведется в больших объемах. Это *Agaricus bisporus* (шампиньон), *Lentinus edodes* (шиитаке), *Flammulina velutipes* (зимний опенок), *Pleurotus ostreatus* (вешенка), *Trametes versicolor* (кориолус многоцветный), *Ganoderma lucidum* (трутовик лакированный или рейши), *Grifola frondosa* (грифола курчавая, гриб-баран или мэйтаке), *Hericium erinaceus* и другие [12; 21; 119; 251; 266; 356; 625].

В Европе возрождение интереса к целебным свойствам грибов началось в 50-е годы прошлого столетия в связи с поисками онкостатических препаратов. Современные исследования в разных странах показали, что базидиальные грибы являются хорошими адаптогенами, повышающими устойчивость организма к различным стрессам, обусловленным химическими загрязнениями среды, шумом, нервными и физическими перегрузками, инфекционными компонентами [42].

Биологическую активность большинства грибов во многом определяют соединения углеводной природы, содержание которых достигает 60% от сухой биомассы грибов [619; 620]. Они представлены свободными и связанными сахарами, а также полисахаридами. Эти вещества выполняют резервную, осморегулирующую, регуляторную и протекторную функции. Интересны эти соединения и как маркеры, имеющие существенное значение в систематике царства *Fungi* [178; 180]. Установление в начале 70^х годов прошлого столетия группой японских учёных онкостатического действия полисахаридов, выделенных из плодовых тел некоторых базидиальных грибов, привело к активному изучению этих соединений, а также поиску их продуцентов [20; 543].

Полисахариды грибов обладают также гепатопротекторным, антиоксидантным, хемо- и радиопротекторным, антимикробным, противовирусным, гипополидемическим и др. действием. Неперевариваемые полисахариды грибов (полиаминосахариды, хитин, хитозан,

гетерополисахариды) являются структурными компонентами клеточной стенки грибов составляют от 10 до 50% сухой массы плодовых тел или мицелия. Их рассматривают как диетическое волокно, способное связывать и выводить из кишечника ионы тяжёлых металлов, токсины и канцерогенные вещества [265; 421; 495]. В медицине хитин и хитозан применяют как ранозаживляющее средство, для лечения гастрита и язвенной болезни, понижения уровня холестерина в крови [178].

Среди высокомолекулярных углеводов особое внимание привлекают экстрагируемые водой полисахариды, которые, наряду с простыми углеводами цитозоля, широко используются при создании лечебно-профилактических и лекарственных средств широкого спектра действия. Определены некоторые закономерности взаимосвязи структуры и функции полисахаридов. В основном, это глюканы. Иммуномодулирующая и противоопухолевая активность зависит от молекулярной массы, степени ветвления и конформации молекулы. Существенным для противоопухолевого действия глюканов является наличие β -1,3-связанной основной цепи молекулы, с боковыми β -1,6-цепями. Менее активны глюканы с основными β -1,6-связями. Высокомолекулярные полисахариды оказывают больший эффект, чем полимеры с низким молекулярным весом. В числе противоопухолевых полисахаридов помимо β -глюканов описаны гетерогликаны (арабиноглюканы, галактоманноглюканы, галактоксилоглюканы, манногалактоглюканы, манноксилоглюканы, рибоглюканы, ксилоглюканы, ксилогалактоглюканы) и гликаны (арабиногалактаны, фукогалактаны, фукоманногалактаны, глюкогалактаны, манногалактаны, маннофукогалактаны, ксиланы, глюкоксиланы, манноглюкоксиланы, манногалактофуканы, маннаны, глюкоманнаны, галактоглюкоманнаны, галактоманнаны, глюкуроноксиломаннаны) [196; 305; 375; 423; 542; 573; 608; 627; 671].

Высокой противоопухолевой активностью обладают полисахаридно-протеиновые комплексы (гликопротеины), полисахаридно-пептидные

комплексы (гликопептиды), протеогликаны и смеси полисахаридов и лигнина [496]. Полисахаридно-пептидные препараты PSK [578] и PSP [450] из гриба *Trametes versicolor* длительное время широко используются в онкологической практике Японии и Китая. Биологическая активность может быть повышена в результате химической модификации молекулы полисахарида.

К веществам с противоопухолевым потенциалом, идентифицированным в грибах, относят: низкомолекулярные соединения (хиноны, цереброзиды, изофлавоны, катехины, амины, триглицериды, сесквитерпены, стероиды, органический германий и селен), высокомолекулярные соединения (гомо- и гетероглюканы, гликаны, гликопротеины, гликопептиды, протеогликаны, белки и РНК-белковые комплексы), терпены, производные эргостерола, белки, меланиновые комплексы и другие вещества, обладающие в том числе антиоксидантным действием [212; 214; 427]. Противоопухолевая активность низкомолекулярных соединений высших грибов вызывает постоянный интерес ученых. Исследования продолжаются как в направлении поиска новых видов грибов, содержащих такие соединения, так и в направлении выделения таких соединений, исследования механизмов их противоопухолевого действия. [305; 416; 507; 613; 614].

Предпринята попытка разъяснить механизм противоопухолевого действия БАВ представителей двадцати родов высших грибов: *Phellinus*, *Pleurotus*, *Agaricus*, *Ganoderma*, *Clitocybe*, *Antrodia*, *Trametes*, *Cordyceps*, *Xerocomus*, *Calvatia*, *Schizophyllum*, *Flammulina*, *Hericium*, *Suillus*, *Inonotus*, *Inocybe*, *Funlia*, *Lactarius*, *Albatrellus*, *Russula*, и *Fomes*. Среди многочисленных БАВ грибов отмечены имеющие высокую противоопухолевую эффективность: лентинан, крестин, хисполон, лектин, calcaelin, иллудин S, псилоцибин, полисахариды А и В (НРА и НРВ), ганодеровая кислота, шизофилан и др. [504].

В отношении так называемых противоопухолевых полисахаридов, в последнее время чаще используется термин иммуностимулирующие грибные препараты [427], поскольку результаты многочисленных исследований показали, что какие бы то ни было препараты полисахаридов из высших базидиальных грибов не тормозят непосредственно рост раковых клеток. Механизм их фармакологического действия, результатом которого является торможение роста опухолей, прививаемых животным, подробно изученный и рассмотренный на примерах лентинана и шизофиллана, вероятнее всего, заключается в стимуляции различных звеньев иммунной системы организма, что способствует продлению жизни определённой части подопытных животных [469; 470].

Антивирусное действие веществ, содержащихся в плодовых телах и мицелии макромицетов, определяется их иммуномодулирующей активностью. Уже к 1965г, в разных лабораториях мира было протестировано около 3 тысяч видов макромицетов и определена химическая природа свыше 40 образуемых ими антибиотиков [186]. Многие из них содержат антибиотические вещества, активные против бактерий и грибов: полиацетилены (*Clitocybe*, *Polyporus*, *Coprinus*, *Marasmius*, *Agrocybe* и др.), фенольные соединения, секвитерпены, кориалин, кампестрин, полипорин, муцидин, иллуидины и др. [65; 620; 621]. Муцидин внедрен в промышленное производство и применяется при дерматозах [562], полициклический антибиотик плевротин, выделяемый из культуральной жидкости *Pleurotus griseus*, активен против широкого спектра микроорганизмов и применяется в ветеринарии.

Относительно недавно был открыт и идентифицирован ещё целый ряд новых антибиотических веществ, в частности из афиллофоральных грибов [670]. В этом плане особый интерес представляют вещества с активностью против мультирезистентных штаммов патогенных бактерий. Так, например, являются новые сесквитерпеновые гидрохиноны, названные ганомицинами А

и В, изолированные из *Ganoderma pfeifferi* Bres., которые ингибируют рост метициллин-резистентных тест-культур патогенных бактерий [427].

Все больший интерес вызывают белки и пептиды макромицетов благодаря своему широкому спектру терапевтического действия [489; 490; 637; 638]. Они включают белки с антипролиферативной активностью по отношению к опухолевым клеткам и противоопухолевой активностью: рибонуклеазы, белки рибосом, обладающие противогрибковой активностью инактивирующие белки, гемолизины, убиквитин-подобные пептиды, гемагглютинины/лектины, лакказы и полисахаридно-протеиновые комплексы.

Большие перспективы представляет применение биополимеров высших базидиальных грибов в сельском хозяйстве для повышения устойчивости растений против фитопатогенных грибов. В отличие от химических препаратов полисахариды базидиомицетов обладают не только бактерицидными и фунгицидными свойствами, но и иммунизируют растения к патогенам [42].

Макромицеты являются богатым натуральным источником антиоксидантных компонентов. При использовании различных методов и тест-систем *in vitro* и *in vivo* высокая антиоксидантная активность показана для экстрактов мицелия и плодовых тел многих видов дикорастущих и культивируемых съедобных и лекарственных грибов, включая виды рода *Pleurotus*, а также *Flammulina velutipes*, *Hypsizygus marmoreus*, *Agrocybe aegerita*, *Inonotus tamaricis*, *Laetiporus sulphureus*, *Ganoderma lucidum*, *Trametes versicolor* и др. [198; 215; 373; 374; 376; 454; 455; 561; 642; 537].

У некоторых макромицетов (*Flammulina veutipes*, *Coprinus domesticus*, *C. cinereus*, *Cerrena unicolor*, *P. ostreatus*, *Armillaria mellea*, *Panus tigrinus*, *Lyophyllum ulmarium* и др.) обнаружена высокая протеолитическая

активность. Их протеазы могут представлять интерес как фибринолитические и тромболитические агенты [275; 620; 621].

Производные нуклеиновых кислот и нуклеотиды *L. edodes* (5'-АМФ, 5'-ГМФ, эритаденин, дезоксицелитинацин) обладают способностью угнетать агрегацию тромбоцитов [620; 621].

1.2. Культивирование макромицетов

1.2.1. Принципы культивирования

Уменьшение площади лесов, загрязнение почвы, водоемов и воздуха привело к катастрофическому снижению количества грибов. Возрастающий спрос на грибы привел к необходимости их искусственного разведения и расширения ассортимента культивируемых грибов. Многие макромицеты, обладающие лечебными свойствами, растут в определенных климатических условиях. В природе происходят частые мутации грибов, поэтому в лечебных целях рекомендуется использовать лишь те, которые выращены по специальным биотехнологиям.

С целью промышленного культивирования испытаны около 100 видов базидиомицетов. В настоящее время выращивается в коммерческих целях около 35 видов, из них 20 видов - на индустриальной основе [242; 243].

В настоящее время существуют разные методы культивирования съедобных и лекарственных грибов. Выбор метода определяется поставленными целями и возможностями. Некоторые методы чрезвычайно просты. С другой стороны, гораздо более сложные стерильные технологии культивирования требуют специальных знаний биологии грибов [241]. Подробные описания многих методов выращивания описаны Роусе и другими исследователями [404; 531; 550].

Наиболее древний из них, экстенсивный, базируется на способности большинства макромицетов развиваться сапрофно на мертвых деревьях. Этот метод (log culture) был разработан в Японии и Китае для *Lentinus* более 1000 лет назад и до сих пор широко используется небольшими производителями в Азии с целью получения плодовых тел для продажи на местных рынках. Преимущество такого культивирования заключается в том, что он является простым и естественным, однако такой процесс является трудоемким, медленным и сезонозависимым, по сравнению с интенсивным методом выращивания грибов на стерильных опилочных смесях и других растительных остатках, и не может претендовать на высокую производительность.

Культивирование макромицетов включает проведение следующих этапов: выделение грибных спор для посева на питательную среду для получения чистой культуры гриба; получение чистой мицелиальной культуры путем посева ткани плодового тела на питательную среду, поддержание мицелия культур, получение посевного материала, подготовка питательных сред, инокуляция и колонизация и создание оптимальных условий культивирования.

Первым этапом в любом процессе выращивания грибов является получение чистой культуры мицелия конкретного штамма гриба. Впервые такие опыты были проведены в Институте Пастера в Париже в 1893 г. В дальнейшем методы получения чистой культуры совершенствовались с целью сокращения сроков и оптимизации условий выращивания грибницы [577]. Мицелиальные культуры выделяли из ткани плодовых тел, спор, в отдельных случаях из субстратного мицелия, склероциев, ризоморф и т.д. [30]. Наиболее универсальным является метод выделения чистых культур из плодовых тел. Это позволяет получить дикариотическую мицелиальную культуру без дополнительного скрещивания гаплоидного мицелия. Успехи в получении чистых культур макромицетов достигнуты в связи с

использованием антибиотиков, которые добавляют в питательную среду для подавления роста посторонней микрофлоры.

Для каждого вида существуют специфические условия его культивирования, определяемые его биологическими особенностями, соблюдение которых позволяет сохранять желаемые свойства и активность культуры вне природной среды обитания.

Для крупномасштабного производства грибов, требуется большие количества конкретного посевного материала (1-5% от объема производственной среды). Посевной мицелий должен соответствовать основным требованиям: иметь высокую жизнеспособность, обеспечивающую быстрое разрастание гиф в субстрате, принадлежать селектированному штамму, обладающему высокой активностью. При его приготовлении следует строго соблюдать технологический регламент стерилизации субстрата и асептичные условия посева.

1.2.2. Современные биотехнологические тенденции интенсивного культивирования съедобных и лекарственных грибов

Интенсивные способы выращивания (в специальных помещениях с регулируемыми условиями питания и микроклимата) имеют ряд преимуществ перед экстенсивными: процесс культивирования ведется круглогодично; урожайность более высокая и стабильная, благодаря созданию оптимальных условий; более короткий производственный цикл и возможность применения автоматизации производственных процессов.

1.2.3. Твердофазная ферментация

Твердофазная ферментация определяется как процесс, происходящий при отсутствии свободной воды с использованием синтетических или природных материалов в качестве субстрата [262]. Этот метод

культивирования предназначен для биоконверсии растительного сырья в более ценные продукты, такие как плодовые тела, кормовые добавки, вторичные метаболиты, и ферменты [262; 358; 500; 568].

Последовательность технологических операций при получении плодовых тел макромицетов определяется биологией культивируемого вида. В целом их можно разбить на 6 основных этапов [31]:

- приготовление субстрата;
- инокуляция – внесение мицелия в субстрат;
- инкубация – колонизация и освоение субстрата мицелием;
- инициация плодообразования;
- плодообразование;
- плодоношение;

Различные варианты современных технологий получения плодовых тел грибов, прежде всего, различаются способом производства субстрата. Существует два основных способа приготовления субстрата: аэробная ферментация и стерилизация субстрата. Другие известные технологии производства грибов занимают промежуточное положение по селективности субстрата между стерильной технологией и технологией аэробной микробиологической ферментации [24].

Основой успешного применения нестерильной технологии является способность культивируемого гриба подавлять рост конкурирующей микрофлоры. Это, как правило, требует высоких норм внесения посевного материала (от 3,0% и выше от массы готового субстрата), но при культивировании шиитаке и других экзотических грибов это в большинстве случаев ненадежно и экономически невыгодно.

Впервые стерилизация субстрата была использована при интенсивном культивировании вешенки. В 60-70 годах по стерильной технологии начали выращивать многие другие виды ксилотрофных грибов. Стерильная

технология позволяет культивировать виды грибов, которые невозможно вырастить на нестерильном субстрате. Кроме того, стерилизация значительно повышает доступность субстрата за счет частичного гидролиза его составляющих при термообработке, что приводит к значительному повышению урожайности грибов. Норма расхода посевного мицелия уменьшается в 3-5 раз.

Твердофазная ферментация имеет свои преимущества по сравнению с глубинным культивированием, которые связаны с малым потреблением энергии, концентрированной питательной средой, в связи с чем высокая объемная производительность может быть достигнута в меньших биореакторах. Кроме того, концентрированный продукт может быть получен из дешевого сырья, такого как агропромышленные отходы. Несомненно, использование природных лигноцеллюлозных материалов, особенно отходов пищевой промышленности, является наиболее перспективным подходом для выращивания грибов, так как такие отходы богаты сахарами и другими полезными соединениями, которые легко усваивают грибы. Однако использование лигноцеллюлозных субстратов делает сложным процесс очистки конечного продукта. По этой причине данный метод удобен для ферментирования субстрата, который может быть использован, например, как кормовая или пищевая добавка. Однако, до сих пор, основные препятствия для промышленного применения ТФ методов культивирования макромицетов не преодолены полностью. Они связаны с проектированием и эксплуатацией крупномасштабных биореакторов из-за проблем, связанных с контролем параметров, таких как pH, температура, аэрация и подача кислорода, влажность и перемешивание.

1.2.4. Глубинное культивирование

В настоящее время наиболее перспективным считается глубинное культивирование макромицетов [293; 622]. В отличие от твердофазного, глубинное культивирование требует больших энергетических затрат на

перемешивание питательной среды и для подачи кислорода. Однако, погруженные культуры функционируют как однородная система, и управление процессом культивирования легко осуществляется с помощью множества on-line датчиков. Погружённое культивирование макромицетов, как способ получения их мицелия для дальнейшего выделения физиологически активных соединений, обладает рядом преимуществ: позволяет сократить длительность процесса в 8-10 раз, синхронизировать культуру, регулировать состав комплекса БАВ, осуществлять направленный синтез целевых метаболитов, использовать типовое оборудование для выращивания грибов разных эколого-трофических групп, стандартизировать получаемые продукты [21; 203; 301]. Питательная ценность мицелия базидиомицетов, выращенных в глубинных условиях по содержанию в нем белка, незаменимых аминокислот и витаминов сопоставима с плодовыми телами. Основной тенденцией развития мировой науки в области культивирования макромицетов является изучение БАВ, особенно углеводной природы, глубинного мицелия и культурального фильтрата и использование их для создания функциональных препаратов.

Глубинное культивирование макромицетов с целью получения пищевого белка предпринималось ещё с 40-х годов XX века [626]. Однако этот способ не получил большого распространения в связи с трудностями, связанными в основном с медленным ростом макромицетов и необходимостью использовать богатые питательные среды, что влечет за собой опасность загрязнения ферментационной среды посторонней микрофлорой.

В настоящее время 80%-85% всех продуктов, синтезируемых съедобными и лекарственными грибами, получают из плодовых тел, выращенных искусственно или собранных в природе [626]. Только 15% всех продуктов получают на основе экстрактов из мицелия и небольшой процент - из фильтрата. Кроме того, что производство плодовых тел занимает несколько месяцев, трудно контролировать качество конечного продукта. По

этой причине глубинное культивирование лекарственных грибов привлекает внимание как перспективный и воспроизводимый альтернативный метод производства грибного мицелия и метаболитов. Этот метод имеет значительный промышленный потенциал и его успех в коммерческих масштабах основывается на увеличении урожайности и развитии новых производственных систем, которые решают проблемы, связанные с технологией выращивания грибов. Несмотря на усилия многочисленных исследователей, направленные на производства биологически активных метаболитов грибов, физиологические и инженерные аспекты глубинного культивирования требуют дальнейшего изучения. Особенно ощутимым является недостаток информации о глубинном культивировании грибов в биореакторах.

Различные методы и стратегии были использованы для глубинного культивирования лекарственных грибов, в зависимости от их физиологических и морфологических особенностей и поведения в различных экологических условиях. Периодическое культивирование в качалочных колбах и в лабораторных ферментерах - наиболее часто используемые методы [205; 206; 270; 396; 443; 510; 637; 638].

Преимущество использования ферментера заключается в том, что в этом случае легче контролировать условия окружающей среды, такие как температура, перемешивание, растворенный кислорода и pH среды. Однако, разрастание биомассы гриба имеет существенное влияние на массоперенос, скорость обмена веществ и продуктов секреции. Мицелий может накрутиться вокруг мешалки, вызывать блокировку, а также увеличение вязкости, что приводит ограничению переноса биомассы и кислорода. Эти недостатки ограничивают время работы в биореакторах.

Некоторые исследователи при культивировании макромицетов используют периодическую ферментацию с подпиткой (fed-batch fermentation) для получения биологически активных метаболитов [588; 591; 672]. Эта стратегия основана на добавлении одного или нескольких

питательных компонентов в процессе культивирования. Метод культивирования с подпиткой позволяет продлить вторую фазу роста и повысить выход внеклеточных метаболитов. Ограничение скорости поглощения субстрата скоростью его доставки оказывается способом преодоления «катаболитной репрессии» образования продукта.

Известны методы глубинного культивирования с использованием иммобилизованного на различных материалах мицелия макромицетов [262; 422]. Этот метод имеет несколько преимуществ. Прежде всего, иммобилизованная клеточная система позволяет легко отделить клетки от жидкой среды, что дает возможность повторять периодическое культивирование. Иммобилизация мицелия уменьшает вязкость среды, что значительно улучшает снабжение кислородом и массообмен [262; 593]. Кроме того, иммобилизованные культуры обладают более высоким уровнем активности и более устойчивы к стрессовым внешним воздействиям. Однако, практически отсутствует информация о биосинтетической активности иммобилизованных макромицетов. В. Янг с соавторами [640] помещали полиуретановые пенистые листы в среду для глубинного культивирования в колбах Эленмейера. Мицелий *G. lucidum* прочно прикреплялся к пенистой поверхности и культуральная жидкость практически не содержала свободно плавающих клеток. Выход биомассы и полисахаридов при этом способе культивирования был значительно выше, чем при использовании свободной культуры.

Кроме перечисленных выше стратегий глубинного культивирования в настоящее время имеют место и другие, которые включают одновременно различные методы интенсификации биологических процессов. Так называемая «multi-pulse feeding integrated strategy» разработана недавно Чангом и Тангом для *G. lucidum* [658]. Она включает три стадии облучения культуры гриба в процессе ферментации. Первые два дня культивирование проводится в темноте, следующие 6 дней при освещении белым светом 0.94 В/м² и затем 4.70 В/м² до конца ферментации. Позже они разработали

«multiply-addition» стратегию добавления ионов меди в разных концентрациях на фазах развития мицелия, что позволило им увеличить трансформацию лактозы во вторичные метаболиты [590].

Разработаны экономически эффективные стратегии для регулирования биосинтеза биологически активных метаболитов (антиоксиданты), а именно, сокультуры *Inonotus obliquus* с *Phellinus punctatus* [666]. В монокультуре накопление биомассы вышло на экспоненциальную фазу на 3-й день и достигло 7,6 г/л на 11 день. Аналогичные тенденции накопления биомассы наблюдались и в сокультуре, однако максимальный уровень биомассы сокращался до 5,2 г/л. Напротив, аккумуляция метаболитов в сокультуре была значительно выше, чем в монокультуре. Максимальный уровень образования меланина в монокультуре достигал только 1,23 г/л, но этот показатель увеличился до 3.61 г/л в сокультуре. Максимальный уровень синтезируемых грибами фенольных соединений в монокультуре достигал 29.89 мг/г, и увеличился до 43.91 мг/г в сокультуре. Общее количество мицелиальных тритерпеноидов в сокультуре также было значительно выше, чем в монокультуре.

Далеко не все виды макромицетов способны расти в условиях глубинного культивирования. При отборе грибов с целью получения пищевой биомассы и биологически активных веществ руководствуются следующими принципами:

- Нетоксичность и съедобность;
- Наличие в культуре характерных признаков, позволяющих её идентифицировать;
- Продуктивность при первичном отборе на качалке не менее 1 г сухой биомассы на 1 л среды в сутки;
- Продуктивность при культивировании в ферментере не ниже 4/г/сут сухой биомассы, содержание сырого протеина в мицелии 40-50%, максимальная скорость роста в экспоненциальной фазе не менее $0,4^{-1}$ час.

1.3. Факторы регуляции роста и биосинтетической активности макромицетов и методы их интенсификации

Многие исследования демонстрируют зависимость мицелиального роста макромицетов и их биологической активности от ряда физических факторов и состава питательного субстрата. Варьируя эти факторы, можно целенаправленно регулировать процесс синтеза конечного продукта [293]. В качестве питательных сред для глубинного культивирования используют богатые сахарами отходы, получаемые при переработке продуктов сельскохозяйственного производства, а также лесопереработки, содержащие лигнины и целлюлозу [270]. Также используются неуглеводные источники углерода, такие как алифатические спирты, п-алкалоиды, органические кислоты.

Универсальными источниками углерода при глубинном культивировании макромицетов являются глюкоза и фруктоза. Ксилоза хорошо используется многими подстилочными и дереворазрушающими грибами. Многими грибами хорошо усваиваются спирты – манитол, глицерол и этанол; дисахариды – мальтоза, целлюлоза, сахароза; полисахариды – крахмал, декстрины, пектиновые вещества. Основными источниками неорганического азота являются нитраты и соли аммония, органического – мочевины, пептоны, гидролизат казеина. Оптимальное соотношение C:N в зависимости от вида гриба и условий культивирования от 8:1 до 20:1. Источники минерального питания, потребляемые в относительно больших количествах – это фосфор, калий, сера, магний, в небольших – железо, цинк, медь, марганец, кальций. Необходимыми факторами роста являются витамины, особенно группы В, поэтому в среды часто добавляют растительные экстракты и отвары [293]. Исходное значение pH среды для большинства культивируемых макромицетов около 5,0. Оптимальный состав среды и другие параметры обычно определяются методами, принятыми для глубинного культивирования микромицетов и прокариот.

Интенсивности перемешивания и аэрации являются важными факторами успешного культивирования макромицетов и имеют свою специфику. Для успешной аэробной ферментации требуется поддержание в среде достаточного количества растворенного в воде кислорода, чтобы избежать ограничения или нарушения нормальной дыхательной деятельности. Аэрация приводит к лучшему смешиванию производственной среды. Однако, в культивировании мицелиальных организмов, таких как макромицеты, перемешивание может привести к повреждению гиф, что негативно влияет на рост и продуктивность. Кроме того, перемешивание может привести к образованию липких частиц агломерата, которые затрудняют поступление кислорода. Оптимальная скорость перемешивания представляет собой баланс между подачей в среду кислорода и степенью повреждения гиф, которая увеличивается с увеличением скорости перемешивания. Поэтому должен быть установлен баланс между положительными и отрицательными эффектами перемешивания.

Мицелий разных видов макромицетов отличается своей чувствительностью к механическим повреждениям при перемешивании и аэрации. Кроме того, исследования, направленные на разработку технологий их глубинного культивирования, продемонстрировали возможность целенаправленно регулировать процессы биосинтеза макромицетов путем изменения скорости перемешивания и подачи кислорода [249; 399; 436; 540; 589; 639].

1.3.1. Оптимизация питательных сред

Для достижения большей продуктивности процессов культивирования макромицетов основные усилия исследователей направлены на разработку оптимальных питательных сред и оптимальных условий процесса. Традиционные методы оптимизации питательной среды предполагают изменение одного независимого параметра при сохранении остальных

неизменными. Однако, такие одномерные методы очень трудоемки, требуют много времени, и не предоставляют никакой информации о взаимодействии и корреляции между параметрами. Существует большое количество данных по оптимизации питательных сред для интенсификации мицелиального роста и синтеза метаболитов путем использования статистических методов, которые позволяют одновременно оптимизировать много факторов, тем самым, получив много количественной информации проведя небольшое количество экспериментов и испытаний. Эти методы были успешно применены для совершенствования культуральных сред при получении первичных и вторичных метаболитов. Оптимизация условий глубинного культивирования и потребностей в питании мицелиальной биомассы и образовании полисахаридов при культивировании *Fomes fomentarius* изучалась с помощью метода ортогональной матрицы. При оптимальных условиях культивирования максимальная концентрация полисахаридов достигла 3.64 г/л, что более чем в четыре раза выше, чем в исходной среде [249].

Различные методы статистической оптимизации питательных сред и определения наиболее важных факторов использовали для интенсификации роста и синтеза биологически активных метаболитов при глубинном культивировании *Lentinus edodes* [304], *Hericium erinaceus* [443], *Phellinus igniarius* [336] и *Phellinus baumii* [437].

1.3.1. Стимуляторы роста и биосинтетической активности

Многие исследователи используют для стимуляции роста и биосинтетической активности различные вещества, включающие жирные кислоты, поверхностно активные вещества, растительные масла и органические растворители. Они нарушают проницаемость мембран и влияют на синтез ферментов участвующих в синтезе целевых продуктов [360; 426; 502; 640].

В качестве регуляторов роста использовались гиббереллиновая кислота, бета-индолилуксусная кислота, индолмасляная кислота, кинетин, альфа-нафтилуксусная кислота [208]. При культивировании *Lentinus connatus* лучший рост мицелия наблюдался при добавлении в основную среду 3-индолилмасляной [207], а *L. edodes* - гиббереллиновой кислоты [394]. Кроме того, Чанг и Майлс, которые изучали воздействие гетероауксина в разных концентрациях на рост *L. edodes*, отмечали увеличение скорости роста во всех вариантах опыта [341]. Использование гетероауксина, гибберелиновой кислоты и кинетина при культивировании *Lentinus tigrinus* увеличивало размер плодовых тел на 16 - 25%. [565]. При изучении влияния природного и синтетического гормонов (нафталинуксусная кислота и индолилуксусная кислота) на рост *Agaricus bisporus* и *Pleurotus florida* установлено, что максимальная стимуляция роста наблюдается при их комбинации [485].

Добавление в питательные среды витаминов довольно часто используется исследователями при разработке методов интенсификации роста съедобных и лекарственных грибов. Многие из них отмечают, что лучшим из исследованных витаминов для грибов является тиамин, а также биотин и токоферол [438; 442; 446]. Никотиновая кислота и тиамин гидрохлорид в значительной степени стимулировали вегетативный рост *Lentinus squarrosulus*, *L. edodes* и *L. connatus* [207; 208; 394; 635]. Рибофлавин и пиридоксин способствовали лучшему росту *Schizophyllum commune* [194]. Добавление 0.3% Твин 80 увеличивало накопление биомассы и полисахаридов *Pleurotus tubberegium* на 51,3% и 41,8% соответственно [655]. Различные растительные масла, используемые в качестве пеногасителей также оказывают стимулирующий эффект на рост и активность макромицетов [443; 640].

Добавление в культуральную среду для выращивания *Collybia maculate* 0,3% органических растворителей (толуола, хлороформа и гептана) на 4-й день ферментации увеличивало образование полисахаридов *Collybia maculate* и уменьшало рост. Ацетон не оказывал влияния на эти показатели [426].

Одним из новых направлений в грибоводстве является электростимуляция. Появились немногочисленные сообщения об использовании импульсов высокого напряжения для стимуляции роста и увеличения урожайности плодовых тел *Lyophyllum decastes*, *Lentinula edodes*, *Pholiota nameko* и *Naematoloma sublateralitium* при культивировании на бревнах и опилочных субстратах [584; 585]. Урожайность после такой обработки увеличивалась в 1,5-2 раза. Механизмы этой стимуляции до сих пор окончательно не выяснены, но допускают два возможных варианта. Первый объясняет такой эффект импульсов высокого напряжения образованием трещин в мицелии и формированием из них плодовых тел. Другой объясняет это тем, что некоторые ферменты были активированы путем применения импульсов электрического поля, что и привело к активизации образования плодовых тел. Аналогичные результаты получены и другими исследователями [456; 492; 601].

Однако, несмотря на большое количество исследований в этом направлении, поиск новых экологически чистых регуляторов роста и биологической активности грибов остается актуальным. Одним из таких природных регуляторов жизнедеятельности этих организмов является свет. Поэтому механизмы фотоморфогенеза грибов с каждым годом привлекают все больше внимания исследователей [260].

1.4. Фотоморфогенез грибов

Для большинства макромицетов, несмотря на то, что они не относятся к фототрофным организмам, свет служит важным морфогенетическим фактором. В отличие от растений, грибы используют свет как источник информации, а не как источник энергии. В течение десятилетий изучались реакции на свет, по крайней мере, у 100 видов грибов разных систематических групп. Исследовались механизмы восприятия грибами синего, ближнего УФ, зеленого и красного света [40; 81; 82; 83; 84; 149; 260;

276; 277; 312; 313; 327; 332; 333; 354; 417; 444; 445; 532; 533; 541; 594; 598; 644].

Значительный фактический материал, накопленный к настоящему времени, свидетельствует о том, что в большинстве своем фотофизиологические явления у грибов сопряжены с регуляцией процессов роста и индивидуального развития [260; 267; 354; 406; 417; 472; 473; 475; 532; 594]. Так, свет может осуществлять регуляцию скорости роста морфологических структур, свойственных вегетативному этапу развития грибов [267]. Однако особенно многообразно регулирующее действие света в ходе онтогенеза грибов проявляется при переходе организма к новому очередному этапу индивидуального развития, при прорастании спор [235] и при формировании спороносящих структур [81]. При этом в зависимости от организма, а также продолжительности, интенсивности и спектральных свойств светового сигнала характер ответа может быть, как позитивным, так и негативным. Для некоторых грибов, например *Alternaria solani* и *Lentinus tigrinus*, показано, что лишь определенная последовательность темновых и световых периодов развития служит необходимой предпосылкой формирования нормальных спороносящих структур.

Выяснение вопросов влияния света на морфогенез шляпочных грибов осложняется большим разнообразием отношения отдельных видов к этому фактору внешней среды. В частности представители различных систематических групп отличаются по количеству света, необходимого для нормального морфогенеза. Благоприятное воздействие он оказывает только в определенных дозах, а высокие интенсивности ингибируют развитие [260; 472; 473; 475; 476; 505].

Еще в 1950 году Х. Хавке разделила грибы по отношению к свету на 4 группы [349]. Вопросы фоторецепции световой энергии в мицелии и механизмы превращений, которые происходят после поглощения света, довольно сложные и до настоящего времени полностью не раскрыты. Углубленное изучение светового воздействия на представителей разных

таксономических групп грибов (аскомицетов, базидиомицетов, дискомицетов) привело к открытию у них микохромных систем, оптические свойства которых отображают наличие наибольшего скачка в спектре Солнца в области 400 нм. Отличительной чертой микохромной системы является зависимость ряда стадий морфогенеза и плодообразования у грибов от длительности и интенсивности синего и ультрафиолетового света [81; 413].

Преобладающее число грибов, у которых установлено наличие микохромных систем, имеет каротиноидные и меланиновые пигменты [60; 83; 84; 260; 406; 594]. Молекулярную основу энергетического метаболизма грибов составляют цепи электронного транспорта (ЦЭТ), компонентами которых являются флавины, цитохромы и хиноны. Свет, который непосредственно влияет на компоненты ЦЭТ, может поглощаться этими компонентами и изменять их активность. Свет может активизировать непосредственно компоненты ЦЭТ, которые расположены в узких местах энергетического метаболизма, удобных для процессов регуляции. Поэтому подсвечивание грибов светом в диапазоне от 400 нм приводит к активации разных спектральных форм молекул-переносчиков электронов, что нарушает баланс между периодом жизни этих форм и может привести к временному рассогласованию многостадийных биохимических реакций [68; 77].

Известные в настоящее время фотобиологические явления у грибов не ограничиваются коротковолновыми участками спектра. Имеется целый ряд примеров фоторегуляции различных процессов у грибов зеленым, желтым и красным светом [81]. Процессы индивидуального развития грибов могут в ряде случаев контролироваться наиболее длинноволновыми участками видимого спектра – красным и дальним красным светом [182; 183; 235]. В этом отношении чрезвычайно важны данные относительно обращения морфогенетического эффекта света 650-700 нм длинноволновым облучением (690-750 нм), заставляющее предположить, что системы фоторегуляции у грибов сходны с фитохромной системой высших организмов [83; 257; 258;

259; 260; 645]. Этот хромопротеид существует в двух формах, одна из которых поглощает свет вблизи 660 нм, а другая — 730 нм. Вследствие взаимопревращения этих форм при освещении меняется их количественное соотношение, что является пусковым механизмом в цепи процессов, приводящих в конечном счёте к прорастанию семян, образованию почек, зацветанию растений и другим формообразовательным эффектам. Согласно существующим в настоящее время гипотетическим моделям механизма действия фитохрома на молекулярном уровне, первичные ответные реакции, вызванные сигналами фитохромов, связаны с изменением мембранной проницаемости, а вторичные — с активацией хромосомного аппарата и ферментативной активности [184; 486].

Многочисленные данные показали, что фитохромы, являющиеся по своей природе протеинкиназами, опосредуют свои сигналы через светорегулируемое фосфорилирование белков. К настоящему времени идентифицировано большое число белков-субстратов для фитохромкиназной активности. С помощью молекулярно-биологического анализа с использованием дигибридных скрещиваний у грибов [486] идентифицировано несколько компонентов, взаимодействующих с фитохромом: фитохромкиназный субстрат (PKS1) и нуклеозиддифосфаткиназа 2 (NDPK2), взаимодействующая с карбокситерминальной последовательностью phyA.

Виды фотофизиологических эффектов — фотоиндукцию и фотостимуляцию образования в клетках грибов некоторых пигментов, в первую очередь каротиноидов, можно в известной степени рассматривать как часть или аналог фоторегуляции определенных физиологических процессов, в первую очередь, фоторегуляции скорости и направленности роста, фотоиндукции синтеза пигментов и фотоиндукция явлений морфогенеза [260; 594; 604].

В литературе преобладает мнение, что такого рода спектры действия предполагают наличие акцепторов квантов света, в качестве которых

выступают флавины, скорее всего в составе флавопротеинов. Это подтверждают данные о подавляющем действии ингибиторов флавинового обмена на индуцированный морфогенез грибов, а также о снятии рибофлавином ингибирующего действия света на споруляцию *Alternaria solani* [84; 435] и *Alternaria alternate* [569].

Однако флавины не являются единственными возможными претендентами на роль фоторецепторов. Поскольку указанные выше спектры действия обладают сходством со спектрами поглощения не только флавонов, но и каротиноидов, высказывается мнение об участии этих соединений в поглощении света. Однако это предположение не находит подтверждения в опытах с ингибиторами синтеза каротиноидов, а также в опытах с безкаротиноидными штаммами грибов [84].

В настоящее время известно, что световыми сенсорами являются хромопротеины - низкомолекулярные соединения, которые поглощают свет в определенных участках спектра и инициируют реакции белков. Сейчас у грибов выделяют три светочувствительные системы на молекулярном уровне [532]. Чувствительность к синему свету обеспечивается фоторецептором на основе флавина, который сам действует как передающий источник. Чувствительность к красному свету реализуется с помощью фитохрома, молекулы, которая до недавнего времени считалась присущей только растениям. Эти фоторецепторы, которые отвечают за красный и дальний красный свет, известны достаточно давно, а рецепторы синего света - криптохромы и фототропины - были открыты в 90-х годах XX века [81]. Недавно открыты опсиновые системы на основе ретиналя, биологические функции которых еще требуют изучения.

Вопрос о природе молекул, акцентирующих свет, нельзя считать окончательно разрешенным. Известно, что свет может быть мощным пусковым механизмом ввиду наличия в грибных клетках большого количества фотосенсибилизаторов, таких как флавины, птерины, порфирины. Возбуждение этих молекул квантом света приводит к формированию в

клетках АФК (активных форм кислорода), либо такого сильного окислителя как синглетный кислород, либо супероксида [80; 161; 554]. Способность АФК к взаимопревращениям усиливает этот эффект. Именно триплетные молекулы фотосенсибилизаторов, синглетный кислород, свободные радикалы и перекиси органических соединений служат инициаторами деструктивных фотодинамических процессов. Таким образом, действие света приводит к возникновению окислительного стресса и вызывает активацию биосинтеза в клетках таких, например, соединений, как каротиноиды [260; 315; 320; 418; 420: 594]. Однако многообразие фотореакций у различных грибов заставляет предполагать наличие у них целой группы фоторецепторных молекул, чем объясняются, по-видимому, различия в фоточувствительности грибов и различное воздействие мутаций на процесс фототрансдукции [217; 218; 499]. Осуществление ответа на световой сигнал находится под контролем генетического аппарата клетки. Об этом свидетельствует существование мутантов у некоторых базидиальных грибов неспособных осуществлять нормальный морфогенез.

1.5. Механизмы фоторецепции у грибов

Исследование механизмов фотореакций разных грибов является важной задачей как с фундаментальной, так и практической точки зрения. Знание механизмов фоторецепции продуцента – неотъемлемая часть целенаправленной фоторегуляции его активности в биотехнологических процессах.

Важные данные о влиянии света на развитие грибов получены сравнительно недавно, в частности, при выявлении генов, ответственных за реакцию грибов на свет. Так, в 2006 году Л.М. Корочано и П. Галанд сообщили об особенностях регулирования светом развития и поведения грибов [257]. Было обнаружено, что наиболее эффективным с точки зрения влияния на фотоморфогенез грибов является синий свет, который также

может активировать метаболизм или прямо влиять на рост грибных структур. В грибах описано несколько видов фоторецепторов [258; 260; 354; 594]. Выделение и характеристика фоторецепторов грибов основана на идентифицированных генах WC-1 и WC-2, *Neurospora crassa* [217; 218; 428]. Гены, похожие на WC-1 и WC-2 были идентифицированы в геномах некоторых аскомицетов, базидиомицетов и зигомицетов и многие из этих генов необходимы для фотответа грибов на свет. Гены, ответственные за фоторецепторы синего света, найдены у базидиомицетов *Coprinus cinereus* [409] и *Lentinus edodes*. Считается, что эти гены являются гомологами генов WC-1 и WC-2 сумчатого гриба *Neurospora crassa* [429]. Есть мнение относительно гипотезы о том, что WC-комплексы возникли на ранних стадиях эволюции грибов, как фоторецепторы и транскрипционные факторы, для регулирования их фотореакции. Кроме этого, исследования геномов грибов позволило идентифицировать фоторецепторные гены. Некоторые из них довольно неожиданные, вроде чувствительных к красному свету фитохромов, в дополнение к поглощающим синий свет криптохромам и родопсину [319; 379].

В настоящее время один из способов клонирования и контроля активности генов фотоморфогенеза состоит в проведении тщательных многочисленных исследований фитохромопосредованной экспрессии генов. В проведенной недавно работе с использованием флюоресцентных методов идентифицировано свыше 20 генов, дифференцированно экспрессировавшихся у диких типов и *phyA* нулевых мутантов [414]. Эти методы в совокупности с более глубоким поиском взаимодействующих с фитохромами разных регуляторных компонентов, а также дальнейшая идентификация и клонирование мутаций, вовлеченных в морфогенез, несомненно, дополнят и расширят классификацию генов, контролирующих фотоморфогенез.

На 9 Международном экологическом конгрессе в Эдинбурге в августе 2010 г. на заседании специализированной группы "Фотобиология грибов"

были заслушаны доклады, где обсуждались последние результаты относительно молекулярных механизмов фоточувствительности грибов из разных классов (аскомицеты, базидиомицеты и зигомицеты) и сделан обзор их реакций на свет [260]. У *Aspergillus nidulans* красный и голубой свет регулируют баланс между половым и бесполом развитием [533]. Молекулярные механизмы фоточувствительности активно исследовались у *Phycomyces blakesleeanus* и *Neurospora crassa* [230; 250; 264; 273; 289; 295; 347; 365; 366; 367; 547; 548; 559; 560]. Свет способствует накоплению каротиноидов в вегетативном мицелии, регулирующих бесполое и половое развитие.

Реакция на свет зигомицета *Phycomyces blakesleeanus* активно изучалась нобелевским лауреатом М. Дельбрюком ещё в середине 50-х годов [271]. Менее известным, но очень интересным зигомицетом с различными световыми реакциями является *Mucor circinelloides*, гриб, который может легко трансформироваться с помощью экзогенных ДНК. Свет способствует накоплению β -каротина у *Mucor circinelloides* [609].

Развитие шляпочных грибов требует соответствующий цикл свет-темнота [379]. И эта светозависимая регуляция развития была детально исследована у *Coprinopsis cinerea*. Недавно была осуществлена идентификация фотоответов генов на синий свет в мицелии гриба *Pleurotus ostreatus* (вешенка обыкновенная) [647]. У таких видов макромицетов, как *Polyporus arcularius*, *Lentinus edodes*, *Agaricus bisporus*, идентифицированы фоторегулируемые гены, контролирующие ферментативную активность, в частности, синтез тирозиназы [381].

Белки вроде WC-1 WC-2 идентифицированы у большинства грибов и многие из них необходимы для объяснения чувствительности к свету. Кроме того, большинство геномов грибов содержит гены других фоторецепторов, но их роль в клетках грибов в значительной степени остается невыясненной. Заседание группы "Фотобиология грибов" способствовало развитию

представлений о современном состоянии фоторецепторов и фотореакций грибов и предложило новые направления исследования [260].

В литературе нет данных, свидетельствующих о необходимости света для развития вегетативного мицелия шляпочных грибов до начала плодообразования. Однако замечено, что световое воздействие влияет на морфологию культур. Отсутствие или наличие светового воздействия в период вегетативного роста мицелия сказывается на характере дальнейшего плодоношения [441; 545]. Относительно времени проявления фоточувствительности вегетативного мицелия были выдвинуты и проверены две гипотезы: 1) фотоиндукция проявляется, когда мицелий становится физиологически зрелым, 2) фотоиндукция начинается, когда ресурсы пространства и питания исчерпаны [434]. В результате проведенных исследований было подтверждено второе предположение. Эту гипотезу объяснили следующим образом - при условии полного исчерпания ресурсов питания и пространства мицелиальный рост задерживается и происходит вынужденная перестройка метаболизма, что приводит к воспроизведению в клетках мицелия гипотетического фоторецепторного предшественника, способного поглощать световую энергию. При поглощении световой энергии образуются специфические вещества, которые стимулируют образование плодовых тел.

Таким образом, анализ работ направленных на изучение механизмов фоторецепции у грибов, позволяет научно обосновано утверждать, что свет может продуктивно использоваться для целенаправленной регуляции их морфогенеза и биологической активности и это, несомненно, может лечь в основу создания новых экологически чистых интенсивных технологий их культивирования.

1.6. Роль источников искусственного света в исследованиях грибов

Для того, чтобы понять биологические явления, связанные с фотоответом, очень важно точно регулировать как длину волны, так и интенсивность света. Однако обычные источники света, такие как лампы накаливания или люминесцентные лампы, имеют широкий спектр длин волн, поэтому с их помощью трудно определить влияние длин волн определенного диапазона. Прогресс в развитии технологии синих, зеленых, красных светоизлучающих диодов сделал возможным использовать определенные участки оптического спектра с точным контролем интенсивности излучения. Так, с использованием светодиодов видимого диапазона исследовалось влияние света на мицелий *Coprinus cinereus* [417]. Было обнаружено, что подавление фазы роста синим светом зависит от его интенсивности, тогда как красный и дальний красный свет независимо от его интенсивности не влияет на фазу роста.

Эффекты спектральной зависимости фотореакции грибов наблюдались во многих работах. Кроме упомянутых выше эффектов, связанных с действием синего света и результатов сравнения этого действия с ответной реакцией на красный и дальний красный свет, исследовалось влияние света других участков спектра. Была изучена спектральная чувствительность фотостимулирующего и фотоингибирующего воздействия на развитие гриба *Coprinus congregatus* в диапазоне 405-730 нм [290]. Культуры облучались в течение 12 часов постоянным числом падающих квантов. Спектральные чувствительности процессов фотоиндуцирования образования примордиев, фотоподавление развития примордиев и фотодозривание их развития были достаточно похожи. Это дает основание считать, что при морфогенезе плодовых тел действуют одни и те же фоторецепторы. Спектры действия для фотоингибиторного эффекта были исследованы в области 407-690 нм. Наиболее эффективными длинами волн оказались волны синего участка

спектра (445 нм). Волны длиннее 510 нм были мало эффективными с этой точки зрения. Общая форма этого спектра действия была похожа на спектр, полученный для многих типов реакций на синий свет, в которых фоторецептором считался флавопротеин. С этой точки зрения реакция *Coprinus congregatus* является типичным примером "реакции на синий свет". Многие организмы демонстрируют широкий набор физиологических реакций на синий и ближний УФ-свет. Так называемая "реакция на синий свет" известна для многих организмов: бактерий, грибов, растений и животных. В этих ранних работах считалось, что рецепторами ответственными за "реакцию на синий свет" являются каротины и флавин, хотя более поздние работы 70-80-х годов находят аргументации в пользу флавонов [290].

Хотя, примененные в работах методы анализа не позволяют детектировать быстрые индуцированные светом реакции, их результаты могут быть важными для нашего понимания реакции грибов на свет разных диапазонов длин волн.

1.7. Фоторегуляция метаболизма грибов

Много исследований в настоящее время посвящено вопросам фоторегуляции метаболических путей грибов [23; 121; 125; 129; 137; 214; 520; 521; 522; 524; 525]. И эта новая информация в дальнейшем может быть положена в основу совершенствования биотехнологических процессов.

Известно, что каротиноиды выполняют защитную функцию в организме животных и человека [575], которые не в состоянии самостоятельно производить каротиноиды. Это также главная причина, почему их получают в больших масштабах как химическим, так и биотехнологическим способами [209]. Эти пигменты могут действовать как антиоксиданты и поглощают синий свет. Изучение синтеза каротиноидов грибами началось более 100 лет назад [402] и детально исследовалось у

Phycomyces blakesleeanus, начиная с 1950-х годов [238; 322; 462; 594]. Среди грибов-продуцентов каротиноидов зигомицеты *Blakeslea trispora*, *P. blakesleeanus* и *Mucor circinelloides* представляют промышленный интерес. У *P. blakesleeanus* хорошо изучены его реакция на свет и синтез каротиноидов: как короткие импульсы света, так и длительное освещение вызывают увеличение накопления им каротина [221]. Такой промышленно важный гриб, как *Gibberella fujikuroi* (*Fusarium moniliforme*) производит значительное количество каротиноидов при выращивании на свету, в результате чего мицелий этого гриба становится оранжевым [210]. При выращивании его в темноте мицелий белый с низким содержанием каротиноидов. В отличие от *Neurospora*, которой достаточно нескольких секунд подсветки для запуска синтеза каротиноидов [557], *Gibberella fujikuroi* требуется по меньшей мере 8 мин фотоиндукции [210].

В настоящее время у меланинсодержащих грибов предполагается наличие как минимум двух фото рецепторных систем: микохромной и системы с участием меланинового пигмента в качестве первичного фоторецептора [60]. Известно, что пигменты коричневого и черного цвета вырабатываются клетками многих живых организмов, как защитная реакция в ответ на излучения разного вида. Имеются указания о положительном влиянии освещения в видимой части спектра на интенсивность пигментации разных видов микромицетов.

Свет стимулирует синтез полисахаридов у *Penicillium isariiiforme*. Кроме того, синий свет увеличивает выделение грибом лимонной кислоты [328]. Влияние света на углеводный обмен обнаружено и у *P. blakesleeanus* [551]. Доказано, что свет высокой степени интенсивности стимулирует у этого гриба пентознофосфатные пути и блокирует поступление пирувата лимонной кислоты. Хотя молекулярные механизмы, лежащие в основе фоторегуляции поглощения глюкозы не полностью выяснены на молекулярном уровне, известно, что ферменты, ответственные за биосинтез

метаболитов у *P. blakesleeanus*, по-видимому, частично регулируются светом [547].

У *Blastocladiella emersonii* свет стимулирует синтез полисахаридов и снижает активность глюкозо-6-фосфат дегидрогеназы [326]. Содержание полисахаридов в мицелии увеличивается на свету в два раза.

Облучение низкоинтенсивным лазерным светом 632,8 нм и 488,0 нм увеличивает синтез полисахаридов у *Ganoderma lucidum*, более чем на 60% и способствует увеличению процентного содержания в экзополисахаридах ксилозы и глюкозы. Одновременно такое облучение приводит к значительному (вдвое) уменьшению маннозы в стационарной культуре гриба на жидкой среде. При глубинном культивировании *G. lucidum* на такой же среде облучение инокулюма в аналогичных режимах, напротив, приводит к уменьшению содержания ксилозы и глюкозы и значительному увеличению (в 5-6 раз) маннозы. Наши данные свидетельствуют, что трансформация световой энергии, которая поглощается грибными клетками, в значительной мере определяется следующими условиями культивирования гриба. Красный свет ($\lambda = 660$ нм) вызывал увеличение синтеза экзополисахаридов на 15 % у аскомицета *Morchella conica* и на 18 % - у *Morchella esculenta*. Эти грибы не проявили чувствительности к синему свету [137].

Известно, что свет может значительно ингибировать поглощение глюкозы у *Aspergillus ornatus* [355], а глюкозоамилазная активность мицелия *Aspergillus niger*, подвергшегося воздействию голубого света увеличивается более чем в 2,5-раза по сравнению с мицелием, выращенным в темноте [668]. Выращенные на свету культуры *P. blakesleeanus* показывают более высокий уровень активности алкогольдегидрогеназы [321].

Свет контролирует ряд метаболических процессов у *Aspergillus giganteus*. У этого гриба появление некоторых полисахаридов [306; 307], а также количество глюканов или гликогена [308] зависит от интенсивности света. Кроме того, внутриклеточный синтез, деградация углеводов, а также некоторые этапы гликолиза пентозофосфатного пути, или цикла лимонной

кислоты изменяются в ответ на освещение. Световые эффекты на промежуточной стадии гликолиза известны для различных видов грибов.

При освещении грибного мицелия клеточная стенка является первым объектом воздействия фотонов. Некоторые исследования показали изменение состава клеточной стенки в ответ на свет. Переходные изменения в структуре клеточной стенки были обнаружены у *P. blakesleeanus* [353]. Содержание хитина в клеточной стенке *A. giganteus* удваивается, если мицелий выращивают на свету [307]. У этого гриба уровни S- и R-глюканов в мицелии изменяются после воздействия света. Облучение *Trichoderma harzianum* влияет на ферменты, участвующие в биосинтезе компонентов клеточной стенки: уже через 10 мин освещения, удельная активность бета-1,3-глюкансинтетазы увеличивается примерно на 130%, а удельная активность хитинсинтетазы уменьшается на 50%. [488].

Китайские ученые определили фоторегулируемые гены у *Alternaria alternata*, которые контролируют метаболизм липидов и окисление жирных кислот [247].

Несмотря на важность нуклеотидов и нуклеозидов для грибной клетки в процессах энергетического метаболизма и регулировки окислительно-восстановительного потенциала, сведения о их фоторегуляции у грибов весьма ограничены. Известно, что у *Blastocladiella emersonii* при росте на свету содержание нуклеиновых кислот в клетке растет быстрее, чем в темноте и увеличивается на 28% [326].

Доказано влияние света на поглощение аминокислот и синтез белка различными грибами. У *Aspergillus ornatus* потребление многих аминокислот значительно снижается на свету, хотя, с другой стороны, поглощение лизина увеличивается [355]. У *Trichoderma viride* активность декарбоксилазы глутаминовой кислоты, которая катализирует альфа-декарбоксилирование L-глутаминовой кислоты, стимулируется светом [509; 579]. Количество гамма-аминомасляной кислоты в мицелии *Monascus pilosus* значительно

увеличивается после освещения [466]. Содержание белка у *Blastocladiella emersonii*, выращенного на свету увеличивается более, чем на 30% [355].

Циклический аденозинмонофосфат (цАМФ) является вторичным мессенджером эукариот. Это соединение образуется под воздействием нескольких внеклеточных раздражителей и регулирует различные физиологические процессы. Два фермента, аденилатциклаза и фосфодиэстераза, являются основными регуляторами уровня цАМФ в грибах [284]. Световые импульсы существенно влияют на уровни цАМФ у *Trichoderma viride* [300; 331] и вызывают быстрое, но кратковременное повышение внутриклеточной концентрации АТФ и цАМФ, которые могут способствовать фосфорилированию белков в ответ на свет.

Фоточувствительность метаболизма азота у грибов изучена довольно незначительно. Однако некоторые исследователи полагают, что связь между светом и азотным обменом может существовать [370; 544; 571]. Обнаружено, что среди генов, контролирующих циркадные часы, есть несколько, участвующих в метаболизме азота [256]. У *N. crassa* синий свет индуцирует снижение нитратредуктазной активности [401]. Эта незначительная информация все же дает основания предполагать, что свет может влиять на метаболизм азота, хотя, для подтверждения этой гипотезы необходимы дополнительные исследования.

В настоящее время доказано влияние света на вторичный метаболизм грибов. Отрицательное воздействие света на синтез афлатоксина *Aspergillus flavus* было показано ещё 40 лет назад. Свет тормозил синтез микотоксинов альтернариол и альтернариол монометилового эфира *Alternaria alternata*, [338]. Однако более поздние исследования, напротив показали, что синтез афлатоксина В1 и охратоксина 1 *Aspergillus flavus* и *Aspergillus ochraceus*, соответственно, усиливается при выращивании их на свету. Фоторегуляция токсинообразования обнаружена и некоторых других

видов грибов *A. nidulans* [393], *A. flavus* [291], *Hypocrea atroviridis* [403; 408], *Fusarium verticillioides* [482]. Так, свет является важным индуктором для биосинтеза церкоспорина у *Cercospora* ssp. [268]. Обнаружено, что у гриба из рода *Monascus*, который используется в традиционной восточной кухне, красный свет имеет больший стимулирующий эффект на синтез вторичных метаболитов, чем синий, который стимулирует синтез только одного метаболита [466].

1.8. Опыт и перспективы использования искусственного света при культивировании грибов

В настоящее время преобладает эмпирический подход к разработке методов светового воздействия на грибы. Это связано с отставанием теоретического и экспериментального обоснования механизма взаимодействия низкоинтенсивного излучения с грибным организмом. Тем не менее, практическое использование света в биотехнологических процессах возможно даже в отсутствии общепринятых выводов о механизмах его действия. Естественно, что при условии тщательного исследования спектра действия, наиболее эффективных длин волн, режимов облучения (интенсивности, дозы, геометрии, поляризации, когерентности и т.п.) эффективность применения света с учетом механизма его действия усилилось бы многократно.

Как перспективный природный экологически чистый регуляторный фактор свет в видимой части спектра уже используют в биотехнологии глубинного культивирования мицелиальных грибов рода *Aspergillus* [39]. Установлено, что свет длиной волны 650 и 530 нм существенно влияет на образование регуляторов роста и интенсивность ростовых процессов этого гриба, а также выступает как модификатор липидного и углеводного состава грибных спор. Изменения, вызванные светом, имеют пролонгированное

действие и могут передаваться на дальнейшую онтогенетическую стадию от спор к мицелию. В вегетативном мицелии, сформировавшемся из модифицированных под действием света спор, также сохраняется способность к ускоренному росту, наблюдается изменение в углеводном и липидном составе, а, следовательно, и в составе и активности ферментов, имеющих непосредственное отношение к метаболизму. Кроме того, изменяется активность экзоферментов, в частности целлюлозолитического комплекса. Показано, что характер биохимических изменений в клетках грибов зависит как от длины волны, так и от интенсивности освещения, причем снижение интенсивности света сопровождается усилением его регуляторного действия. Таким образом, варьируя параметры освещения, можно получить споры заданного качества.

Инфракрасные лучи в определенных дозах вызывают усиление роста культур лекарственных грибов *Coriolus vaporarius* и *Serpula lacrimans*. Отсутствие или наличие светового воздействия в период вегетативного роста мицелия сказывается на характере последующего плодоношения *Coprinus congregatus* [444]. Обилие, скорость и одновременность плодоношения зависят от предварительного пребывания мицелия в темноте.

В настоящее время в биотехнологии, как одной из наиболее динамично развивающихся областей человеческой деятельности, большое применение нашли лазерные технологии. Возможность целенаправленного воздействия лазера на внутриклеточные процессы и регулирование процессов биосинтеза обусловлена селективным воздействием монохроматического света на электроны фоточувствительных структур, фоторецепторы и внутриклеточные процессы у живых организмов. Преимуществом лазерного излучения является возможность создания высокой спектральной яркости излучения, не достигаемой при использовании обычных некогерентных источников света. Такие свойства лазера позволяют говорить о возможности его использования для реализации высокоэффективных биотехнологий получения культур с высокой биологической активностью, повышенным

внутри- и внеклеточным содержанием ценных биологических продуктов. В то же время, практическое использование монохроматического света в биотехнологических процессах ограничено отсутствием сведений, четко определяющих механизмы действия света, эффективные длины волн и режимов облучения. Не все высказанные положения по биомеханизму действия низкоинтенсивного лазерного излучения являются бесспорными, некоторые из них – лишь теоретические гипотезы и окончательно не подтвержденные концепции. Одним из спорных остается, в частности, вопрос о специфичности лазерного излучения низкой интенсивности на биологические объекты. В настоящее время существуют две основные конкурирующие теории. Первая, наиболее популярная, рассматривает лазерное излучение как один из факторов активации неспецифической резистентности организма, который следует объяснять исходя из точки зрения целостности организма. Вторая теория основана на идее влияния "специфического» монохроматического света на некие особые системы фоторегуляции, существующие для опосредованного регуляторного действия солнечного света на организм животных, т.е. предполагают наличие фотоакцепторов [87; 93].

В 1978 году С.М. Зубкова высказала предположение, что биостимулирующее действие излучения гелий–неонового лазера (ГНЛ) связано с его поглощением порфиринсодержащим ферментом каталазой, имеющим максимум светоабсорбции порядка 628 нм. На основании этой теории параметры лазерного излучения во многом определяют ответную реакцию организма [66].

Эффект стимулирования роста и биологической активности под действием низкоинтенсивного излучения обнаружен у некоторых бактерий и дрожжей а также у многих видов высших растений и животных [386]. При воздействии лазера на клетки возникают фотофизические и фотохимические реакции, связанные с поглощением световой энергии и нарушением слабых молекулярных связей, а также происходят восприятие и перенос эффекта

лазерного излучения жидкими средами организма. Наличие в биологических тканях специфических фото акцепторов, в частности гемоглобина, порфиринов, циклических нуклеотидов, железо- и медьсодержащих ферментов (каталаза, супероксиддисмутаза), ферментов окислительно–восстановительного цикла, цитохромов, пигментов и других веществ), усиливает восприимчивость биологических тканей к лазерному излучению. Лазерное излучение вызывает; повышение энергизации митохондрий [329; 503; 606]; усиленное образование АТФ; увеличение активности дыхательных ферментов каталазы, цитохромоксидазы); активацию метаболизма клеток и повышение их функциональной активности. Итоговый результат фотобиологического процесса, заключающийся в кратко– или долговременной адаптации организма, – это ответ биологического объекта на лазерное воздействие на клеточном и тканевом уровне, причём само воздействие играет роль триггера, запускающего всю цепь преобразований в биообъекте [556]. Поэтому вторичные проявления и конечные результаты, выражающиеся в реакции организма многообразны, хотя первичные фотоакцепторные акты достаточно просты и немногочисленны.

Стимуляция биосинтетических процессов может быть одним из важных моментов, определяющих действие низкоинтенсивного излучения лазера на важнейшие функции клеток и тканей, процессы жизнедеятельности и регенерации (восстановления). ГНЛ приводит к увеличению содержания в ядрах клеток человека ДНК и РНК, что свидетельствует об интенсификации процессов транскрипции (делений). Это первый этап процесса биосинтеза белков. В связи с этим возникает вопрос о запуске мутаций [43; 98]. Однако доказано, что частота хромосомных мутаций в клетках человека вызванных химическими мутагенами, при воздействии ГНЛ уменьшается. ГНЛ оказывает *антимутагенный* эффект, активизирует синтез ДНК и ускоряет восстановительные процессы в клетках подвергнутых потоку нейтронов или гамма - радиации. Это позволяет использовать лазерное излучение в

онкологии, на вредных производствах, в военной медицине, как профилактический, так и лечебный фактор в комбинации с медикаментами.

НИЛИ стимулирует выработку универсального источника энергии АТФ (АТР) в митохондриях, ускоряет скорость его образования, повышает эффективность работы дыхательной цепи митохондрий. В то же время количество потребляемого кислорода уменьшается. Происходят перестройки в мембранах митохондрий. НИЛИ оказывает *антиоксидантный* эффект. Известно, что интенсивность свободнорадикального окисления в липидной фазе мембран клеток определяется соотношением насыщенных и ненасыщенных липидов, вязкостью липидной компоненты мембран, которые меняются при лазерной терапии, что отражается на структурных перестройках в мембране, ее функциональном состоянии, активности мембраносвязанных ферментов [43; 98; 318].

Несмотря на слабую изученность механизма биорегуляторного действия лазерного излучения, его применение в практических целях оказалось весьма успешным в растениеводстве [67; 132; 145]. Наибольшее практическое значение среди них имеет предпосевная обработка семян. Эксперименты, проведенные с различными культурами, позволяют говорить об универсальности такого метода. Некоторые исследователи отмечали антистрессорное действие когерентного излучения, которое связывали с увеличением активности дыхательных ферментов (супероксидредуктазы, глутатионредуктазы, пероксидазы, каталазы и др.). Впервые исследования возможности использования когерентного света для биорегуляции грибов, начатые коллективами Института ботаники им. Н.Г. Холодного и Института физики НАН Украины, также доказывают перспективность использования искусственного света (когерентного и некогерентного) в биотехнологиях культивирования съедобных и лекарственных грибов [23].

Новым трендом в растениеводстве является использование светоизлучающих диодов (light emitting diodes, LED) как имеющей ряд преимуществ альтернативы для искусственного освещения в тепличном

хозяйстве [587; 636]. По сравнению с обычными лампами высокого давления и флюоресцентными лампами, LED являются энергоэффективными, безопасными для окружающей среды и долговечными источниками света. Комбинируя различные типы LED, которые доступны для широкого диапазона областей спектра от красного до УФ, можно сформировать спектр для оптимального роста. LED - технология освещения открывает новые возможности культивирования растений, таких как импульсное облучение и динамическая адаптация суточного цикла и различных фаз роста к импульсному облучению.

Видимо, поэтому в последние годы появились сообщения об использовании LED при культивировании некоторых видов макромицетов с целью получения плодовых тел [193; 453; 480; 481; 484]. Изучалось влияние освещения светом в синем, зеленом, желтом и синем диапазонах длин волн в период вегетативного роста и формирования примордиев на образование плодовых тел, морфологию и антиоксидантную активность *Pleurotus eryngii* и *Hypsizygus marmoreus* [480; 481]. Постоянное освещение синим светом на стадии вегетативного роста приводило к значительному увеличению урожайности и количества плодовых тел *Lentinula edodes*, *Flammulina velutipes*, *Hypsizygus marmoreus*, *Grifola frondosa*, *Pholiota nameko* и *Pleurotus eryngii* [193; 467; 484].

Несмотря на определенные успехи в практическом использовании искусственного света при выращивании грибов, его применение ограничено поверхностным культивированием с целью повышения урожайности плодовых тел, а возможность фоторегуляции с использованием источников искусственного света при их глубинном культивировании практически не рассматривалась.

Результаты проведенного нами анализа данных литературы о воздействии света на грибы разных крупных таксонов (зиго-, аско- и базидиомицетов) свидетельствуют о несомненном регуляторном влиянии этого фактора на морфогенез и метаболизм грибов. Определенный массив

информации о воздействии этого фактора на рост, развитие, обмен веществ накоплен и для сумчатых и базидиальных макромицетов, в т.ч. съедобных и лекарственных. Но многие теоретические и практические вопросы взаимодействия света с этими грибами только намечены и нуждаются в более глубокой проработке. При этом особенного внимания заслуживает экспериментальная оценка роли света как экологического фактора при выращивании макромицетов пищевого и фармакологического назначения. Литературные данные об исследованиях воздействий света на макромицеты – продуценты биомассы и/или вторичных метаболитов крайне ограничены, а именно они необходимы для создания новых современных биотехнологий.

Однако, основой разработки методов практического использования искусственного света в биотехнологиях культивирования макромицетов, несомненно должен стать накопленный мировой опыт изучения механизмов взаимодействия низкоэнергетического излучения с биообъектами, основой которых являются фотофизические и фотохимические реакции, связанные с резонансным поглощением света клетками и нарушением слабых межмолекулярных связей, а также восприятие и перенос эффекта облучения жидкими средами организма.

О перспективности такого подхода при разработке концепции работы говорят, установленные экспериментальным путем факты – при взаимодействии света и биологического объекта последовательно или одновременно происходят следующие процессы и реакции:

на атомно-молекулярном уровне -

- поглощение света фотоакцептором;
- внешний фотоэффект;
- внутренний фотоэффект и его проявления;
- возникновение фотопроводимости;
- возникновение фотоЭДС;
- фотодиэлектрический эффект;
- электролитическая диссоциация ионов (разрыв слабых связей);

- образование электронного возбуждения;
- миграция энергии электронного возбуждения;
- первичный фотофизический акт;
- появление первичных фотопродуктов;

на клеточном уровне:

- изменение энергетической активности клеточных мембран,
- активация ядерного аппарата клеток, системы ДНК-РНК-белок,
- активация окислительно-восстановительных, биосинтетических процессов и основных ферментативных систем,
- увеличение образования макроэргов (АТФ),
- увеличение метаболической активности клеток, активация процессов размножения.

РАЗДЕЛ 2

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для выполнения поставленной цели и решения, намеченных нами комплексных задач при разработке биотехнологических основ интенсификации культивирования съедобных и лекарственных макромицетов с помощью света низкой интенсивности был подобран ряд методов исследований. Он включал как традиционные подходы и методы, так и уникальные, адаптированные к нашей программе исследований: микробиологические и микологические (культивирование макромицетов и исследования их свойств), биохимические (изучение метаболических изменений) и фотобиологические (подбор энергоэффективных источников искусственного света с контролируемыми спектральными, энергетическими, поляризационными характеристиками для активации посевного материала, изучение фоточувствительности). Были разработаны специальные системы облучения, позволяющие максимально точно контролировать спектральные, энергетические, поляризационные параметры света.

2.1. Объекты исследования

Объектами исследований были чистые культуры макромицетов 27 штаммов 12 видов 10 родов 4 порядков 2 отделов Ascomycota и Basidiomycota (табл. 2.1), известные, как продуценты пищевой биомассы и биологически активных веществ, и которые хранятся в Коллекции культур шляпочных грибов Института ботаники им. М.Г. Холодного НАН Украины (ИБК).

Таблица 2.1

Систематическое положение штаммов макромицетов, использованных в работе

№ п/ п	Порядок	Семейство	Вид гриба	Номер штамма в коллекции ИБК	Исследования, проведенные со штаммом
1	2	3	4	5	6
Отдел Ascomycota					
1	<i>Hypocreales</i>	<i>Cordycipitaceae</i>	<i>Cordyceps militaris</i> (L.) Link	2029	Влияние света низкой интенсивности на ростовую и биосинтетическую активность мицелия при поверхностном и глубинном культивировании на жидких средах
2	<i>Hypocreales</i>	<i>Cordycipitaceae</i>	<i>Cordyceps sinensis</i> (Berk.) Sacc. Link	2028	Влияние света низкой интенсивности на ростовую и биосинтетическую активность мицелия при поверхностном и глубинном культивировании на жидких средах
3	<i>Pezizales</i>	<i>Morchellaceae</i>	<i>Morchella esculenta</i> (L.) Pers.	1843	Влияние света низкой интенсивности на ростовую и биосинтетическую активность мицелия при поверхностном и глубинном культивировании на жидких средах
4	<i>Pezizales</i>	<i>Morchellaceae</i>	<i>Morchella conica</i> Pers.	1738	Влияние света низкой интенсивности на ростовую и биосинтетическую активность мицелия при поверхностном и глубинном культивировании на жидких средах

Продолжение таблицы 2.1

1	2	3	4	5	6
Отдел Basidiomycota					
5	<i>Agaricales</i>	<i>Agaricaceae</i>	<i>Agaricus bisporus</i> (J.E. Lange) Imbach	5422	Фоточувствительность базидиоспор, влияние света низкой интенсивности на ростовую активность моноспоровых изолятов и вегетативного мицелия, плодоношение, урожайность и качество плодовых тел
6				5418	Фоточувствительность базидиоспор
7				5437	Фоточувствительность базидиоспор
8	<i>Agaricales</i>	<i>Marasmiaceae</i>	<i>Lentinula edodes</i> (Berk.) Pegler (= <i>Lentinus edodes</i> (Berk.) Singer)	520	Фоточувствительность базидиоспор
9				353	Фоточувствительность базидиоспор, влияние света низкой интенсивности на ростовую активность моноспоровых изолятов и вегетативного мицелия, биосинтетическую активность при поверхностном и глубинном культивировании, динамика фотоиндуцированной активности, плодоношение, урожайность и качество плодовых тел
10				1992	Фоточувствительность базидиоспор

Продолжение таблицы 2.1

1	2	3	4	5	6
11	<i>Agaricales</i>	<i>Physalacriaceae</i>	<i>Flammulina velutipes</i> (Curtis) Singer	1668	Фоточувствительность базидиоспор
12				3923	Фоточувствительность базидиоспор, влияние света низкой интенсивности на ростовую активность моноспоровых изолятов и вегетативного мицелия при поверхностном и глубинном культивировании, динамика фотоиндуцированной активности, плодоношение и урожайность плодовых тел
13				2038	Фоточувствительность базидиоспор
14	<i>Agaricales</i>	<i>Pleurotaceae</i>	<i>Pleurotus ostreatus</i> (Jacq.) P. Kumm.	527	Фоточувствительность базидиоспор
15				531	Фоточувствительность базидиоспор, влияние света низкой интенсивности на ростовую активность моноспоровых изолятов и вегетативного мицелия при поверхностном и глубинном культивировании, динамика фотоиндуцированной активности, плодоношение и урожайность плодовых тел.
16				553	Фоточувствительность базидиоспор
17				431	Влияние света низкой интенсивности на ростовую активность посевного мицелия, плодоношение, урожайность и качество плодовых тел

Продолжение таблицы 2.1

1	2	3	4	5	6
18	<i>Hymenochaetales</i>	<i>Hymenochaetaceae</i>	<i>Inonotus obliquus</i> (Ach.: Pers.) Pilát	1877	Влияние света низкой интенсивности на ростовую и биосинтетическую активность мицелия при поверхностном и глубинном культивировании на жидких средах, динамика фотоиндуцированной активности
19	<i>Polyporales</i>	<i>Ganoderma- taceae</i>	<i>Ganoderma applanatum</i> (Pers.) Pat.	920	Фоточувствительность базидиоспор
20				1552	Фоточувствительность базидиоспор
21				1899	Фоточувствительность базидиоспор, влияние света низкой интенсивности на ростовую активность моноспоровых изолятов и вегетативного мицелия, биосинтетическую активность при поверхностном и глубинном культивировании
22	<i>Polyporales</i>	<i>Ganoderma- taceae</i>	<i>Ganoderma lucidum</i> (Curtis) P. Karst.	921	Фоточувствительность базидиоспор
23				1670	Фоточувствительность базидиоспор
24				1908	Фоточувствительность базидиоспор, влияние света низкой интенсивности на ростовую активность моноспоровых изолятов и вегетативного мицелия, биосинтетическую активность при поверхностном и глубинном культивировании, динамика фотоиндуцированной активности

Продолжение таблицы 2.1

1	2	3	4	5	6
25	<i>Russulales</i>	<i>Hericiaceae</i>	<i>Hericium erinaceus</i> (Bull.) Pers	963	Фоточувствительность базидиоспор, влияние света низкой интенсивности на ростовую активность моноспоровых изолятов и вегетативного мицелия, биосинтетическую активность при поверхностном и глубинном культивировании, динамика фотоиндуцированной активности, плодоношение, урожайность и качество плодовых тел
26				969	Фоточувствительность базидиоспор
27				1756	Фоточувствительность базидиоспор

2.2. Методы культивирования макромицетов

Источником посевного материала во всех исследованиях служила чистая культура соответствующего штамма макромицета, которая была выращена на агаризованной среде в течение 14 суток. Культивирование проводили при $25\pm 2^\circ\text{C}$ в термостате. Для проращивания спор, изучения поверхностного роста и параметров радиального роста макромицеты выращивали на агаризованном пивном сусле (7^0 по Баллингу).

При исследованиях динамики накопления биомассы, биосинтетической активности и трофики макромицетов эксперименты проводили на жидких питательных средах в условиях стационарного и динамического культивирования на жидком пивном сусле (7^0 по Баллингу) и на глюкозо-пептонной среде (г/л: глюкоза – 20,0; KH_2PO_4 – 1,0; K_2HPO_4 – 1,0; MgSO_4 – 0,25; пептон – 3,0; КЭ – 2,0) в колбах Эрленмейера на качалке. Температура культивирования - $25\pm 2^\circ\text{C}$, длительность – 7-14 сут.

2.3. Определение параметров роста макромицетов

При изучении радиальной скорости роста и ростового коэффициента грибы выращивали на чашках Петри с агаризованной средой (сусло-агар). В качестве посевного материала были использованы активно растущие 5-8-суточные культуры. Диски мицелия диаметром 5 мм вырезали стерильной стальной трубкой на расстоянии 8-10 мм от края активно растущей колонии. Диски переносили и мицелием вниз помещали в центр чашки Петри диаметром 90 мм. Посевы инкубировали в термостате при температуре 26°C , точно фиксируя время начала роста (появление мицелия за пределами посевного диска). Расчет скорости радиального роста проводили по методике, описанной в литературе [164]. Радиусы колоний измеряли в двух взаимно перпендикулярных направлениях через сутки до полного обрастания

среды. Для расчетов средней скорости радиального роста (V_R , мм/сутки) строили кривые зависимости радиуса мицелиальной колонии от времени культивирования, как показано на рис. 2.1, и в фазе линейной зависимости прироста радиуса от времени на основании 8-12 параллельных измерений определяли среднюю скорость роста по формуле:

$$V_R = \frac{R_1 - R_0}{t_1 - t_0}, \text{ мм/сут}$$

где R_1 – радиус колонии в конце роста, мм; R_0 – радиус колонии в начале фазы линейного роста,

мм; $t_1 - t_0$ – продолжительность линейной фазы роста, сутки.

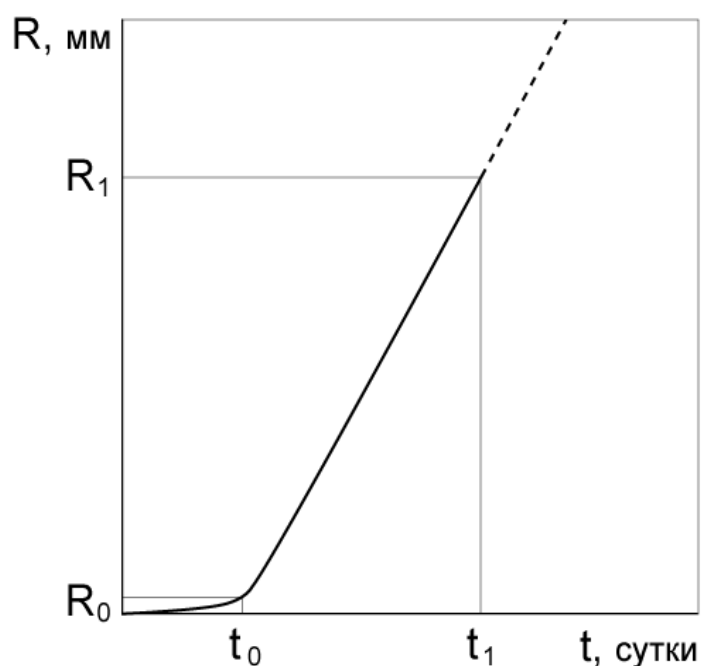


Рис. 2.1. Зависимость радиуса колонии (R) от времени культивирования (t)

Для расчета ростового коэффициента (РК) измеряли диаметр колонии, высоту и плотность мицелия [30]

2.4. Получение плодовых тел и спорового материала макромицетов

Посевной мицелий гриба получали общеизвестными способами [24]: маточной культурой с агаризованной среды инокулировали стерильное отваренное зерно пшеницы, которое инкубировали в темноте при температуре 26⁰С до полного обрастания субстрата.

Плодовые тела *Agaricus bisporus* получали в камерах комплекса по выращиванию шампиньонов агрокомбината «Пуща-Водица» (Киев). Культивирование *A. bisporus* проводилось по применяющейся на комбинате технологии [52]. В опытах использовали синтетический шампиньонный компост (в расчете на 1 т сухой соломы), состоящий из 900 кг сухого куриного помета, 100 кг нитрата аммония, 1 т сухой пшеничной соломы. Компост расфасовывали в полиэтиленовые мешки по 10 кг и инокулировали зерновым мицелием. Посевной мицелий вносили в следующих дозах: 1 - необлученный мицелий (контроль) - стандартная доза (0,30% по весу); 2 - облученный мицелий (опыт 1) – стандартная доза (0,30% по весу) и 3 - облученный мицелий (опыт 2) – половина стандартной дозы (0,15% по весу). В каждом варианте использовалось по 1 т компоста (100 мешков по 10 кг).

Плодовые тела *A. bisporus*, собранные с каждого мешка за три волны плодоношения, взвешивали. Урожайность рассчитывали, как массу свежих грибов на 100 кг компоста в момент инокуляции. Отдельно взвешивали грибы с закрытым покрывалом, соответствующие требованиям предъявляемым к грибам первого сорта (ТУ 01.1-31747649-003-2002).

Плодовые тела других макромицетов получали в процессе интенсивного культивирования [2] на следующих субстратах:

F. velutipes, *G. applanatum* и *G. lucidum* - осиновые опилки (60%) и пшеничные отруби (40%);

H. erinaceus и *L. edodes* - буковые опилки (60%) и кукурузная крупа (40%);

P. ostreatus - солома пшеничная 40%, опилки ольхи 40%, пшеничные отруби 20%

Субстраты увлажняли водой до 65 %. Зерно пшеницы для приготовления посевного мицелия отваривали. Для изучения плодообразования субстрат фасовали по 200 грамм в 0,5-литровые банки или по 750 грамм в пакеты из полиэтилена низкого давления. Емкости закрывали алюминиевой фольгой. Повторность 5-кратная. Субстрат стерилизовали в автоклаве при температуре 119-121⁰С, давлении 0,12 МПа в течение 1 часа. После охлаждения субстрат в стерильных условиях инокулировали посевным зерновым мицелием штаммов в количестве 2-5 % от массы субстрата. Емкости с инокулированным субстратом инкубировали при 26⁰С. Плотность обрастания субстрата мицелием оценивали визуальным методом по 6-бальной шкале: 0 – мицелий на субстрате отсутствует; 1 – мицелий очень редкий, плохо различимый невооруженным глазом; 2 – мицелий редкий, просвечивающийся, хорошо виден субстрат; 3 – мицелий средней плотности, субстрат различим; 4 – мицелий плотный, субстрат еле-еле различим; 5 – мицелий очень плотный, субстрат не виден. После полного обрастания субстрата обеспечивали условия для получения плодовых тел гриба: температура воздуха 14-18⁰С, интенсивность освещения 100-300 люкс, влажность воздуха 90-95 %, 5-кратный воздухообмен.

Отдельные детали методики приведены при изложении результатов исследований.

2.5. Проращивание спор и получение моноспоровых изолятов

Для получения спор *A. bisporus*, *F. velutipes*, *L. edodes* и *P. ostreatus* брали зрелые плодовые тела, которые протирали 70% спиртом. При получении споровых отпечатков *Agaricus bisporus* были взяты плодовые тела с закрытым частным покрывалом, которое стерильно удаляли пинцетом. Ножку обрезали до уровня шляпки. Подготовленные таким образом

плодовые тела помещали в стерильные чашки Петри и оставляли на сутки при температуре +20-22⁰С.

Споры *G. applanatum*, *G. lucidum* и *H. erinaceus* получали из зрелых плодовых тел, которые подвешивали в стерильных емкостях над стерильной фольгой и также оставляли при температуре +20-22⁰С на 1-2 суток.

Из базидиоспор готовили водные суспензии, под микроскопом в камере Горяева для каждого штамма определяли концентрацию спор и высевали на поверхность голодного агара, равномерно распределяя суспензию. Поскольку споры *A. bisporus* не прорастают на голодном агаре [181] процесс их прорастания изучали на среде Гудвина [322].

Для предотвращения бактериальной инфекции в среду добавляли антибиотики: 200 ед. пенициллина и 100 ед. стрептомицина на 1 мл среды. Инкубировали в темноте при температуре 26⁰С. Прорастание спор контролировали под микроскопом ежедневно. Отдельно лежащие проросшие споры изолировали и помещали в новые чашки Петри с сусло-агаром для измерения скорости роста. Сформированные мицелиальные структуры анализировали на наличие пряжек и кариотичность. Ядра окрашивали по методу Гимза [30].

2.6. Анализ биомассы и культуральных жидкостей

Для определения концентрации биомассы мицелий гриба отделяли от культуральной жидкости и высушивали в сушильном шкафу при температуре 105 °С до постоянной массы. Концентрацию биомассы рассчитывали в граммах сухого вещества на 1 л среды.

Определение редуцирующих веществ (РВ) в культуральной жидкости проводили методом Хагедорна – Йенсена следующим образом: в пробирку вносили 1 мл культуральной жидкости и добавляли 3 мл феррицианидного реактива. Смесь кипятили на водяной бане в течение 10 мин, охлаждали и измеряли интенсивность окрашивания на спектрофотометре (ФЕК) при

длине волны 400 нм относительно дистиллированной воды. Содержание РВ определяли по калибровочному графику, который был предварительно построен с использованием глюкозы в качестве стандарта. Расчет проводили по формуле: $PP = xp$, где x – количество глюкозы по калибровочной кривой, мкг/мл; p – коэффициент, учитывающий разбавление пробы [285].

Экономический коэффициент (Y) рассчитывали по источнику углерода на основании данных определения абсолютно сухой массы мицелия и РВ в культуральной жидкости по формуле [110]:

$$Y = \frac{X}{S_0 - S_n},$$

где X – количество биомассы г/л; S_0 и S_n – начальное и конечное содержание РВ в культуральной жидкости, г/л.

Определение полисахаридов

После выращивания грибов мицелий отделяли от культуральной жидкости фильтрованием через плотную ткань, промывали дистиллированной водой и использовали для проведения соответствующих анализов.

Для определения эндополисахаридов измельчённую навеску сухого мицелия в количестве 100 мг помещали в пробирку объёмом 20 мл, добавляли 5 мл 1 М NaOH, закрывали пробками и экстрагировали в термостате при 60°C в течение 1ч, периодически перемешивая [588]. Полученный экстракт центрифугировали 20 мин при 8000 об/мин.

Для выделения экзополисахаридов культуральную жидкость упаривали в 2-3 раза, осаждали 96% этиловым спиртом (1:1), оставляли при температуре 4° С до полного осаждения, затем осаждённые полисахариды отделяли центрифугированием, диализовали 3 сут, против дистиллированной воды, переосаждали спиртом, отделяли центрифугированием и сушили при температуре 4° С [211]. Осадок отделяли и в супернатанте определяли

содержание полисахарида фенол-сернокислотным методом [46]. 1,0 мл супернатанта переносили в пробирку объёмом 20 мл, добавляли 1,0 мл 5% водного раствора фенола и тщательно перемешивали. К полученному раствору быстро добавляли 5 мл концентрированной серной кислоты при непрерывном встряхивании. Давали раствору отстояться в течение 10 мин, перемешивали и помещали на водяную баню при 25-30⁰С на 10-20 мин. Измерения проводили на фотоэлектроколориметре при 490 нм в кювете 5 мм. Контролем служил раствор, содержащий вместо супернатанта 1 мл дистиллированной воды, 1 мл 5% водного раствора фенола и 5 мл концентрированной серной кислоты.

Массовую долю эндополисахарида в сухой биомассе рассчитывали по формуле:

$$M = \frac{D \cdot K \cdot P \cdot 5}{n} \cdot 100,$$

где:

M – массовая доля эндополисахарида, %;

D – значение экстинкции;

K – коэффициент калибровочной кривой;

P – разведение;

5 – объем щелочного экстракта, мл;

n – навеска сухой биомассы, г.

Для определения коэффициента калибровочной кривой готовили маточный раствор глюкозы 100 мг в 100 мл дистиллированной воды (1 мг/мл). Маточный раствор глюкозы разводили в 10 раз (0,1 мг/мл) и из него готовили рабочие растворы с содержанием глюкозы: 0,01; 0,02; 0,03; 0,04; 0,05; 0,06; 0,07; 0,08; 0,09; 0,1 мг/мл.

Из полученных разведений брали по 1,0 мл раствора и переносили в пробирку объёмом 20 мл, добавляли 1,0 мл 5% водного раствора фенола и тщательно перемешивали. К полученному раствору быстро добавляли 5 мл

концентрированной серной кислоты при непрерывном встряхивании. Давали раствору отстояться в течение 10 мин, перемешивали и помещают в водяную баню при 25-30°C на 10-20 мин. Измерения проводили на фотоэлектроколориметре при 490 нм, в кювете №5. Контролем служил раствор, содержащий вместо раствора глюкозы 1 мл дистиллированной воды, 1 мл 5% водного раствора фенола и 5 мл концентрированной серной кислоты.

Для каждой концентрации рабочего раствора рассчитывали коэффициент по формуле:

$$K_1 = \frac{C}{D},$$

где:

C – концентрация глюкозы, мг/мл;

D – экстинкция раствора;

K₁ – коэффициент

Коэффициент калибровочной кривой (K) рассчитывали по формуле:

$$K = \frac{K_1 + K_2 + \dots + K_n}{n},$$

где K₁; K₂; K_n – коэффициенты концентраций рабочих растворов;

n – количество рабочих растворов.

Состав углеводов полисахаридов после предварительного гидролиза их 7%-ной серной кислотой на водяной бане при 100°C на протяжении 5 часов [92; 219] определяли методом газожидкостной хроматографии (ГЖХ) в виде триметилсилильных производных сахаров [337]. Хроматографирование проводили на хроматографе Chrom 5 с пламенно-ионизационным детектором, используя колонку из нержавеющей стали длиной 2,8 м, заполненную хроматоном N-AW-HMDS с 5% жидкой фазы SE-30, при программировании температуры в пределах от 140 до 280°C со скоростью 5°

в минуту. Гидролиз полисахаридов для определения состава углеводов проводили серной кислотой, для чего 20 мг полисахарида заливали 2 мл 72%-ной серной кислоты, и оставляли на 16 ч при комнатной температуре. Затем пробы разводили водой до 7%-ной концентрации кислоты и гидролизovali на кипящей водяной бане в течение 5 ч [55; 188].

Общее содержание углеводов определяли по [188]

Определение меланина

Экстракцию меланина из биомассы осуществляли 2%-ным раствором NaOH с коэффициентом разбавления 1:10 в течение 2-х часов на кипящей водяной бане. Полученный экстракт охлаждали и подкисляли до pH 2.0 концентрированной соляной кислотой. Коагулированный пигмент отделяли центрифугированием при 6000g в течение 15 минут. Полученный осадок растворяли в 2%-ном растворе NaOH и использовали для количественного определения меланина, которое рассчитывали по калибровочной кривой. Построение её вели на основании данных фотометрирования растворов пигмента *Inonotus obliquus* различной концентрации при длине проходящего света 490 нм. Меланин гриба для построения калибровочной кривой предварительно очищали методом гель-хроматографии на колонке 1,5x72 см с сорбентом Toyopearl HW-65 (Япония, Tojo Soda) в 0,01 н NaOH [44; 100]. Очищенные меланины с целью обессоливания диализовали против дистиллированной воды и лиофильно высушивали. Навеску 50 мг лиофильно высушенного меланина растворяли в 2%-ном растворе NaOH (исходная концентрация 1мг/мл). Полученный раствор меланина разводили в 5 раз (концентрация 0,2 мг/мл и использовали для последующих разведений)(табл. 2.2).

Содержание меланина в среде культивирования определяли прямым фотометрированием культуральной жидкости после отделения мицелиальной

массы грибов [7]. Общий выход меланина рассчитывали, как сумму меланина, экстрагированного из биомассы гриба (эндомеланины) и меланина, синтезированного грибом, в культуральной жидкости (экзомеланины).

Таблица 2.2

Разведения меланина для построения калибровочной кривой

Исходное содержание меланина, мг/мл.	V исходного раствора меланина, мл.	V дистиллированной воды, мл.	Полученное содержание меланина, мг/мл.	D ₄₉₀
0.2	1.0	9.0	0.02	0.05
0.2	2.0	8.0	0.04	0.10
0.2	3.0	7.0	0.06	0.17
0.2	4.0	6.0	0.08	0.24
0.2	5.0	5.0	0.10	0.30
0.2	6.0	4.0	0.12	0.37
0.2	7.0	3.0	0.14	0.43
0.2	8.0	2.0	0.16	0.48
0.2	9.0	1.0	0.18	0.54
0.2	10.0	0.0	0.20	0.58

Получение дезинтеграта для определения активности внутриклеточных ферментов макромицетов

Отделенную биомассу макромицетов многократно промывали от остатков культуральной жидкости дистиллированной водой. Клетки разрушали с помощью растирания в жидком азоте и суспендировали в 0,15 М калий-фосфатном буфере (pH 7,0).

От остатков клеток освобождались путем центрифугирования полученного дезинтеграта при 8000 об / мин. и в супернатанте определяли активность внутриклеточных ферментов тирозиназы, полифенолоксидазы, пероксидазы и каталазы.

Определение тирозиназной активности макромицетов

Тирозиназную активность определяли спектрофотометрически [57] при длине волны 475 нм, использовали в качестве субстрата 2 мМ раствор тирозина в 50 мМ натрий-калий фосфатном буфере, рН 6,0. За условную единицу активности принимали прирост оптической плотности в 1 мл реакционной смеси, пересчитанной на 1 мг внесенного белка. Тирозин производства фирмы "Sigma".

Определение полифенолоксидазной активности макромицетов

Полифенолоксидазную активность определяли спектрофотометрически [57] при длине волны 410 нм, как субстрата использовали 2 мМ раствор катехол (производства "Sigma") в ацетатном буфере, рН 5,5. За условную единицу активности принимали прирост оптической плотности в 1 мл реакционной смеси, пересчитанной на 1 мг внесенного белка. Катехол производства фирмы "Sigma".

Определение пероксидазной активности макромицетов.

Пероксидазную активность определяли спектрофотометрически [592] при длине волны 436 нм, в качестве субстрата использовали АБТС (2,2'-Азино-бис (3-этилбензотиазолин-6-сульфоная кислота) в ацетатном буфере, рН 5,5. Реакцию запускали 5 мкл 3 % пероксида водорода. За условную единицу активности принимали прирост оптической плотности в 1 мл реакционной смеси, пересчитанной на 1 мг внесенного белка. АБТС

(ABTS 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) производства фирмы "Sigma".

Определение каталазной активности макромицетов

Каталазную активность определяли спектрометрическим методом, суть которого заключается в способности пероксида водорода образовывать с солями молибдена стойкий окрашенный комплекс при длине волны 410 нм [79]. За условную единицу активности принимали снижение оптической плотности в 1 мл реакционной смеси, пересчитанной на 1 мг внесенного белка.

Активность внеклеточного каталазы выражали в ммольях, а внутриклеточной - в мкмольях разложенного H_2O_2 мин⁻¹ мг⁻¹ белка.

Расчет активности ферментов пероксидазы, полифенолоксидазы, тирозиназы и каталазы в исследуемых образцах проводили по формуле:

$$A = \frac{\Delta D * P}{\varepsilon_{\lambda}} * 10^3,$$

где - А - активность фермента, в МЕ [мл / мин. * Мл];

ΔD - изменение оптической плотности за 1 мин (характеризуется тангенсом угла наклона кинетической кривой);

Р - фактор разведения;

ε_{λ} - молярный коэффициент экстинкции субстрата при длине волны регистрации см. табл. 2.3.

Таблица 2.3

Величина молярного коэффициента экстинкции для использованных субстратов

Субстрат	Молярный коэффициент экстинкции, ε_{λ}
пирокатехин	740 М ⁻¹ см ⁻¹
АБТС	29500 М ⁻¹ см ⁻¹

Тирозин	$3700 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$
Пероксид водорода	$22,2 \cdot 10^3 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

Определение белка

Для определения коэффициента калибровочной кривой готовили основной раствор аммония сернокислого: 4,7 г аммония сернокислого растворяли в 1000 см³ дистиллированной воды. Из основного раствора готовили рабочий: 5 см³ основного раствора растворяли в 500 см³ дистиллированной воды. Для построения калибровочной кривой брали следующие объемы рабочего раствора: 5; 10; 15; 20; 25; 30; 35 см³, содержащих соответственно 50; 100; 150; 200; 250; 300; 350 мкг азота, переносили в мерные колбы ёмкостью 100 см³, добавляли 1 см³ раствора сегнетовой соли с массовой долей 50%, 2 см³ реактива Несслера, доводили до метки дистиллированной водой и тщательно перемешивали. Оптическую плотность полученных растворов измеряли против контроля на спектрофотометре при длине волны 400 нм в кювете с толщиной слоя 1 см против контрольного опыта. Контрольный опыт готовили аналогично, только вместо рабочего раствора брали дистиллированную воду. Для каждой концентрации рабочего раствора рассчитывали коэффициент (K_i) по формуле:

$$K_i = \frac{C_i}{D_i},$$

где:

C_i – содержание азота в i -растворе аммония сернокислого, мкг;

D_i – оптическая плотность i -раствора.

Коэффициент калибровочной кривой (K) рассчитывали по формуле:

$$K = \frac{K_1 + K_2 + \dots + K_n}{n},$$

где:

K_1 ; K_2 ; K_n – коэффициенты рабочих растворов, мкг;

n – количество рабочих растворов.

Проводили два параллельных испытания и за результат принимали среднее арифметическое. Допустимое расхождение при параллельных испытаниях не должно было превышать $\pm 0,2\%$.

Для определения содержания общего белка 0,2 г сухого мелкоразмолотого порошка мицелия помещали в колбу Къельдаля, приливали 15 см³ серной кислоты и оставляли на ночь для озоления. Затем осторожно по каплям добавляли 2 см³ раствора перекиси водорода с массовой долей 30%. Содержимое колбы осторожно перемешивали круговыми движениями и нагревали на электроплитке. Для ускорения процесса сжигания пробы периодически в колбу добавляли по 1 см³ перекиси водорода с массовой долей 30%, предварительно отключив нагрев. Общий объем добавленной перекиси водорода с массовой долей 30% не должен превышать объем концентрированной серной кислоты. Когда жидкость становилась совершенно прозрачной и бесцветной, ее нагревали еще в течение 1 часа. Затем содержимое колбы охлаждали и переносили в мерную колбу емкостью 100 см³, смывая стенки и горло колбы Къельдаля дистиллированной водой. После охлаждения раствора его объем доводили до метки дистиллированной водой (основной раствор). 2 см³ основного раствора пипеткой переносили в мерную колбу вместимостью 100 см³, куда добавляли 50 см³ дистиллированной воды. Раствор перемешивали и с помощью раствора натрия гидроксида с массовой долей 20%, доводили pH до 6,0. pH раствора контролировали с помощью универсальной индикаторной бумаги. К полученному раствору добавляли 1 см³ раствора сегнетовой соли с массовой долей 50%, 2 см³ реактива Несслера, доводили до метки дистиллированной водой и тщательно перемешивали (испытываемый раствор).

Оптическую плотность испытуемого раствора измеряли против контроля на спектрофотометре при длине волны 400 нм в кювете с толщиной слоя 1 см против контрольного опыта. Контролем служил опыт без мицелия.

Массовую долю белка (Р) в мицелии рассчитывали по формуле:

$$P = \frac{K \cdot D \cdot 6,25 \cdot 10^{-6} \cdot 100 \cdot 100 \cdot 100 \cdot 100\%}{m \cdot 2 (100-W)} = \frac{K \cdot D \cdot 6,25 \cdot 100\%}{m \cdot 2 (100-W)}$$

где:

K – коэффициент калибровочной кривой, мкг;

D – оптическая плотность испытуемого раствора;

6,25 – коэффициент пересчета на белок;

m – масса навески, г;

10^{-6} – пересчет мкг в г для K;

100 – разведения;

2 – объем основного раствора, взятого для определения белка, см³;

W – массовая доля влаги мицелия, %.

Проводили два параллельных испытания и за результат принимали среднее арифметическое. Допустимое расхождение при параллельных испытаниях не должно было превышать $\pm 0,2\%$.

Определение липидов

Липиды из влажного мицелия экстрагировали методом Фолча в модификации Блайя и Дайэра [78; 316]. Для определения содержания липидов в мицелии грибов навеску 10-20 г сырого мицелия растирали в ступке при глубоком замораживании жидким азотом. Полученную гомогенную массу исчерпывающе экстрагировали смесью хлороформ : этанол : вода - 1,0:2,0:0,8 в течение 10-12 часов, затем мицелий отфильтровывали на обеззоленном бумажном фильтре и измеряли объем

смеси. Для отделения хлороформенной фазы на каждые 9 мл экстракта добавляли по 2,5 мл хлороформа и воды, и оставляли на 4-6 ч для расслоения. Нижнюю хлороформенную фракцию, содержащую общие липиды, собирали, выпаривали на ротаторном испарителе и определяли их количественное содержание весовым методом.

Качественный и количественный состав жирных кислот изучали методом газожидкостной хроматографии на хроматографе «Хром-5» с пламенно-ионизационным детектором, используя колонку из нержавеющей стали длиной 2,8 м, заполненную хроматоном N-AW-HMDS (0,16–0,20 мм) с 15% полиэтиленгликольсукцинатом в качестве жидкой фазы, при программировании температуры колонки – 160 °С, испарителя – 210 °С. В качестве газа-носителя использовали гелий (30 мл/мин). Смесь метиловых эфиров очищали методом препаративной хроматографии на колонках с силикагелем L 40/100 (Чехия) в системе гексан : диэтиловый эфир (19:1 по объему). Идентификацию эфиров жирных кислот проводили по относительным объемам удерживания, а также в сопоставлении с показателями контрольных метиловых эфиров чистых жирных кислот [8]. Степень ненасыщенности липидов (СН) определяли по формуле [179].:

$$\text{СН} = [1 \times (\% \text{ моноены}) + 2 \times (\% \text{ диены}) + 3 \times (\% \text{ триены})] / 100, \quad (1)$$

где

% моноены – суммарное содержание жирных кислот с одной двойной связью в углеводородной цепочке;

% диены – с двумя двойными связями;

% триены – с тремя двойными связями.

Содержание фосфолипидов (ФЛ) в общих липидах определяли после их сжигания (0,25 мг) в 42% хлорной кислоте с последующим добавлением 1,25% молибдата аммония и 5% аскорбиновой кислоты. Реакция идет при кипячении в течение 5 мин. Экстинкцию окрашенных растворов измеряли спектрофотометрически на СФ-26 при длине волны 897 нм и по калибровке

определяли концентрацию неорганического фосфора (Р) в образце, массовую долю ФЛ рассчитывали по формуле [187]:

$$\text{ФЛ} = P \times K,$$

где

P - количество фосфора в мкг,

K= 22,6 - коэффициент пересчета на органическое вещество.

Определение антиокислительной активности

Антиокислительную активность (АОА) спиртовых экстрактов определяли по [71]. Об антиокислительных свойствах глубинного мицелия грибов судили по способности экстрактов тормозить образование продуктов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой (ТБК-активных продуктов). За 100% принимали величину АОА ионола - известного антиоксиданта.

Определение антимикробной активности

Антимикробную активность макромицетов изучали при использовании следующих 12 тест-культур из Всероссийской коллекции микроорганизмов (ВКМ): грамположительные бактерии (*Bacillus subtilis* ATCC 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, клинический изолят), грамотрицательные бактерии (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Comamonas terrigena* ВКПМ В-7571 (=ATCC 8461), *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, грибы (*Aspergillus niger* ИНА 00760, *Saccharomyces cerevisiae* RIA 259).

Для тест-культур использовали модифицированную среду Гаузе, (%): глюкоза – 1, пептон – 0,5, триптон – 0,3, NaCl – 0,5, агар – 2.

Среда для глубинного культивирования (%): глюкоза – 1,0, соевая мука – 2,0, солодовый экстракт «Maltax» (Финляндия) – 2,0.

Макромицеты, а также тест-культуры *L. mesenteroides* ВКПМ В-4177, *C. terrigena* ВКПМ В-7571 (=АТСС 8461), *A. niger* ИНА 00760 и *S. cerevisiae* RIA 259, инкубировали при 28°C. Остальные тест-культуры инкубировали при 37°C. Длительность культивирования тест-культур составляла 17–20 ч.

Глубинное культивирование макромицетов осуществляли в колбах Эрленмейера объемом 500 мл с объемом среды 100 мл на роторной качалке (200 об. /мин). Колбы засеивали культурой с агаровой среды. В колбу вносили инокулюм – пять сусло-агаризованных дисков диаметром 10 мм с мицелием 7-суточной культуры. Активность в культуральной жидкости определяли раз в неделю, на 7, 14, и 21 сутки роста.

Антимикробную активность в культуральной жидкости определяли методом диффузии в агар. В остуженную расплавленную модифицированную среду Гаузе вносили тест-культуры в количестве 10^7 клеток/мл. После застывания агаровой среды в лунки диаметром 9 мм вносили по 100 мкл культуральной жидкости.

Для концентрирования антимикробных веществ к культуральной жидкости добавляли этилацетат (соотношение объемов 2:1), смесь интенсивно встряхивали 10 мин и выдерживали при температуре +4°C в течение 20 ч. Затем слой этилацетата отбирали, упаривали и полученный осадок разводили в 10%-ном водном метаноле, в результате чего вещества концентрировали в 150 раз. Раствор полученного концентрата наносили на диски фильтровальной бумаги (диаметром 6 мм), диски подсушивали на воздухе и помещали на поверхность среды с тест-культурой. С учетом количества нанесенного на диск концентрата в каждой анализируемой пробе было примерно в 15 раз больше веществ по сравнению с веществами, содержащимися в 100 мкл культуральной жидкости, внесенной в лунку.

Антимикробную активность определяли по диаметрам зон задержки роста тест-культур после инкубирования. Изменение активности определяли в процентах по отношению к контролю.

2.7. Системы облучения макромицетов

В качестве источника когерентного видимого света использовали газовые лазеры: гелий-неоновый лазер ЛГН-215 с излучением на длине волны 632,8 нм (красный цвет), производства НПО "Полярон", Львов, Украина, и аргонового ионного лазера (модифицированная модель ЛГН-106М1 производства НПО "Плазма", Россия), излучение с длиной волны 514,5 нм и 488,0 нм (рис. 2.2). Модификация лазера заключалась в установке вместо одного из зеркал резонатора лазера призмы Литрова, что позволяло настраивать лазер на генерацию излучения на выбранной длине волны. Базовая модификация лазера ЛГН-106М1 предназначена для генерации излучения одновременно на нескольких длинах волн, преимущественно на 488,0 и 514,5 нм. Лазерный луч расфокусировался линзой до размера области чашки Петри или дна колбы.

Плотность мощности лазерного излучения измерялась с помощью цифрового оптического измерителя мощности и энергии PM-100D, Thorlabs Inc. со стандартным фотодиодным датчиком мощности S120C, рабочий диапазон 400-1100 нм. Энергетическая доза облучения (световая энергия, падающая на единицу площади) определялась как произведение плотности мощности и времени облучения. Благодаря довольно широкой вариации выходной мощности используемых источников света экспозиция выбиралась в соответствии с заданной дозой и варьировала от 1 до 30 мин, в зависимости от схемы опыта.

В качестве источников некогерентного света использовали светодиоды (LED). Была разработана схема формирования светового потока с заданными параметрами с помощью высокоинтенсивных светодиодов. Установка

включала светоизлучающую панель с матрицами светодиодов, системой охлаждения и светоотражающими поверхностями, блоки питания светодиодов и блоки управления (рис. 2.3).

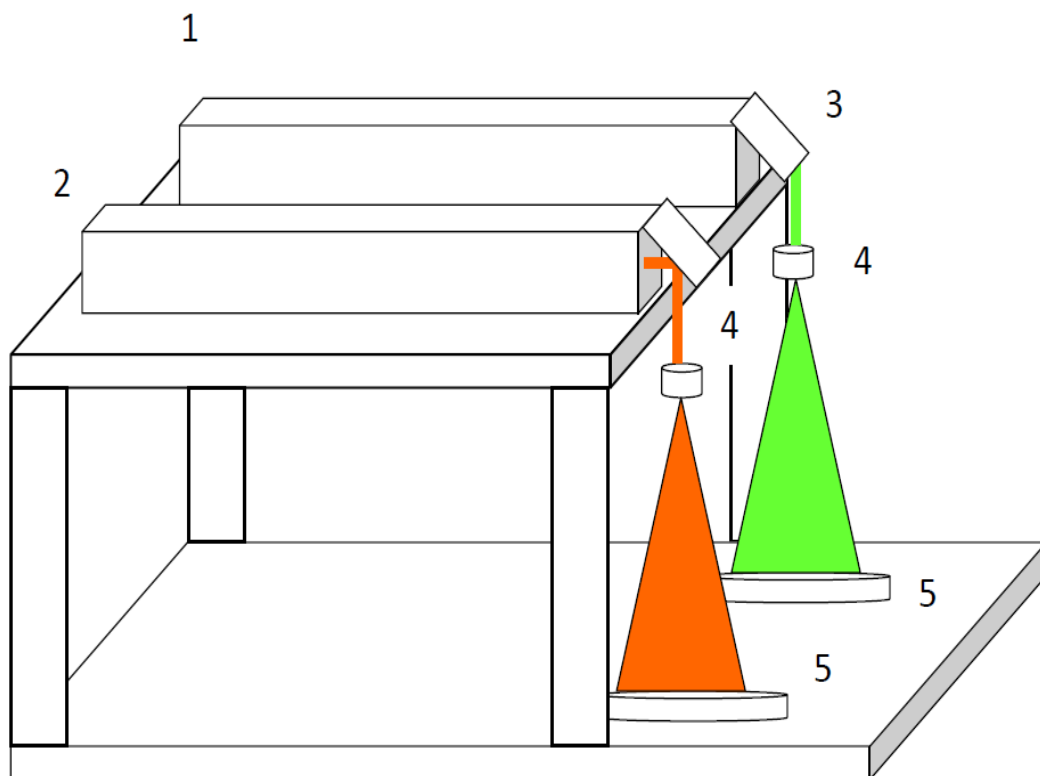


Рис. 2.2. Схема лазерного облучения макромикроводов в чашках Петри

Примечание: 1- Аргоновый ионный лазер ЛГН-106М1, 2- гелий-неоновый лазер ЛГН-215, 3 – поворотные зеркала, 4 – линзы-объективы, 5 – чашки Петри

Матрица фотодиодов формировалась с 21 мощного светодиода на основе AlGaInN, светодиода типа YSH-FRGBB-IA производства компании China Young Sun Led Technology Ltd. Каждый диодный блок содержал три светоизлучающих микрочипа, которые излучают свет с длинами волн (синий), 522 нм (зеленый) и 625 нм (красный). Электрическая мощность каждого микрочипа составляла 1 Вт, интенсивность излучения регулировалась от нуля до максимального значения независимо для каждого

спектрального диапазона, то есть отдельно для синего, зеленого и красного света регулировкой силы тока через диоды.



Рис. 2.3. Схема светодиодной осветительной установки для облучения макромикетов светом контролируемого спектрального состава

Примечание: 1 – панель со светодиодами (21 мощный светодиод на AlGaInN типа YSH-FRGBB-IA производства компании China Young Sun Led Technology Ltd); 2 – светодиоды с независимой регулировкой мощности излучения в трех спектральных каналах (красный, зеленый, синий), размещенные на панели; 3 – рабочая поверхность для размещения облучаемых объектов; 4 – блок питания светодиодов с независимой регулировкой мощности в отдельных спектральных диапазонах

Матрица фотодиодов формировалась с 21 мощного светодиода на основе AlGaInN, светодиода типа YSH-FRGBB-IA производства компании China Young Sun Led Technology Ltd. Каждый диодный блок содержал три светоизлучающих микрочипа, которые излучают свет с длинами волн (синий), 522 нм (зеленый) и 625 нм (красный). Электрическая мощность каждого микрочипа составляла 1 Вт, интенсивность излучения регулировалась от нуля до максимального значения независимо для каждого спектрального диапазона, то есть отдельно для синего, зеленого и красного света регулировкой силы тока через диоды.

2.8. Облучение макромицетов

Во всех вариантах опытов были выбраны условия равных энергетических доз световых воздействий на споры и мицелий, так что для всех видов источников света плотность энергии на поверхности образца была одинаковой. При выборе одинаковых энергетических условий облучения образцов светом мы исходили из того, что при отсутствии установленных и общепринятых механизмов действия низкоинтенсивного излучения на мицелий грибов представлялось обоснованным сосредоточиться на определении качественных различий воздействия на них равных доз энергии излучения различного спектрального состава и временных характеристик. Облучение проводили в непрерывном режиме и прерывистом с продолжительностью импульса 1 мс и периодом повторения 2 мс. В таблице 2.3 приведена характеристика используемого в исследованиях света.

В лазерных биотехнологиях используют световые потоки низкой интенсивности не более 100 мВт/см². Данное воздействие называют низкоинтенсивным (НИЛИ), в англоязычной литературе при использовании такого рода излучений в медицине – LLLT (Low Level Laser Therapy), как было предложено Т. Ohshiro и G. Calderhead в 1988 году [493].

Таблица 2.4.

**Характеристика света, используемого в исследованиях
фоточувствительности макромицетов**

	Источники света											
	когерентного									некогерентного		
	Аргоновый ионный лазер ЛГН-106М1, производства НПО "Плазма", Россия						Гелий- неоновый лазер ЛГН- 215, производства НПО "Полярон", Львов			Светодиоды типа YSH- FRGBB-1A производства компании China Young Sun Led Technology Ltd		
Длины волн	488 нм синий			514,5 нм зеленый			632,8 нм красный			463 нм синий	522 нм зеленый	625 нм красный
Энергия оптического излучения, мДж/см ²	45	230	650	45	230	650	45	230	650	230	230	230

Степень проявления того или иного эффекта зависит от длины волны излучения, плотности мощности и дозы воздействия. Экспериментальные и клинические исследования позволили определить пределы возможных изменений параметров воздействия для обеспечения биостимулирующего эффекта:

- по плотности мощности – 0,1– 100 мВт/см²;
- по плотности энергии – до 10 Дж/см²;

– длина волны излучения – 337 – 1260 нм

Исследования, проведенные на клетках других биологических объектов, показали, что их фоточувствительность к низкоинтенсивному свету имеет универсальный характер, предполагающий существование одного и того же молекулярного механизма [77]. Полученные экспериментальные данные свидетельствуют, что кратковременное (от долей секунды до десятков минут) низкоинтенсивное когерентное (лазерное) излучение в относительно малых дозах ($10^2 - 10^3$ Дж/м²) способствует макроэффекту, который долго сохраняется. Это объясняется нелинейностью дозовых эффектов воздействий на живые организмы, выражающаяся в виде непропорционально сильных биологических эффектов от воздействия небольших доз, что связано с повышенной чувствительностью организмов к слабым (информационным) воздействиям. В наших экспериментах энергия оптического излучения составляла 45, 230 и 650 мДж/см². Эти значения были выбраны на основании анализа результатов, полученных нами и другими исследователями [112, 114; 146; 389; 390; 392; 511; 512; 515; 516]. Известно, что фоторецепторная система грибов адаптирована к видимому свету в диапазоне длин волн от 350 до 730 нм [77; 260; 594; 607] и этот спектральный ряд хорошо представляют выбранные нами длины волн (синяя, зеленая и красная области).

Световую обработку сухих спор в виде споровых отпечатков проводили непосредственно в чашках Петри. При изучении линейной скорости роста и накопления биомассы так облучали 7-10 суточный вегетативный мицелий, выросший на поверхности агаризованной среды. Мицелий, выращенный на жидкой питательной среде, облучали в колбах, толщина слоя среды с глубинным мицелием - 1 см. Зерновой мицелий перед облучением распределяли тонким слоем (толщина слоя ~1 см) на ровной поверхности.

Стоит отметить, что в этих условиях при используемых уровнях плотности энергии тепловыми эффектами вследствие воздействия лазерного света можно полностью пренебречь.

2.9. Определение эффективности световых воздействий

Изменения накопления биомассы, полисахаридов, меланина и др. биологически активных веществ макромицетами после облучения определяли как % изменения по сравнению с контролем (контроль принимали за 100%).

2.10. Статистическая обработка результатов

Обработку полученных результатов проводили с использованием программы Excel 2007. Все эксперименты проводили в 4-5 повторностях. При определении скорости роста моноспоровых изолятов – в 50.

Статистическую обработку результатов про с использованием программы Statistica 6.0. Результаты исследований в соответствии с t – критерием Стьюдента являлись статистически достоверными при уровне значимости $p \leq 0,05$.

РАЗДЕЛ 3

РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ ПОДГОТОВКИ И ФОТОАКТИВАЦИИ ПОСЕВНОГО МАТЕРИАЛА

Одним из важных моментов, которые определяют экономическую эффективность биотехнологического процесса, является высокая жизнестойкость и биологическая активность посевного материала, обеспечивающие быстрое разрастание гиф в субстрате. Известны разные приемы стимулирования роста посевного мицелия грибов, основанные на замене традиционной питательной среды на йодику [2], гомогенную массу личинок синантропных мух [1] и др. Однако, предлагаемые среды труднодоступны и их реализация в промышленных объемах маловероятна. Имеются способы стимуляции роста мицелия за счет внесения в среду различных стимулирующих добавок: соевой муки [3], кальцийсодержащих материалов [33], селената натрия [102], иммуноцитифита [103]. Блинохватов А.Ф. с соавторами предлагают использовать в качестве стимулятора роста посевного мицелия культивируемых съедобных грибов диацетофенонилселенид (ДАФС-25), растворенный в диметилсульфоксиде в концентрации 10^{-3} - 10^{-4} г/л из расчета 10 мл раствора на 1 кг питательного субстрата [104]. Для активизации посевного мицелия шампиньона двуспорового используют растительные масла (абрикосовое и сливовое косточковое масло) [498]. При приготовлении посевного мицелия съедобных грибов путем глубинного культивирования в качестве стимулятора роста используют также суспензию бактерий *Azospirillum* [101]. Нами впервые была изучена возможность и разработаны методы активизации посевного материала культивируемых съедобных и лекарственных макромицетов путем кратковременного облучения низкоинтенсивным светом [47-51; 106; 107; 109; 124; 134; 136; 139; 140; 141; 512; 519; 523; 525].

3.1. Изучение фоточувствительности спор, закономерностей стимуляции их прорастания и роста моноспоровых изолятов

Одним из наиболее актуальных направлений современной биотехнологии и микологии является воспроизводство в культуре различных видов макромицетов, сохранение их в коллекциях и селекция высокопродуктивных штаммов с заданными характеристиками с помощью генетических методов.

Известно, что биологическая активность спор некоторых базидиальных макромицетов может быть выше, чем у тканей плодового тела. Такая закономерность установлена для *G. lucidum* [465]. Недавние исследования этого гриба показали, что споры обладают значительной противоопухолевой активностью [669] и активностью протеаз против человеческого вируса иммунодефицита [465]. Эти эффекты тесно связаны со статусом спородерма. Нарушение спородерма в процессе прорастания спор может повышать их биологическую активность, а в случаях, когда спородерма не нарушена эффекта не наблюдается [669]. Прорастающие споры (SBGS) используются в качестве биодобавок для эффективной профилактики и лечения иммунологических нарушений, гипертонии, гиперхолестеринемии, сахарного диабета, невралгии, гепатопатии, язвенной болезни желудка, онкогенных заболеваний и т.д. в Китае [361; 430].

Поэтому многие исследователи уделяют внимание получению культур из спор [47; 111; 113; 116; 120; 134; 140; 167; 168; 197; 231; 286; 312; 313; 314; 324; 325; 378; 400; 407; 440; 506; 523; 651; 654]. Однако получение споровых культур сопряжено с проблемой проращивания спор в лабораторных условиях [24; 59; 105; 181; 405]. Вопрос активации их прорастания остается актуальным и сегодня.

В соответствии со своими биологическими функциями базидиоспоры обладают определенными морфологическими, физиологическими, биохимическими и генетическими особенностями: структура клеточных

оболочек, гетероталлизм клеточных ядер, запасные питательные вещества, обезвоживание, минимальный уровень метаболизма, состояние покоя. Именно это состояние должно быть преодолено и осуществлен переход клетки в стадию активного метаболизма. Это означает, что должна произойти активизация окислительных процессов, аэробного дыхания, синтеза белка и, наконец, образование и рост новой морфологической структуры. Эти стадии процесса прорастания спор показаны на примерах некоторых грибов [274].

Описаны способы активации прорастания базидиоспор высших базидиомицетов в период покоя тепловой обработкой, добавками в среду активированного угля и/или дрожжей, аминокислот, органических кислот, моно- или дисахаров, спиртов, флавоноидов, перекиси водорода [384;395]. Однако эти методы не всегда эффективны и часто не приносят желаемого результата.

В разделе 1 (обзор литературы) на многочисленных примерах продемонстрировано, что свет служит важным морфогенетическим фактором, регулирующим рост и развитие грибов [40; 81; 82; 83; 84; 149; 260; 276; 277; 312; 313; 327; 332; 333; 354; 417; 444; 445; 532; 533; 541; 594; 598; 644]. Кроме того, значительный фактический материал, накопленный к настоящему времени, свидетельствует о том, что, в большинстве своем фотофизиологические явления у грибов сопряжены с регуляцией процессов роста и индивидуального развития. Особенно многообразно регулирующее действие света в ходе онтогенеза грибов проявляется при переходе организма к новому очередному этапу индивидуального развития, в том числе к прорастанию спор [235; 260; 472; 473; 475; 594] и формированию спороносящих структур. Характер ответа на световой сигнал зависит от его продолжительности, интенсивности и спектральных свойств, особенностей организма и может быть, как позитивным, так и негативным.

На основании этого было сделано предположение, что свет можно использовать как экологически чистый стимулятор биологической активности спор.

Мы исследовали фоточувствительность базидиоспор разных видов макромицетов, культивируемых в промышленных масштабах, т.е. представляющих практический интерес, к искусственному свету различного происхождения и закономерности стимуляции их прорастания и роста монокариотических изолятов.

При изучении способности к прорастанию спор у разных видов грибов установлено, что она может являться штаммоспецифическим признаком и зависит как от географического происхождения штамма, так и от длительности и условий хранения спор [223]. Так у разных штаммов *H. erinaceus* степень прорастания спор очень низкая и колеблется от 10^{-6} до 13,6% [134; 135; 512].

В литературе полностью отсутствуют данные о влиянии лазерного (когерентного) света и его специфичности на развитие, активность и метаболизм грибов. Нами впервые изучена возможность использования лазерного излучения в видимом диапазоне длин волн для активации прорастания базидиоспор [47; 134; 135; 512].

Анализ полученных нами результатов исследований (табл.3.1) позволил определить, что кратковременное низкоинтенсивное облучение лазерным (когерентным) светом длиной волн 488,0 нм и 632,8 нм в дозах от 45 до 230 мДж/см² обладает стимулирующим эффектом и позволяет значительно увеличить количество проросших спор у изученных видов макромицетов. Оптимальная доза облучения в опыте - до 230 мДж/см². Доза 650 мДж/см² подавляла прорастание спор всех изученных видов. Последнее скорее всего связано с увеличением теплового эффекта при данном режиме облучения, который негативно влияет на метаболизм спор.

Таблица 3.1

Фоточувствительность базидиоспор разных видов и штаммов макромизетов

Штамм	Прорастание базидиоспор, % от общего числа базидиоспор									Контроль без облучения, %
	632,8 нм			514,5 нм			488,0 нм			
	45 мДж/см ²	230 мДж/см ²	650 мДж/см ²	45 мДж/см ²	230 мДж/см ²	650 мДж/см ²	45 мДж/см ²	230 мДж/см ²	650 мДж/см ²	
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
A. bisporus										
5422	7,9±0,4*	15,9±0,7*	0	0,8±0,2	0,7±0,1	0	1,2±0,3	4,9±1,3*	0	0,8±0,1
5418	6,8±1,1*	10,8±1,8*	0	2,3±0,3	2,3±0,3	0	3,6±0,5	7,5±0,3*	0	3,3±0,5
5437	4,9±0,6*	13,9±2,2*	0	1,0±0,2	1,0±0,2	0	2,0±0,4	6,1±0,8*	0	1,2±0,2
F. velutipes										
1668	66,6±2,0*	78,9±5,4*	2,7±0,1*	5,6±1,1	3,6±1,1	0	28,8±1,4*	64,6±4,3*	0	7,2±1,3
2038	54,5±1,9*	84,3±3,6*	0,9±0,1*	2,4±0,4*	1,2±0,2*	0	36,5±0,8*	82,7±5,4*	0	5,4±0,9

[illegible]

Продолжение таблицы 3.1										
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1756	$1,0 \cdot 10^{-3*}$	$0,8 \cdot 10^{-2*}$	0	$0,4 \cdot 10^{-6*}$	$0,4 \cdot 10^{-6*}$	0	$2,4 \cdot 10^{-3*}$	$1,2 \cdot 10^{-2*}$	0	$0,6 \cdot 10^{-4}$
963	$82,0 \pm 4,3^*$	$98,1 \pm 0,9^*$	0	$12,9 \pm 0,4$	$9,2 \pm 0,5^*$	0	$76,3 \pm 3,3^*$	$90,5 \pm 2,5^*$	0	$13,6 \pm 0,6$
<i>L. edodes</i>										
520	$45,5 \pm 1,0^*$	$90,3 \pm 5,8^*$	0	$24,8 \pm 4,7$	$10,6 \pm 2,9^*$	0	$67,4 \pm 5,7^*$	$76,8 \pm 3,1^*$	$6,8 \pm 0,5^*$	$26,6 \pm 2,1$
353	$77,9 \pm 2,1^*$	$85,2 \pm 2,1^*$	$2,5 \pm 0,7^*$	$38,3 \pm 2,1^*$	$19,6 \pm 2,5^*$	$2,7 \pm 0,7^*$	$80,3 \pm 2,4^*$	$88,9 \pm 2,8^*$	$12,6 \pm 1,6^*$	$59,9 \pm 3,5$
1992	$80,7 \pm 3,4^*$	$97,3 \pm 4,4^*$	$0,9 \pm 0,2^*$	$55,5 \pm 4,7^*$	$24,7 \pm 3,9^*$	$0,3 \pm 0,1^*$	$88,3 \pm 1,7^*$	$96,7 \pm 6,9^*$	$5,0 \pm 0,3^*$	$64,7 \pm 0,9$
<i>P. ostreatus</i>										
527	$16,8 \pm 1,1^*$	$92,4 \pm 3,6^*$	$0,9 \pm 0,2^*$	$12,9 \pm 1,9$	$14,5 \pm 1,6$	0	$18,3 \pm 1,9^*$	$35,6 \pm 3,8^*$	0	$13,3 \pm 0,9$
531	$17,6 \pm 0,9^*$	$93,9 \pm 4,0^*$	$0,3 \pm 0,1^*$	$10,8 \pm 0,9$	$11,7 \pm 2,3$	0	$19,7 \pm 1,7^*$	$26,9 \pm 4,5^*$	0	$9,8 \pm 0,7$
553	$22,7 \pm 2,8^*$	$90,2 \pm 2,9^*$	0	$15,0 \pm 2,3$	$17,1 \pm 3,3$	0	$20,5 \pm 2,3^*$	$31,2 \pm 4,9^*$	0	$16,5 \pm 2,3$

Примечание: * - обозначено статистически достоверные различия по отношению к контролю, ($p \leq 0,05$)

результаты представлены как $M \pm n$ $n=5$

Известно, что во время возбуждения низкоинтенсивным лазерным светом электронных состояний в клетке заметная часть энергии возбуждения неизбежно превращается в тепло, что вызывает локальное и преходящее увеличение температуры поглощающих хромофоров [87]. Однако, любое значительное распределенное во времени и пространстве нагревание может быть предотвращено с помощью соответствующего контроля интенсивности, дозы и облучения. Локальное кратковременное повышение температуры поглощающих биомолекул может вызывать структурные (например, конформационные) изменения и приводить в действие биохимические процессы (вторичные темновые реакции), такие, как ингибирование ферментов. Эксперименты с клетками *Escherichia coli* [389] показали, что под воздействием ультракоротких (фемтосекундных) импульсов такой нагрев действительно может влиять на биологическую реакцию клеток. Небольшой локальный нагрев и значительный градиент температуры вызываются как непрерывным излучением, так и фемтосекундными импульсами. Различие состоит в том, что плотность локальных нагреваемых зон в случае непрерывного облучения по сравнению с ультракороткими импульсами чрезвычайно мала вследствие низкой интенсивности излучения.

Впервые установлены различия в фоточувствительности базидиоспор не только разных видов, но и штаммов одного и того же вида. По-видимому, индивидуальная реакция штаммов на световые воздействия связана с их географическим происхождением и эпигенетическими особенностями, которые были сформированы под действием различных экологических факторов. Так, облучение спор *H. erinaceus* красным светом (632.8 нм) увеличивает их прорастание у штамма 963 приблизительно в 10 раз, у штамма 1756 – в 100, у 968 – в 10^5 раз. Облучение светом с длиной волны 514 нм, в тех же дозах, было либо нейтральным (*P. ostreatus*, *G. aplanatum*, *A. bisporus*), либо угнетающим (*H. erinaceus*, *L. edodes*, *G. lucidum*, *F. velutipes*) (табл.3.1). Это не согласуется с данными, полученными McCracken [461]. Он сообщал о значительном угнетении прорастания спор *Pleurotus sapidus*

дневным и зеленым светом, а синий, желтый и красный считал неэффективными. Это несоответствие можно объяснить специфичностью воздействия использованного в наших исследованиях монохроматического света на биологические объекты и видовыми и штаммовыми различиями.

Вопрос о специфичности действия лазерного излучения низкой интенсивности на биологические объекты остается одним из дискуссионных. Одна группа исследователей считает, что когерентность лазерного излучения не является определяющей при воздействии света на живой организм [93], другие обосновали биологическую активность когерентного лазерного излучения как процесс связанный с механизмом пространственной неоднородности лазерного поля [87]. Такая ситуация делает необходимым проведение исследования специфических механизмов действия когерентного света на биологические объекты.

Сравнительное изучение влияния света, полученного из разных источников, показало, что базидиоспоры большинства изученных видов более чувствительны к когерентному (лазерному) свету, чем к некогерентному (светодиоды) (табл. 3.2). Особенно ярко эти различия выражены у *F. velutipes*, *G. aplanatum*, *G. lucidum* и *H. erinaceus*. Такой эффект, возможно, связан с более глубоким проникновением лазерного света в клеточные структуры. В настоящее время возможные механизмы такой биостимуляции когерентным светом являются предметом активных дискуссий [77; 87; 93; 357; 391; 392; 552; 653]. Эксперименты с различными биологическими объектами показали существенно более высокую биологическую активность когерентного света, возможно через механизм, связанный с пространственной неоднородностью лазерного поля. Можно допустить, что эффективность когерентного света связана с влиянием пространственно неоднородного распределения интенсивности рассеянного когерентного света, т.е. с так называемыми спеклами.

Таблица 3.2

**Влияние когерентности на прорастание базидиоспор разных видов
макромицетов**

Вид	Прорастание базидиоспор, %				
	Некогерентный свет		Когерентный свет		Контроль без облучения, %
	625,0 нм	463,0 нм	632,8 нм	488,0 нм	
<i>A. bisporus</i> 5422	10,6±1,3*	1,2±0,1*	15,9±0,7*	4,9±1,3*	0,8±0,1
<i>F. velutipes</i> 3923	22,7±1,6*	25,5±2,3*	70,8±4,0*	72,8±3,3*	3,9±0,5
<i>G.</i> <i>applanatum</i> 1899	36,6±2,0*	2,4±0,3	55,5 ±1,8*	3,3±0,1	2,9±0,7
<i>G. lucidum</i> 1908	60,7±2,7*	65,8±3,2*	81,7±4,1*	77,3±5,9*	2,6±0,3
<i>H.</i> <i>erinaceus</i> 963	53,6±3,9*	56,6±2,4*	98,1±0,9*	90,5±2,5*	13,6±0,6
<i>L. edodes</i> 353	88,7±4,8*	81,9±5,3*	90,3 ±5,8*	76,8 ±3.1*	26,6 ±2.1
<i>P. ostreatus</i> 531	92,7±3,8*	13,6±2,2*	93,9±4,0*	26,9±4,5*	9,8±0,7

Примечание: * - обозначено статистически достоверные различия по отношению к контролю, ($p \leq 0,05$) результаты представлены как $M \pm n$ $n=5$

Для когерентного света парциальные световые поля, образованные рассеянием в глубине биологической ткани остаются когерентными, но имеют случайное распределение разности фаз. Эти поля интерферируют и образуют интерференционную картину с сильными локальными

неоднородностями интенсивности света: на пространственном масштабе, равном примерно длине волны излучения лазера, интенсивность изменяется от нуля до уровня, превышающего среднее значение. Высокие градиенты светового поля и неоднородное поступление энергии лазерного света может привести к модификации фотобиологических процессов, локальным увеличениям температуры, эффектам светового давления на отдельные клетки или фрагменты клеток подобно механизму «оптического пинцета» и т.п.

Однако количество проросших спор исследованных штаммов *L. edodes* после облучения когерентным и некогерентным светом в синей части спектра достоверно не различалось, а у *P. ostreatus* прорастание спор после облучения синим когерентным светом было в 2 раза выше чем некогерентным с той же длиной волны, тогда как в красной части спектра фотоответы были практически одинаковыми. Полученные результаты требуют дальнейших исследований механизмов фоторецепции грибами для того, чтобы понять причины таких неоднозначных ответов на определенные световые воздействия.

В литературе можно найти описание эффектов, существенных и менее значимых, низкоинтенсивного кратковременного облучения, а также документировано полное их отсутствие на одной и той же модели исследования, при использовании одного и того же источника облучения [77; 87]. Сущность предполагаемого объяснения такого разнообразия исследователи объясняют тем, что величина конечного эффекта зависит от изначального физиологического состояния облучаемого объекта, которое определяется его редокс-потенциалом (смещение в сторону более окисленного состояния связано со стимуляцией жизнедеятельности клетки; в сторону более восстановленного состояния – с её подавлением). Вследствие светового воздействия происходит нормализация редокс-потенциала клетки [77]. Данная схема была предложена на основе экспериментов по модификации и модуляции световых эффектов, в которых редокс-потенциал

клетки до облучения изменяли с помощью химических соединений или концентрации кислорода [387]. В настоящее время хорошо известно, что даже клеточные популяции не являются гомогенными по параметрам клеточного гомеостаза [659]. Эффект облучения является тем более выраженным, чем больше редокс-потенциал клетки отодвинут в восстановленную сторону. Предполагаемый механизм клеточного метаболизма через дыхательную цепь также объясняет универсальность наблюдаемых эффектов лазерной стимуляции (от бактерий до человека).

При этом стимулирующий эффект облучения, как правило, более выражен, чем ниже начальный процент прорастания спор. Такую зависимость наблюдали и другие исследователи при стимуляции роста микроорганизмов путем лазерного облучения [386, 391]. Была выявлена сезонность ростостимулирующих эффектов. То есть, фоторегуляция в позитивном смысле слова (стимуляция) может проходить только тогда, когда пролиферативная активность клеток (скорость роста культуры) не является максимальной. Летом, когда рост культуры ускорялся, эффект фотостимуляции роста практически не наблюдался, зимой он был максимальным, а весной и осенью – промежуточным.

При изучении влияния лазерного света на разные биологические объекты некоторыми исследователями установлена более высокая чувствительность клеток к импульсному излучению [145]. Сегодня экспериментально показано, что лазерные импульсы фемтосекундной длительности могут применяться для управления фотохимическими процессами в биологических молекулах [527 229]. Зависимость биологического действия от длительности светового импульса экспериментально показана на клетках живых организмов [76].

Сравнительное изучение эффективности облучения в непрерывном и импульсном режиме (632,8 нм) на прорастание спор (рис. 3.1) показало, что импульсный свет оказывает достоверно большее стимулирующее влияние на прорастание базидиоспор *F. velutipes* и *G. applanatum*, чем непрерывный при

той же дозе и длине волны. Споры *H. erinaceus*, *G. lucidum*, *L. edodes* и *P. ostreatus* практически одинаково реагируют на оба режима облучения. В настоящее время нет единого мнения о возможных преимуществах импульсного или прерывистого света и его параметрах, способствующих биостимуляции [348].

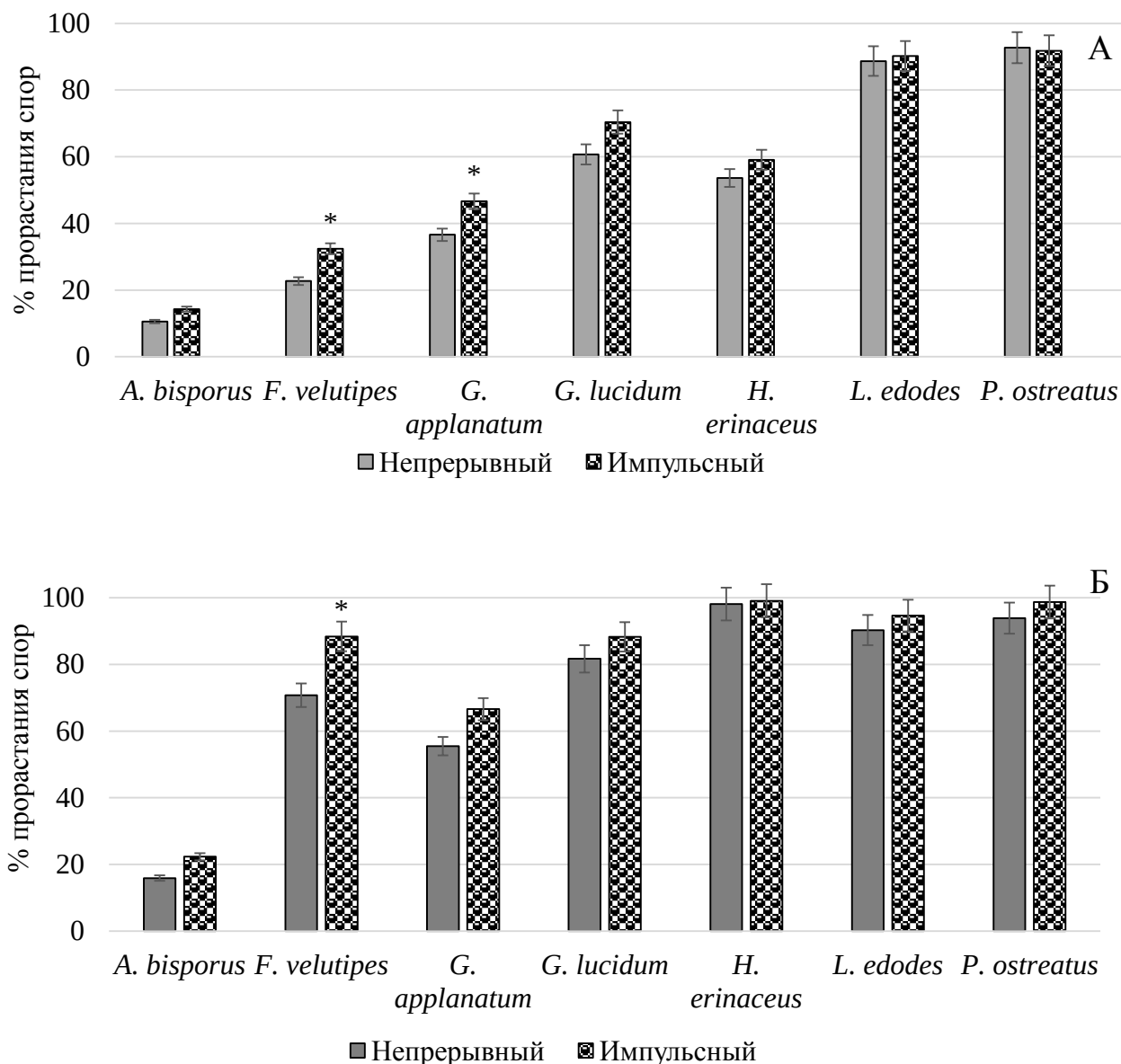


Рис. 3.1. Влияние природы света на прорастание спор макромицетов

Примечание: А – некогерентный свет, Б – когерентный свет; * - обозначено статистически достоверные различия по отношению к облучению непрерывным светом, ($p \leq 0,05$) результаты представлены как $M \pm n$ $n=4-5$

Для видов грибов, споры которых прорастают длительное время, кроме увеличения процента прорастания мы выявили, сокращение времени их прорастания и формирования воздушного мицелия на агаризованной среде после световых воздействий по сравнению с начальными показателями у исследованных штаммов (табл. 3.3).

Таблица 3.3

Длительность прорастания базидиоспор и формирования воздушного мицелия

Вид, штамм	Прорастание спор, длительность,сутки (% от общего количества спор)		Формирование воздушного мицелия, сутки	
	Контроль	Облучение (632.8 нм, 230 мДж/см ²)	Контроль	Облучение (632.8 нм, 230 мДж/см ²)
<i>A. bisporus</i> , 5422	6 (0,8%)	4 (15,9%)	9	7
<i>H. erinaceus</i> , 963	9 (<0,1%)	5 (11,4%)	10	7
<i>L. edodes</i> , 353	8 (26,6%)	6 (90,3%)	11	8

Кроме того, облучение спор искусственным светом разной когерентности в красном и синем диапазонах длин волн активизирует рост моноспоровых изолятов (по 50 повторностей в каждом варианте опыта) всех изученных видов макромицетов (рис.3.2).

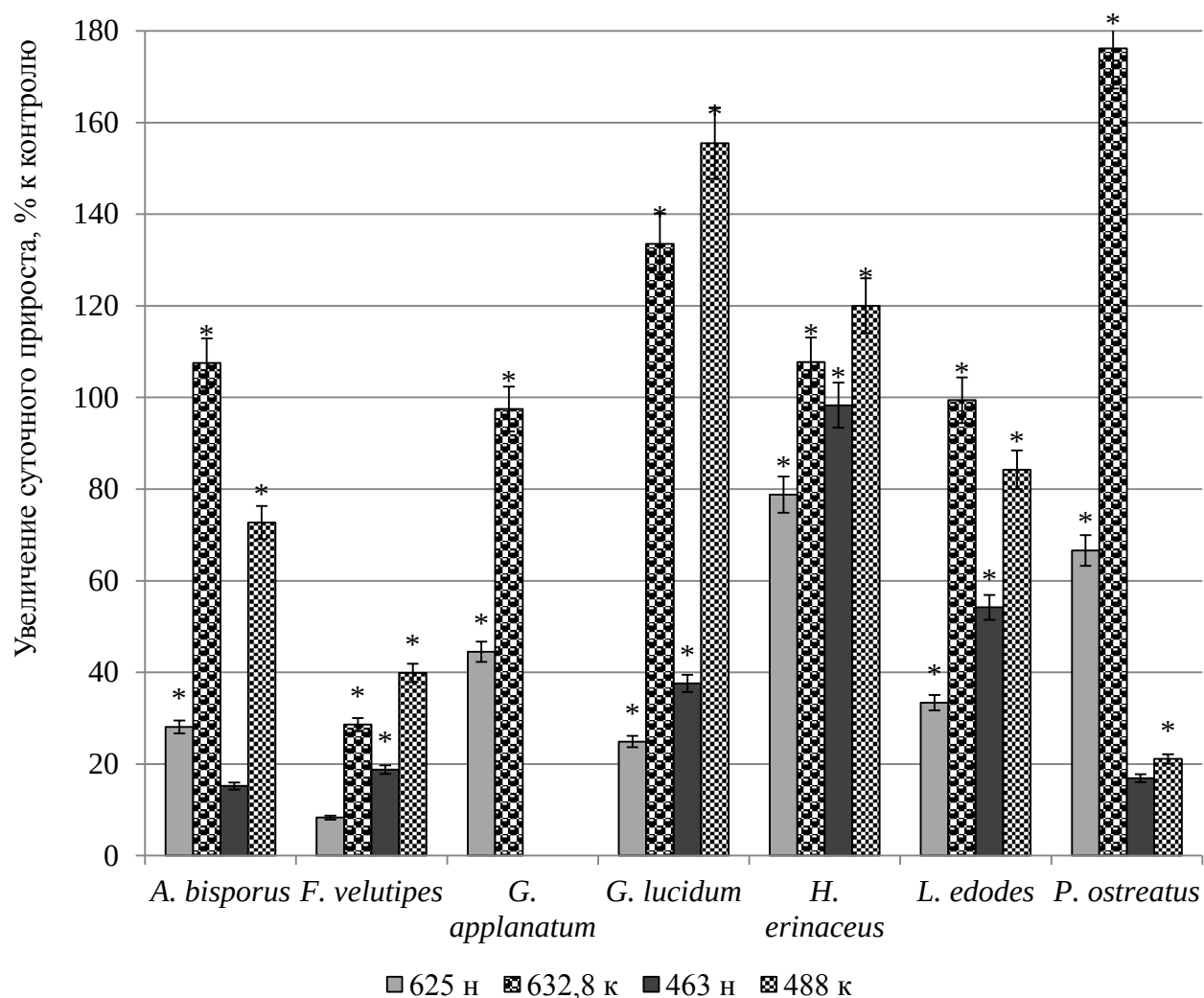


Рис. 3.2. Влияние облучения на рост моноспоровых изолятов макромицетов

Примечание: * - обозначено статистически достоверные различия по отношению к контролю, ($p \leq 0,05$) результаты представлены как $M \pm n$ $n=50$; н – некогерентный свет, к- когерентный

На данном этапе наших исследований мы находим подтверждение отмеченным нами выше тенденциям специфичности и большей эффективности когерентного света (632,8 нм и 488,0 нм) по сравнению с неполяризованным (625,0 нм и 463,0 нм) в разной степени для всех штаммов. Анализ способности базидиоспор, облученных лазерным светом и LED, к формированию моноспоровых изолятов позволяет утверждать, что фотоиндуцированная когерентным светом активность не только передается

на следующую стадию, от споры к формированию ростковой гифы. Кроме того наблюдается увеличение стимулирующего эффекта, которое выражается в увеличении скорости роста мицелия моноспорового изолята по сравнению с контролем. Так, например, проценты прорастания базидиоспор исследованных штаммов *L. edodes* после облучения когерентным и некогерентным светом в синей части спектра, а *P. ostreatus* в красной части достоверно не различались. Однако, скорость роста моноспоровых изолятов, полученных из спор, облученных лазерным светом в этих диапазонах длин волн, почти в три раза выше, чем после облучения светодиодами. Это свидетельствует о том, что специфика лазерной фотоиндукции, приводящая к дополнительной стимуляции различных процессов в клетке, может проявляться и после прорастания споры.

Полученные нами данные полностью согласуются с теорией об универсальности механизмов фотоиндукции [77], согласно которой первичные химические реакции сопровождаются появлением свободных радикалов, в небольшом количестве, которые в свою очередь запускают процессы окисления биосубстратов, имеющих цепной характер. Этот момент позволяет понять переключающий (триггерный) механизм многократного усиления первичного эффекта НИЛИ. Таким образом, в основе механизма воздействия на клетки, маломощных лазеров в видимой области лежат процессы, происходящие на клеточном и молекулярном уровнях. Низкоинтенсивное лазерное излучение стимулирует метаболическую активность клетки. Стимуляция биосинтетических процессов может быть одним из важных моментов, определяющих действие низкоинтенсивного излучения лазера на важнейшие функции клеток и тканей, процессы жизнедеятельности и регенерации (восстановления). НИЛИ приводит к увеличению содержания в ядрах клеток человека ДНК и РНК, что свидетельствует об интенсификации процессов транскрипции (делений). Это первый этап процесса биосинтеза белков.

Такие реакции связывают с изменениями в параметрах клеточного гомеостаза. Они вписываются в теорию об универсальных механизмах фотостимуляции, которая нашла экспериментальное подтверждение на других биологических объектах [77]. Согласно этой теории основные физические и/или химические изменения, вызванные светом в фотоакцепторных молекулах (например, в терминальных ферментах дыхательных цепей), сопровождается каскадом биохимических реакций в клетках, которые не требуют дальнейшей активизации светом (цепи передачи и усиления фотосигнала или клеточная сигнализация).

Таким образом, в наших исследованиях впервые было изучено влияние света разной длины волны и когерентности в непрерывном и импульсном режимах на прорастание базидиоспор *A. bisporus*, *F. velutipes*, *G. applanatum*, *G. lucidum*, *H. erinaceus*, *L. edodes* и *P. ostreatus*. Оптимальной стимулирующей дозой была 230 мДж/см². Для стимуляции прорастания спор и роста моноспоровых изолятов *A. bisporus*, *G. applanatum* и *P. ostreatus* оптимальным является кратковременное облучение, как когерентным, так и некогерентным красным светом. Для *F. velutipes*, *G. lucidum* и *H. Erinaceus* эффективен красный и синий когерентный свет, а для *L. edodes* – эффективен красный и синий лазерный и LED свет. Сравнительное изучение влияния света разной длины волны и когерентности на активность базидиоспор и последующий рост моноспоровых изолятов макромицетов является одним из важных этапов на пути понимания широко дискутируемых теорий о преимуществах когерентного лазерного света. Это поставило перед нами задачи изучения трансформации и динамики фотоиндуцированной активности от спор к дикариотическому мицелию, в процессе его роста, при пересевах и переходе на другие стадии онтогенеза. Кроме того, большой практический интерес для разработки методов интенсификации

технологических этапов культивирования представляли исследования, направленные на определение длительности сохранения индуцированной активности при хранении. Внутривидовая чувствительность разных штаммов значительно варьирует и это следует учитывать при разработке и использовании методов фотоактивации спор других практически важных видов макромицетов.

3.2. Изучение закономерностей стимуляции вегетативного мицелия макромицетов на разных стадиях морфогенеза и трансформации фотоиндуцированных изменений

Влияние света на развитие грибов определяется не только видовой, но и штаммовой принадлежностью [40; 137; 523]. Кроме того, некоторые грибы меняют свою реакцию на свет в процессе онтогенеза. Так, например, у *Coprinus congregatus* установлено 4 фазы развития: 2 фазы фотостимулированные, фотоингибированная и фотоиндифферентная [40]. В литературе практически отсутствуют данные о фоточувствительности изучаемых нами видов и штаммов макромицетов к искусственному свету.

Между тем, определение оптимальных параметров активизации посевного материала диктует необходимость четкого определения фазы онтогенеза грибного организма, на которой световое воздействие вызовет максимальную стимуляцию его биологической активности.

Кроме того, согласно теории, в основу которой легли анализы результатов исследований других биологических объектов, основные физические и/или химические изменения, вызванные светом в фотоакцепторных молекулах, сопровождается каскадом биохимических реакций в клетках, которые не требуют дальнейшей активизации светом.

Однако, в литературе нет никаких упоминаний о трансформации таких изменений в процессе морфогенеза грибов.

Поэтому была выдвинута гипотеза, что фотоиндуцированные изменения биологической активности различных организмов и пролонгированность этих изменений не являются уникальными и присущи многим представителям микобиоты. Для проверки этой гипотезы и с целью определения оптимальных параметров активации посевного материала была разработана программа исследований, которая включала ряд этапов:

- разработка схемы проведения исследований;
- изучение ответных реакций макромицетов (рост и накопление биомассы) на кратковременное облучение светом низкой интенсивности разной когерентности и длин волн от прорастания спор до разных стадий роста вегетативного мицелия;
- изучение динамики фоточувствительности макромицетов на разных стадиях роста посевного материала;
- анализ полученных результатов и определение оптимальных параметров фотоиндукции активности посевного материала;
- определение эффективности использования активированного посевного мицелия для получения биомассы макромицетов.

Схема проведения исследований (рис. 3.3) включала облучение на разных этапах получения посевного мицелия, начиная от спор и заканчивая стационарной фазой роста.

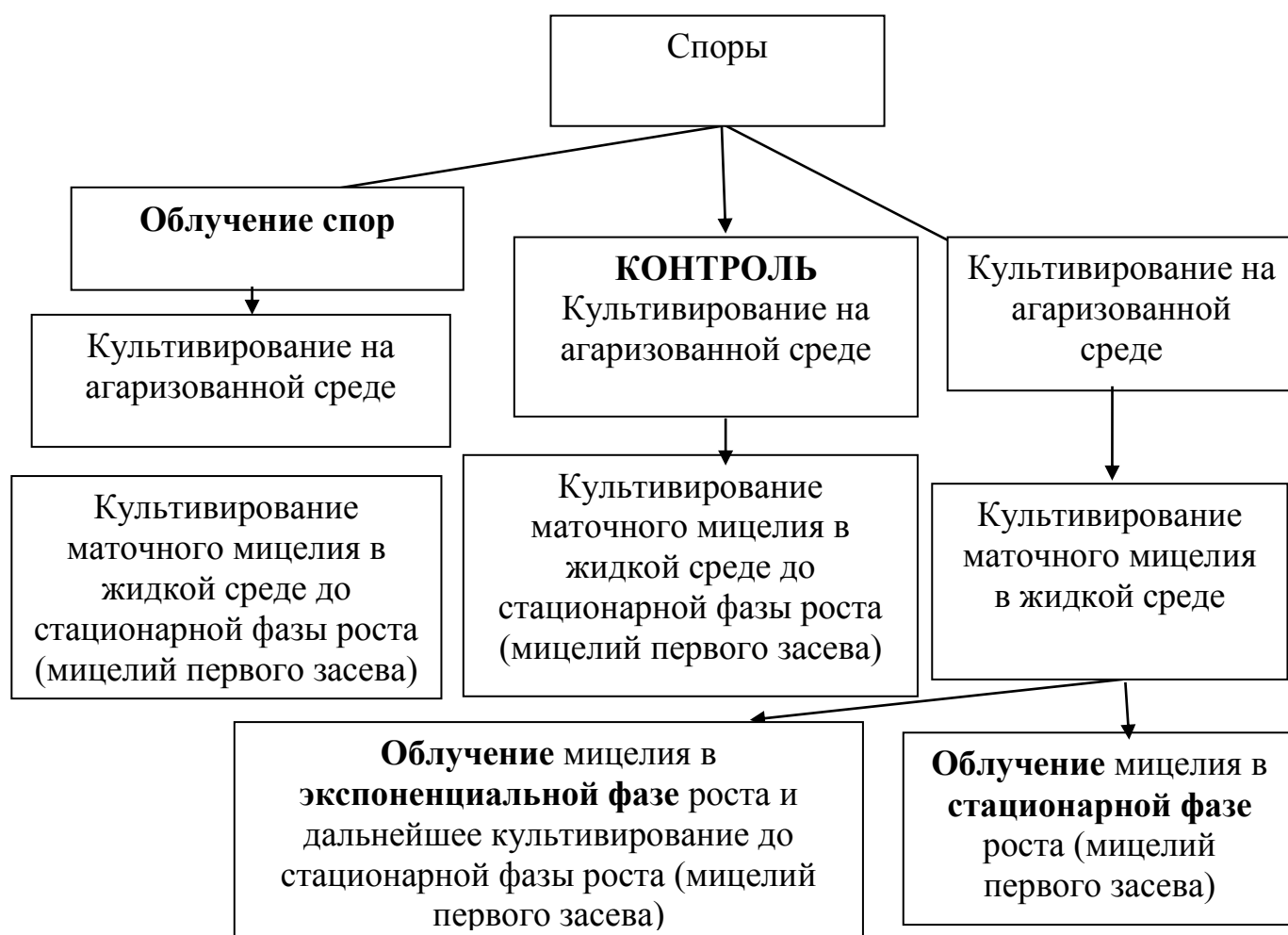


Рис. 3.3. Схема активизации посевного материала и получение мицелия первого засева

Результаты, представленные в таблице 3.4, демонстрируют различные реакции макромицетов на световые воздействия. *G. applanatum* и *P. ostreatus* индифферентны к зеленому свету (514 нм) на стадии прорастания спор, тогда как у *F. velutipes*, *G. lucidum*, *H. erinaceus* и *L. edodes* он ингибирует дальнейший рост мицелия. У *F. velutipes* облучение зеленым светом как на стадии прорастания спор так на вегетативной стадии роста оказывает ингибирующий эффект на эти процессы. Однако, в процессе формирования вегетативного мицелия отношение *G. lucidum*, *H. erinaceus*, *L. edodes* и *P. ostreatus* к свету этого диапазона длин волн кардинально меняется и наблюдается значительная стимуляция ростовых процессов после облучения посевного мицелия в экспоненциальной и стационарной фазе роста.

Таблица 3.4

Рост макромицетов (накопление биомассы, г/л сухой биомассы) при использовании посевного материала, облученного низкоинтенсивным лазерным светом на разных стадиях онтогенеза

Вид, штамм	Посевой мицелий, облученный на стадиях онтогенеза									Контроль, не облучавший ся посевой мицелий
	Споры			Экспоненциальная фаза роста			Стационарная фаза роста			
	632,8 нм	514,5 нм	488,0 нм	632,8 нм	514,5 нм	488,0 нм	632,8 нм	514,5 нм	488,0 нм	
<i>F. velutipes</i> 3923	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
<i>G. applanatum</i> 1899	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
<i>G. lucidum</i> 1908	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
<i>H. erinaceus</i>	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
<i>L. edodes</i> 353	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
<i>P. ostreatus</i> 531	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

Примечание: жирным шрифтом отмечено максимальное накопление биомассы при использовании посевного материала, облученного низкоинтенсивным лазерным светом; * - обозначено статистически достоверные различия по отношению к контролю, ($p \leq 0,05$) результаты представлены как $M \pm n$ $n=5$

Споры *G. applanatum* не проявляют чувствительности к синему свету (488,0 нм), тогда как красный (632,8 нм) и синий свет в разной степени стимулируют рост мицелия изученных видов на всех фазах развития.

Результаты сравнительного изучения фоточувствительности макромицетов на стадии прорастания спор и развития вегетативного мицелия, представленные на рис. 3.4, также демонстрируют динамику изменения их реакции на облучение в процессе развития.

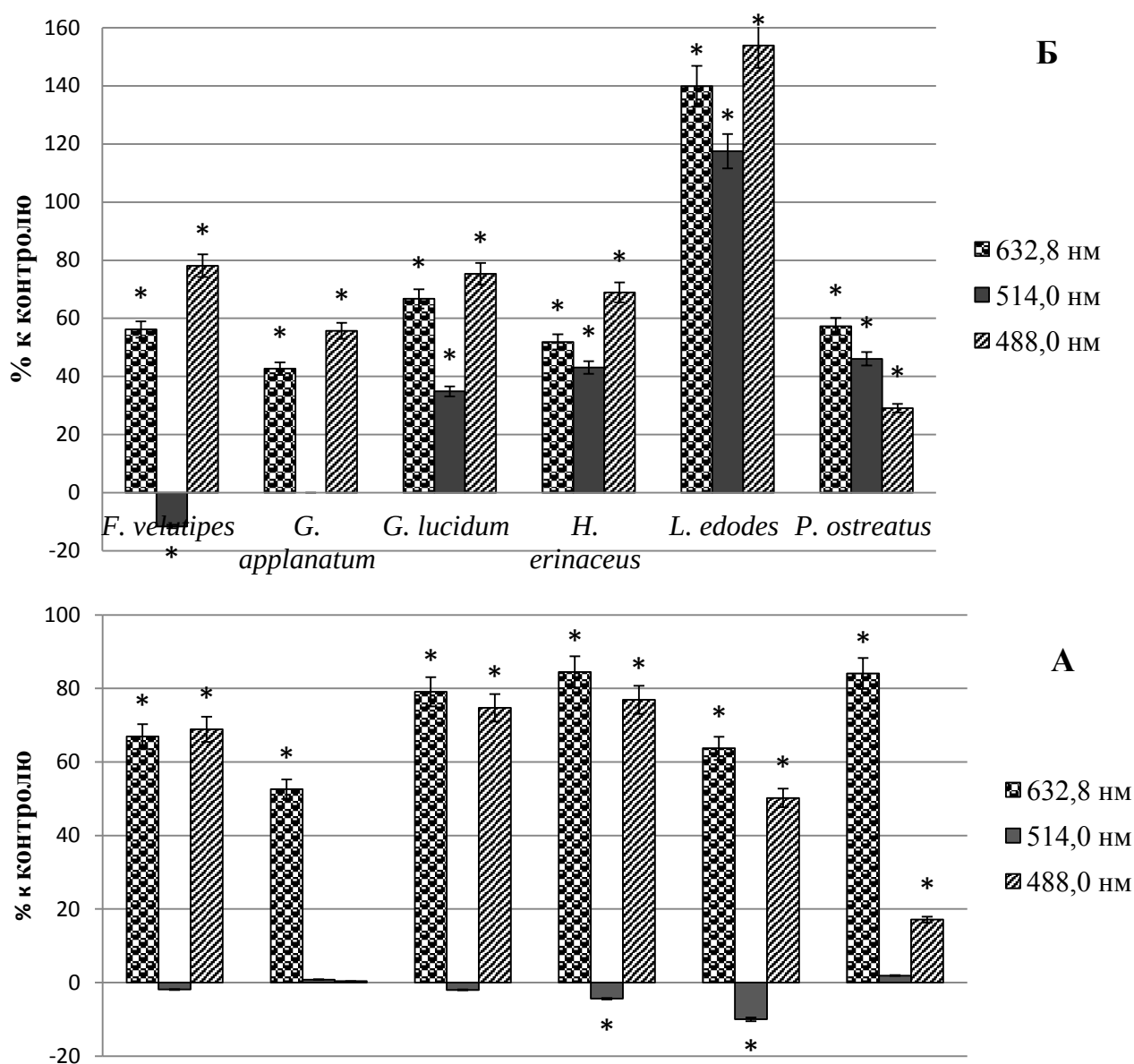


Рис. 3.4. Фоточувствительность спор и вегетативного мицелия макромицетов; А – споры; Б – вегетативный мицелий; * - обозначено статистически достоверные различия по отношению к контролю, ($p \leq 0,05$) результаты представлены как $M \pm n$ $n=5$

Поскольку в вегетативном мицелии, сформировавшемся из модифицированных под действием света спор, также сохраняется способность к ускоренному росту, можно утверждать, что изменения, вызванные светом, имеют пролонгированное действие и могут передаваться на дальнейшую онтогенетическую стадию от спор и монокариотического мицелия к мицелию дикариотическому. Такие реакции связывают с изменениями в параметрах клеточного гомеостаза и они вписываются в теорию об универсальных механизмах лазерной биостимуляции [77].

Анализ ростовых показателей активированного посевного материала позволил определить оптимальные параметры облучения для каждого штамма, позволяющие получить максимальный стимулирующий эффект. Так, активацию посевного мицелия *F. velutipes*, *G. applanatum* и *P. ostreatus* целесообразно проводить на экспоненциальной и стационарной фазах роста, а *G. lucidum* – в стационарной. Облучение спор *H. erinaceus* лазерным светом с длиной волны 488,0 нм и 632,8 нм приводит к максимальной стимуляции ростовых процессов и накопление биомассы увеличивается почти в три раза по сравнению с контролем. При облучении мицелия в том же режиме на экспоненциальной фазе роста эффект стимуляции на 15-18% ниже, но тем не менее увеличение биомассы было более, чем в 2 раза выше, чем в контроле. Фотостимуляция красным и синим светом одинаково эффективна на всех изученных стадиях онтогенеза *L. edodes*.

При изучении влияния когерентного и некогерентного света низкой интенсивности в непрерывном и импульсном режиме на прорастание спор мы не получили однозначных данных о преимуществах какого-либо из них для всех исследованных видов макромицетов. Поэтому нами была поставлена задача определения специфичности воздействия когерентного света и импульсного режима облучения на вегетативный посевной мицелий макромицетов.

Кроме изученных выше видов, на данном этапе исследований были включены другие виды макромицетов, имеющие не меньшее практическое

значение, как продуценты широкого спектра биологически активных веществ, такие как *C. militaris*, *I. obliquus*, *M. conica* и *M. esculenta*. Получение спор у *C. militaris* и *I. obliquus* в лабораторных условиях связано с большими трудностями, а прорастание спор *M. conica* и *M. esculenta* не требует какой-либо стимуляции, поэтому их не включали в предыдущие программы исследований.

Большой научный и практический интерес представляет изучение фоточувствительности *C. militaris*, *M. conica* и *M. esculenta* не только как продуцентов биологически активных субстанций, но и как представителей другой систематической группы макромицетов, относящейся к *Ascomycetes*. Поэтому было выдвинуто предположение, что их фоторецепторная система может иметь некоторые отличия от таковой *Basidiomycetes*.

Результаты, представленные в таблице 3.5, демонстрируют достоверное преимущество использования лазерного света в синем и красном диапазонах длин волн для активации посевного мицелия на стационарной фазе роста по сравнению с облучением в тех же режимах некогерентным светом. Эффективность когерентного света низкой интенсивности на 5 – 40 % выше для *C. militaris*, *F. velutipes*, *G. applanatum*, *G. lucidum*, *H. erinaceus*, *I. obliquus*, *L. edodes*, *M. conica*, *M. esculenta* и *P. ostreatus*. В большей степени эти различия проявлялись у штамма *G. lucidum*. Использование посевного мицелия облученного в этом режиме, увеличивало выход биомассы при глубинном культивировании на 75%, тогда как такая же обработка посевного материала с помощью светодиодных источников приводила к увеличению накопления биомассы только на 20%.

Таблица 3.5

Влияние когерентности света на рост мицелия (% изменения биомассы по отношению к контролю).

Вид	Длина волны, нм					
	632,8 нм когерентный	625.0 нм некогерентный	514.5 нм когерентный	522.0 нм некогерентный	488.0 нм когерентный	463.0 нм некогерентный
<i>C. militaris</i>	19,5±0,15*	11,6±0,24*	7,8±0,17*	1,6±0,4*	25,9±0,21*	11,9±0,18*
<i>F. velutipes</i>	56,2±1,8*	36,3±0,37*	-11,6±1,0*	0	78,1±1,1*	44,2±0,4*
<i>G. applanatum</i>	42,7±1,2*	26,6±0,27*	0	0	55,7±1,8*	37,6±0,4*
<i>G. lucidum</i>	66,7±1,4*	41,7±1,1*	34,9±0,28*	26,0±0,28*	75,3±0,6*	20,0±0,36*
<i>H. erinaceus</i>	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>I. obliquus</i>	17,2±0,18*	9,7±0,14*	2,2±0,1*	5,3±0,2*	56,9±2,0*	23,6±0,69*
<i>L. edodes</i>	139,9±2,5*	93,4±0,8*	117,5±2,3*	87,7±1,7*	153,9±3,0*	104,2±3,3*
<i>M. conica</i>	19,6±0,27*	13,9±0,2*	0	0	0	0
<i>M. esculenta</i>	32,7±1,9*	11,9±0,31*	0	0	0	0
<i>P. ostreatus</i>	57,3±2,1*	44,8±1,2*	46,1±0,6	43,6±0,5	29,1±0,5*	24,8±0,3*

Примечание: * - обозначено статистически достоверные различия по отношению к облучению некогерентным светом, ($p \leq 0,05$) результаты представлены как $M \pm n$ $n=4-5$

Наиболее оптимальными выбранные режимы фотообработки посевного мицелия были для *L. edodes*, у которого увеличение выхода биомассы по сравнению с контролем составляло около 160 % при облучении синим лазерным светом.

Впервые нами получены данные по фоточувствительности грибов из рода *Morchella* [94; 124; 128; 130; 134]. В отличие от ранее изученных видов синий свет не вызывал у них достоверных изменений скорости роста и накопления биомассы. В литературе отсутствуют какие-либо сведения о фоточувствительности макромицетов, принадлежащих к аскомицетам, поэтому можно только предположить у них существование некоторых различий в строении фоторецепторной системы, причиной чего могут быть их как генетические, так эпигенетические особенности.

Следует отметить, что взятые нами для исследований макромицеты отличаются своими реакциями на зеленый свет. У таких видов, как *G. applanatum*, *M. conica* и *M. esculenta* облучение в этом диапазоне не вызывает изменений ростовых процессов, а у *F. velutipes* лазерный свет приводит к достоверному угнетению роста на 11.6%. У остальных видов облучение посевного мицелия в этих режимах вызывает стимуляцию роста разной степени эффективности. Наибольшую индукцию ростовых процессов зеленый свет вызывал у *L. edodes* (117.5 % после облучения когерентным светом и 87.7 % - некогерентным).

В литературе достаточно много информации о спектральной чувствительности грибов в синем и красном диапазонах длин волн и механизмах фоторецепции такого света [260; 471; 473; 475; 594]. Гораздо меньше сведений о чувствительности грибов к зеленому свету и практическом его использовании в грибных биотехнологиях. Зеленый и дневной свет подавляли прорастание спор *Pleurotus sapidus* [461].

Известно, что свет с длиной волны 530 нм использовался для стимуляции роста и биосинтетической активности грибов из рода *Aspergillus*

при глубинном культивировании [39]. Изучалось влияние освещения светом в синем, зеленом и желтом диапазонах длин волн в период вегетативного роста и образования примордиев на формирование плодовых тел, морфологию и антиоксидантную активность *Pleurotus eryngii* и *Hypsizyguis marmoreus* [480;481]. Освещение зеленым светом вегетативного мицелия индуцировало образование плодоношения у *H. marmoreus* [184], в то же время освещение *L. edodes* в этом диапазоне в течение 30 дней после инокуляции субстратных блоков оказалось неэффективным [193]. Наши данные о действии освещения зеленым светом на ростовые процессы макромицетов коррелируют с вышеприведенными результатами. Мы также наблюдали отличия в реакциях разных видов на зелёный свет, которые определялись как видовой принадлежностью штамма, так и стадией онтогенеза, на которой проводилось облучение.

Для более детального анализа специфичности импульсных световых воздействий на активность посевного мицелия и определения целесообразности его практического использования проведено сравнительное изучение роста макромицетов при глубинном культивировании с использованием посевного мицелия, облученного в непрерывном и импульсном режимах (рис. 3.5). Полученные результаты показали, что импульсный свет вызывает большую активацию посевного мицелия. Эта активация выражалась в дополнительной достоверной стимуляции роста, что приводило к увеличению накопления биомассы мицелия во всех используемых в работе диапазонах длин волн у макромицетов *C. militaris*, *G. lucidum*, *H. erinaceus*, *L. edodes* и *P. ostreatus*.

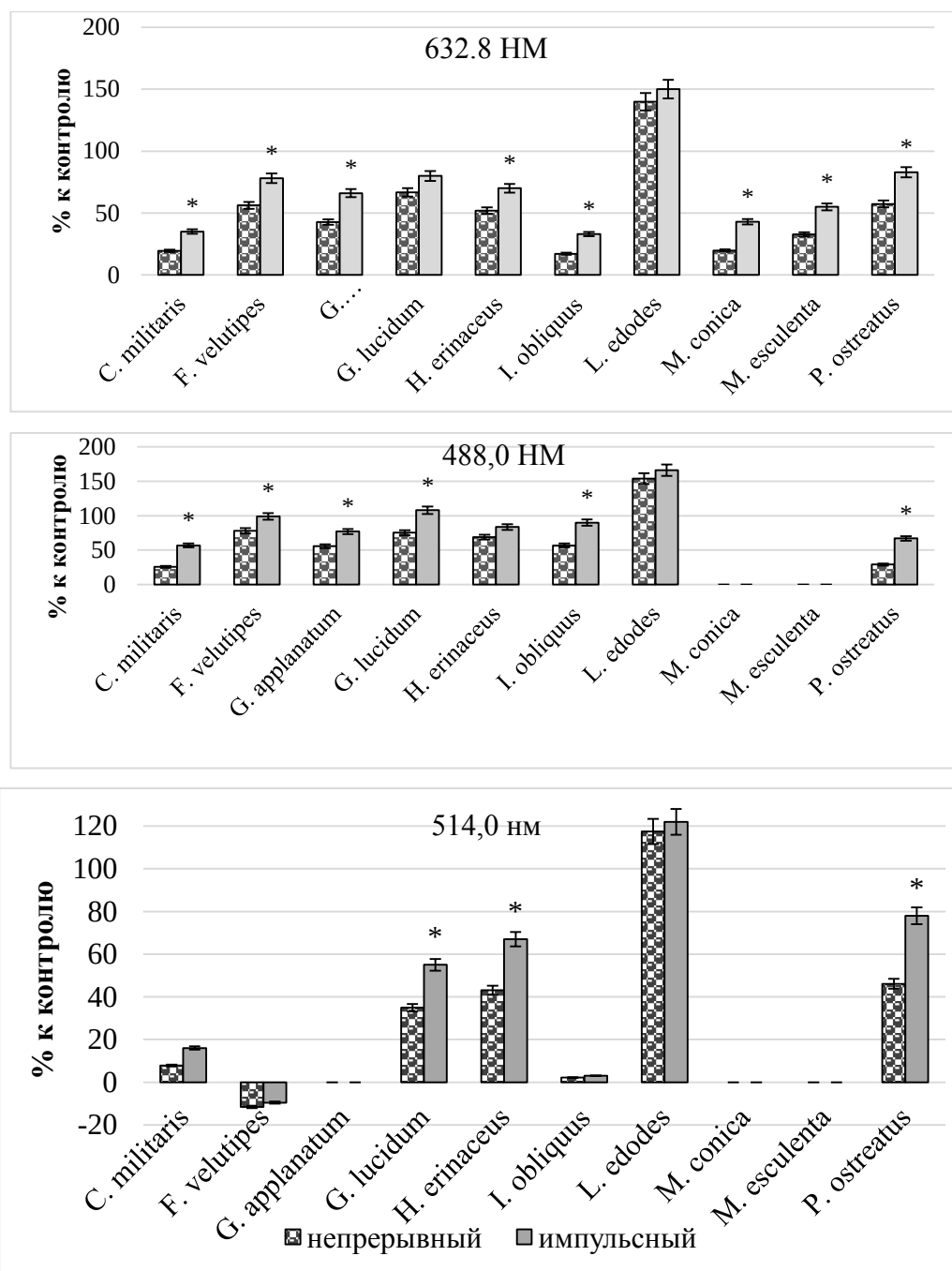


Рис. 3.5. Влияние природы света на накопление биомассы мицелия

Примечание: * - обозначено статистически достоверные различия по отношению к облучению непрерывным светом, ($p \leq 0,05$) результаты представлены как $M \pm n$ $n=4-5$

Облучение посевного мицелия зеленым импульсным светом не вызывало изменения ростовых показателей у *I. obliquus*, *G. applanatum*, *M. conica*, *M. esculenta*, которые были индифферентны к непрерывному свету с длиной волны 514 нм. Мы не отметили достоверного изменения

ингибирующего эффекта на рост *F. velutipes* после облучения в указанном режиме.

Таким образом, исследованные нами макромицеты можно разделить на две группы, которые кардинально отличаются чувствительностью к свету низкой интенсивности в зеленом диапазоне длин волн, что, по-видимому, можно объяснить различным строением их фоторецепторной системы.

Несмотря на отмеченные отличия в фоточувствительности изученных нами макромицетов к свету низкой интенсивности можно отметить и некоторые закономерности:

- кратковременное облучение светом в красном и синем диапазоне длин волн вызывает наибольший стимулирующий эффект у исследованных макромицетов на стадиях прорастания спор, развития моноспоровых изолятов и вегетативного мицелия, кроме видов р. *Morchella*;
- облучение посевного мицелия когерентным светом в тех же режимах, что и некогерентным индуцирует дополнительную стимуляцию ростовых процессов;
- использование импульсного света той же плотности энергии и диапазонов длин волн, что и непрерывного вызывает дополнительный стимулирующий эффект;
- изученные макромицеты отличаются своей чувствительностью к зеленому свету, что может свидетельствовать о некоторых различиях в строении их фоторецепторной системы.

3.3. Определение эффективности использования активированного посевного мицелия для получения биомассы макромицетов.

Одним из важных моментов, которые определяют экономическую эффективность биотехнологического процесса, является количество инокулюма, который вносят в ферментационную среду. С этой целью,

мицелий, активизированный в оптимальном для каждого вида режиме, и контрольный, не подвергавшийся световым воздействиям, использовали в дальнейших исследованиях.

Исследования зависимости накопления биомассы изученными макромицетами от количества посевного материала при глубинном культивировании показали, что проведенная нами фотоактивация позволяет снизить при необходимости количество его внесения в субстрат в 4 раза (1,2%) (табл.3.6). При этом накопление биомассы *G. lucidum*, *H. erinaceus*, *L. edodes* и *P. ostreatus* достоверно выше, чем при внесении 5 % необлученного посевного материала.

Таблица 3.6

Накопление биомассы (г/л сухой биомассы) макромицетами при использовании разного количества посевного мицелия

Вид	Количество инокулюма, %	Контроль, без облучения	Мицелий, облученный в оптимальном режиме стимуляции
1	2	3	4
<i>C. militaris</i> 2029	5	6,0±0,2	7,5±0,3*
	2,5	4,6±0,1	6,5±0,4*
	1,2	3,2±0,1	5,1±0,3*
<i>F. velutipes</i> 3923	5	3,8±0,1	5,9±0,3*
	2,5	2,2±0,1	5,0±0,2*
	1,2	1,9±0,2	3,7±0,1*
<i>G. applanatum</i> 1899	5	7,5±0,2	9,7±0,4*
	2,5	3,9±0,3	7,8±0,4*
	1,2	2,9±0,3	6,7±0,4*
<i>G. lucidum</i> 1908	5	8,9±0,4	13,3±0,2*
	2,5	6,5±0,2	12,6±0,3*
	1,2	4,6±0,3	10,9±0,6*

Продолжение таблицы 3.6

1	2	3	4
<i>H. erinaceus</i> 963	5	6,2±0,2	11,8±0,3*
	2,5	3,2±0,2	9,2±0,1*
	1,2	2,4±0,1	7,4±0,3*
<i>I. obliquus</i> 1877	5	3,3±0,3	6,6±0,4*
	2,5	2,3±0,1	5,4±0,3*
	1,2	1,4±0,1	3,2±0,1*
<i>L. edodes</i> 353	5	7,0±0,4	16,4±0,3*
	2,5	4,0±0,1	14,3±0,2*
	1,2	2,5±0,3	8,5±0,3*
<i>M. conica</i> 1843	5	7,9 ± 0,2	9,4 ± 0,1*
	2,5	4,3±0,1	7,8±0,2*
	1,2	2,8±0,1	5,4±0,1*
<i>M. esculenta</i> 1738	5	5,9 ± 0,2	7,8±0,4*
	2,5	2,0±0,1	4,3±0,3*
	1,2	1,2±0,1	3,5 ± 0,2*
<i>P. ostreatus</i> 531	5	10,7±0,5	19,4±0,7*
	2,5	7,9±0,4	17,3±0,2*
	1,2	3,9±0,2	13,5±0,3*

Примечание: * - обозначено статистически достоверные различия по отношению к контролю, ($p \leq 0,05$) результаты представлены как $M \pm n$ $n=5$

Следует отметить, что уменьшение количества вносимого активизированного инокулюма способствует увеличению стимулирующего эффекта (рис. 3.6). При 1,2% инокуляции субстрата накопление биомассы *P. ostreatus* увеличивается более чем на 240%, в сравнении с необлученным контролем в той же концентрации, тогда как при внесении 5% активированного посевного материала – всего на 80%. Аналогичная

тенденция наблюдается у *G. applanatum*, *G. lucidum* и *H. erinaceus*. Это согласовывается с данными других исследователей, которые считают, что фоторегуляция в позитивном смысле (стимуляция) может происходить только тогда, когда условия для роста культуры не являются оптимальными [Кару, 2008].

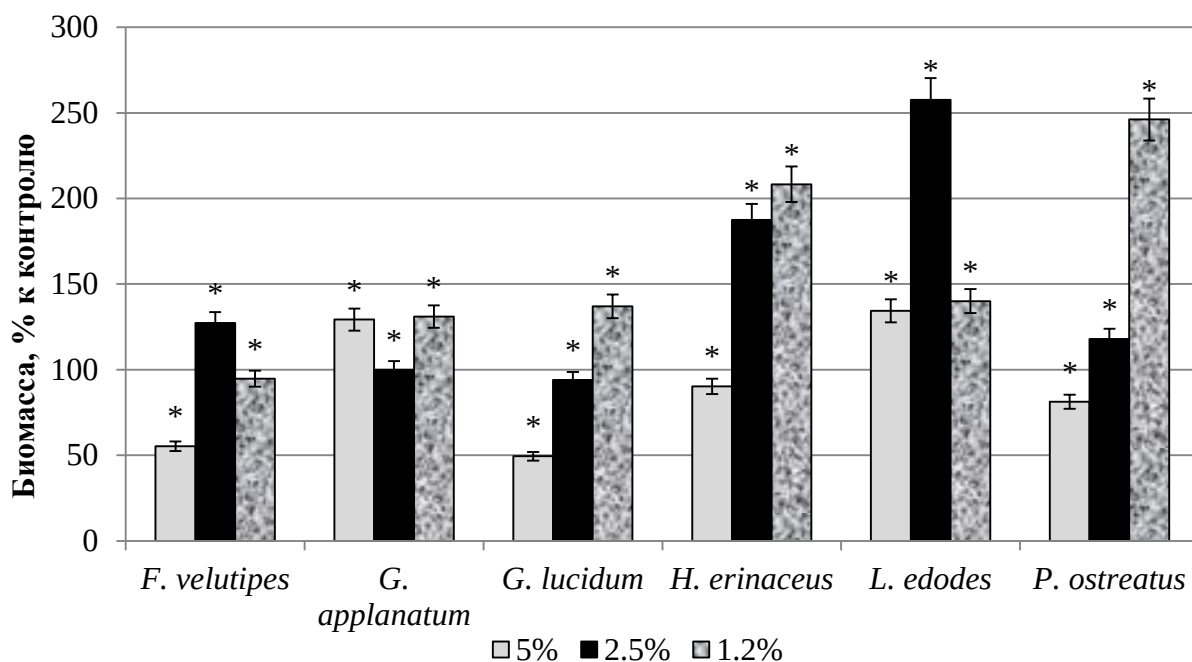


Рис. 3.6. Влияние количества активизированного посевного мицелия на реализацию стимулирующего эффекта

Примечание: для каждого вида использовали по 3 контроля, соответствующих каждой дозе посевного материала; * - обозначено статистически достоверные различия по отношению к контролю, ($p \leq 0,05$) результаты представлены как $M \pm n$ $n=5$

Таким образом, проведенные исследования позволили впервые определить оптимальные режимы стимуляции ростовых процессов культивируемых макромицетов на стадиях прорастания спор и роста вегетативного мицелия с помощью использования низкоинтенсивного лазерного света и разработать экологически чистые методы получения высокоактивного посевного материала. Новые подходы, позволяющие

целенаправленно регулировать потенциальные возможности ценных видов макромицетов, открывают большие перспективы для модификации существующих технологий их культивирования и интенсификации технологических этапов получения биомассы и нутрицевтиков. Такие подходы дадут возможность повысить экономическую эффективность биотехнологического процесса.

3.4. Динамика фотоиндуцированной активности посевного мицелия макромицетов в процессе хранения и при пересевах

Полученные нами новые для макромицетов данные о возможности передачи вызванных светом изменений от спор на следующие онтогенетические стадии развития вегетативного мицелия являются логическим основанием для проведения дальнейших исследований длительности сохранения фотоиндуцированной активности посевного мицелия при хранении и пересевах (пассажах).

3.4.1. Динамика фотоиндуцированной активности посевного мицелия в процессе хранения

В литературе практически отсутствует информация о динамике фотоиндуцированной активности в клетках живых организмов во времени. Поэтому нами была поставлена задача изучить влияние длительности хранения на активность посевного мицелия.

Для этого посевной глубинный мицелий, облученный в оптимальном для каждого штамма режиме на стационарной фазе роста, хранили в темноте при температуре +5⁰ С. Посев на жидкую питательную среду (5 % от объема среды) производили сразу после облучения и потом каждые 24 часа. Культивирование производили глубинным способом до стационарной фазы. Показателем активности посевного мицелия считали накопление биомассы

на определенный объем среды. В качестве контроля использовали мицелий, не подвергавшийся воздействию света.

Анализ полученных результатов показал, что достоверное снижение индуцированной активности посевного мицелия начинается уже в первые 24 часа хранения у видов *F. velutipes*, *H. erinaceus* и *I. obliquus* (рис.3.7). Посевной мицелий *C. militaris*, *G. applanatum*, *P. ostreatus* и *L. edodes* начинает терять свою активность через 24 часа после облучения. Причем у *P. ostreatus* она остается неизменной первые 24 часа, а у *G. lucidum* 48 часов. Однако, через 72 часа активность посевного мицелия у всех штаммов снижается до уровня контроля.

Известно, что большинство изменений клеточной активности, вызванных воздействием внешней среды, обратимы. Длительность их сохранения зависит от многих факторов, которые, как правило, взаимосвязаны. В данном случае мы, по-видимому, не можем говорить о процессах внутриклеточной репарации, поскольку кратковременное облучение светом низкой интенсивности не вызывает изменений в структуре ДНК, а только индуцирует работу генов, ответственных за рецепцию светового сигнала и запуск каскада последующих реакций (Кару, Коррочано). Восстановление клеточного гомеостаза обусловлено генетическими факторами, сформировавшимися в процессе эволюции как защита от стрессовых воздействий окружающей среды.

Таким образом, нами впервые получены данные, свидетельствующие о снижении фотоиндуцированной ростовой активности посевного мицелия у всех штаммов макромицетов до уровня контроля уже через 72 часа после облучения, что необходимо будет учитывать при использовании методов биоактивации при помощи света низкой интенсивности в биотехнологиях культивирования макромицетов. Для максимальной интенсификации технологических этапов их культивирования инокуляцию ферментационных сред активированным посевным материалом следует производить в максимально короткие сроки после облучения.

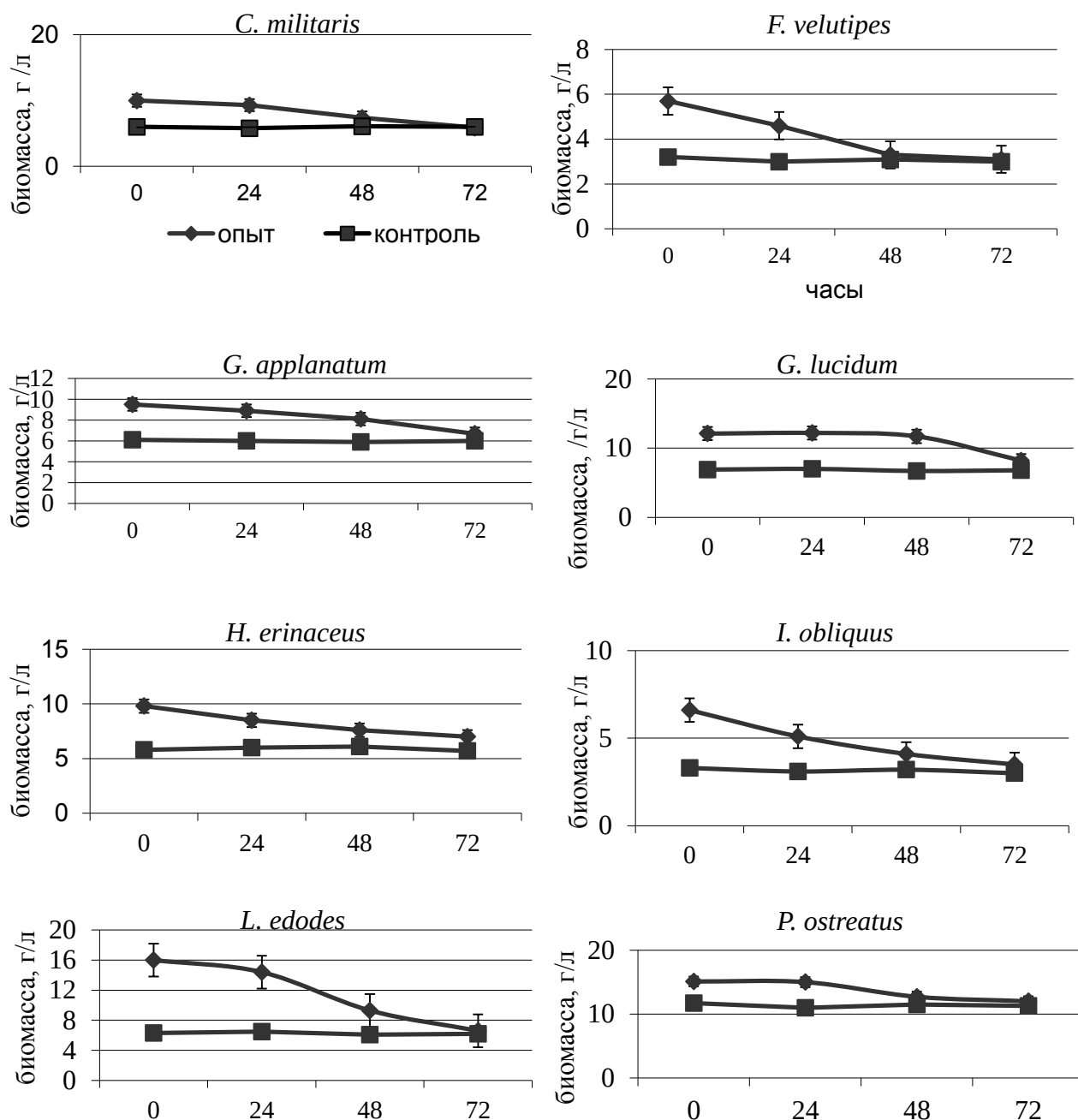


Рис. 3.7. Влияние длительности хранения на активность посевного мицелия макромицетов

3.4.2. Динамика фотоиндуцированной активности посевного мицелия макромицетов при пересевах

Как уже отмечалось выше, согласно теории об универсальных механизмах фотостимуляции, которая нашла экспериментальное

подтверждение на других биологических объектах, основные физические и/или химические изменения, вызванные светом в фотоакцепторных молекулах (например, в терминальных ферментах дыхательных цепей), сопровождаются каскадом биохимических реакций в клетках, которые не требуют дальнейшей активизации светом (цепи передачи и усиления фотосигнала или клеточная сигнализация), т.е. имеют пролонгированное действие. Однако, в научной литературе нами не обнаружено каких-либо сведений о продолжительности этих процессов и факторов, определяющих их продолжительность. Тем не менее, эти вопросы имеют не менее важное практическое значение при разработке высокоинтенсивных технологий с использованием искусственного света, чем длительность сохранения фотоиндуцированных изменений после облучения.

Нами была выдвинута гипотеза о том, что, в отличие от хранения активированного посевного материала на среде его культивирования, в которой отсутствуют условия для дальнейшего развития мицелия и запускаются механизмы восстановления исходного внутриклеточного гомеостаза, перенос фотоактивированного посевного мицелия на новые среды с достаточными концентрациями питательных компонентов будет способствовать реализации вызванных светом изменений. В наших исследованиях эти изменения сопровождались изменением ростовых показателей, биосинтетической активности, сокращением сроков культивирования и пр. [11; 13; 127; 134; 137; 139; 140-142].

Для того, чтобы ответить на этот вопрос, было проведено ряд последовательных пассажей глубинного мицелия после облучения и мицелия, не подвергавшегося световым воздействиям, в качестве контроля. Отбор мицелия для последующей инокуляции и определение накопления биомассы производили, как и в предыдущем опыте, на стационарной фазе роста.

Динамика изменения фотоиндуцированной активности вегетативного мицелия в процессе пересевов представлена на рис. 3.8.

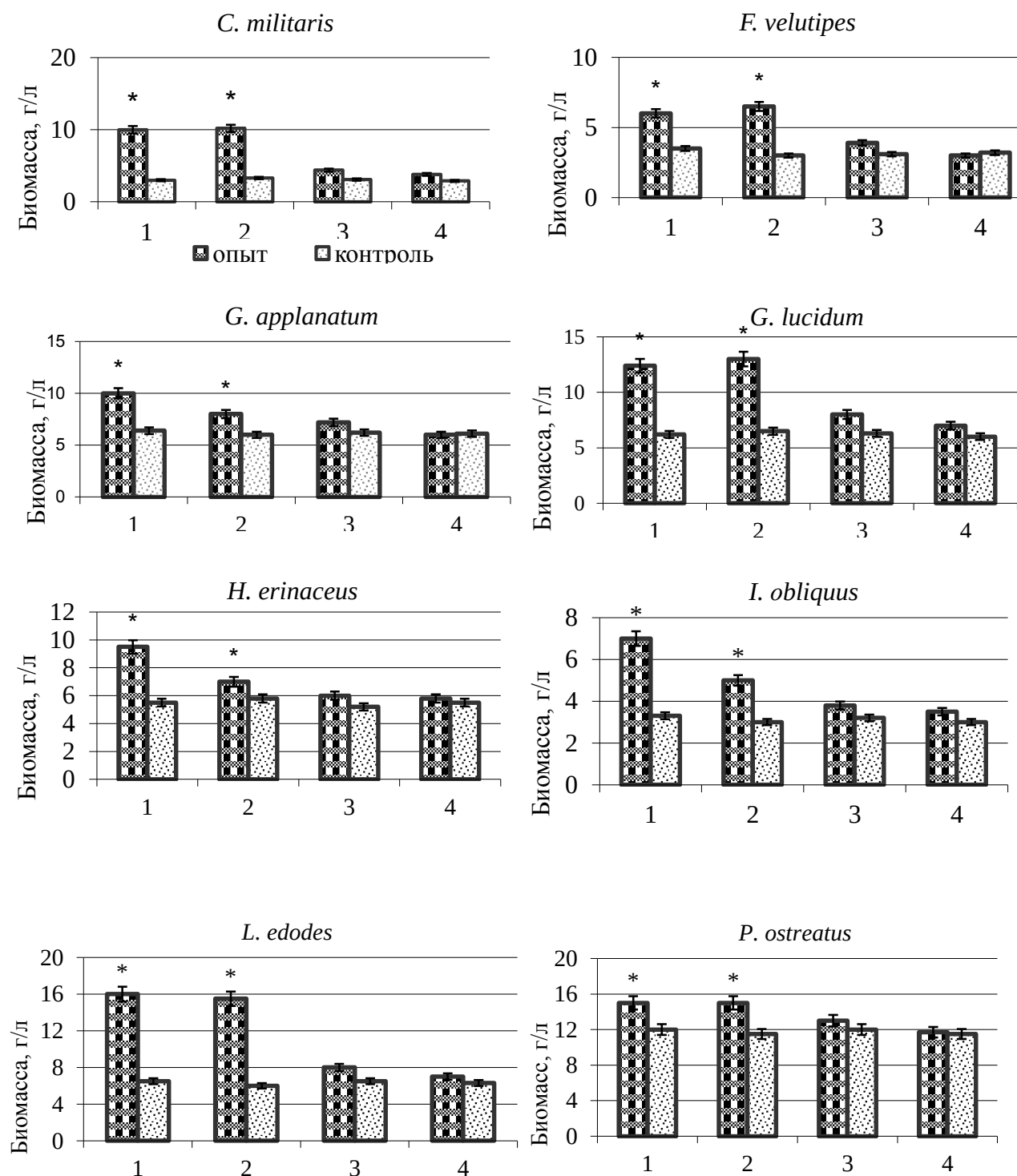


Рис. 3.8. Динамика фотоиндуцированной активности мицелия при пересевах

Примечание: * - обозначено статистически достоверные различия по отношению к контролю, ($p \leq 0,05$) результаты представлены как $M \pm n$ $n=5$

У штаммов *C. militaris*, *F. velutipes*, *G. lucidum*, *L. edodes* и *P. ostreatus* уровень активности достоверно не меняется при двух пассажах, тогда как у

G. applanatum, *H. erinaceus* и *I. obliquus* *P. ostreatus* её снижение наблюдалось уже после второго пересева. Накопление биомассы мицелия после инокуляции ферментационной среды мицелием четвертого засева после облучения достоверно не отличалось от контроля.

В литературе достаточно много информации о роли света различной природы и интенсивности как регулятора морфогенеза и биологической активности грибов. Рассматриваются также механизмы трансдукции световых сигналов и факторы, влияющие на эти процессы [77; 161; 260]. Наряду с этим в литературе практически отсутствуют сведения о продолжительности фотоиндукции и факторов её определяющих. В связи с этим, анализируя имеющиеся данные о механизмах фоторецепции и факторов, влияющих на экспрессию фотоиндуцированных генов, мы можем только предположить, что здесь действуют универсальные механизмы [156] стремления любой живой материи к сохранению постоянства своего внутреннего состояния посредством скоординированных реакций, направленных на поддержание динамического равновесия, восстанавливать утраченное равновесие, преодолевать сопротивление внешней среды.

Таким образом, нами впервые были получены данные о динамике изменения фотоиндуцированной активности посевного мицелия после нескольких пересевов, что позволило рекомендовать использовать его для *S. militaris*, *F. velutipes*, *G. lucidum*, *P. ostreatus* и *L. edodes* для двух последовательных инокуляций, а для *G. applanatum*, *H. erinaceus*, и *I. obliquus* только для одной.

Учитывая универсальность упомянутых выше механизмов фоторецепции и гомеостаза, можно предположить, что аналогичная тенденция будет наблюдаться и при изучении этих вопросов у других видов грибов. Незначительные различия в длительности сохранения фотоиндуцированной активности можно объяснить физиологическими особенностями каждого вида и особенностями изменения метаболизма под воздействием света.

Таким образом, в результате проведенных исследований установлено, что максимальная индуцирующая прорастание спор доза облучения в опыте - до 230 мДж/см². Доза 650 мДж/см² подавляла прорастание спор всех изученных видов.

Впервые установлены различия в фоточувствительности базидиоспор не только разных видов, но и штаммов одного и того же вида, что по-видимому связано с их географическим происхождением и эпигенетическими особенностями, которые были сформированы под действием различных экологических факторов.

Определено, что базидиоспоры большинства изученных видов более чувствительны к когерентному (лазерному) свету, чем к некогерентному (светодиоды). Особенно ярко эти различия выражены у *F. velutipes*, *G. aplanatum*, *G. lucidum* и *H. erinaceus*.

Импульсный свет оказывает достоверно большее стимулирующее влияние на прорастание базидиоспор *F. velutipes* и *G. aplanatum*, чем непрерывный при той же дозе и длине волны. Споры *H. erinaceus*, *G. lucidum*, *L. edodes* и *P. ostreatus* практически одинаково реагируют на оба режима облучения.

Для видов грибов, споры которых прорастают длительное время, выявлено сокращение времени их прорастания и формирования воздушного мицелия на агаризованной среде на 2-3 суток после световых воздействий по сравнению с начальными показателями у исследованных штаммов.

Фотоиндуцированная когерентным светом активность спор передается на следующую стадию - формированию ростковой гифы что выражается в увеличении скорости роста мицелия моноспорового изолята по сравнению с контролем. Установлено, специфика лазерной фотоиндукции, приводящая к дополнительной стимуляции различных процессов в клетке, может проявляться и после прорастания споры. Впервые установлена динамика изменений фоточувствительности макромицетов на разных стадиях онтогенеза.

Эффективность использования лазерного света в синем и красном диапазонах длин волн для активации посевного мицелия на стационарной фазе роста на 5 – 40 % выше по сравнению с облучением в тех же режимах некогерентным светом для *C. militaris*, *F. velutipes*, *G. applanatum*, *G. lucidum*, *H. erinaceus*, *I. obliquus*, *L. edodes*, *M. conica*, *M. esculenta* и *P. ostreatus*.

Установлены режимы фотоактивации посевного мицелия позволяющие снизить количество его внесения в субстрат в 2 - 4 раза (1,2%). При этом накопление биомассы *G. lucidum*, *H. erinaceus*, *L. edodes* и *P. ostreatus* достоверно выше, чем при внесении 5 % необлученного посевного материала.

Снижение фотоиндуцированной ростовой активности посевного мицелия у всех штаммов макромицетов до уровня контроля при хранении при температуре +5 °С происходит через 72 часа после облучения.

Результаты представленные в разделе освещены в следующих публикациях: 47; 49; 106; 109; 116; 124-130; 134; 137; 141; 142; 512; 516; 517; 523.

РАЗДЕЛ 4

ФАКТОРЫ, ОПРЕДЕЛЯЮЩИЕ РЕАЛИЗАЦИЮ ФОТОСТИМУЛИРУЮЩЕГО ЭФФЕКТА В ПРОЦЕССЕ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ

В доступной нам литературе отсутствуют какие-либо сведения о факторах, влияющих на экспрессию генов и реализацию фотоиндуцированных изменений у макромицетов. Тем не менее, их знание является неотъемлемой составляющей успешного использования искусственного света в биотехнологиях культивирования макромицетов. В работах ряда авторов, проводивших исследования с микромицетами, было признано, что характер среды, на которой выращивается гриб и способ культивирования, определяют, будет ли свет стимулировать или уменьшать темп роста грибов. [236; 252; 310; 311; 368; 558; 595-598]. Так, установлена взаимосвязь фотоиндуцированной активности ферментов *Trichoderma reesei*, необходимых для деструкции клеточной стенки растений и источников питания [598]. Большое значение при рассмотрении вопросов фоторецепции и экспрессии ферментов и генов у грибов уделяется углеводному обмену. Есть сведения о том, что свет может значительно ингибировать поглощение глюкозы *Aspergillus ornatulus* [355], а глюкозоамилазная активность мицелия *Aspergillus niger*, подвергнувшегося воздействию голубого света, увеличивается более, чем в 2,5-раза по сравнению с мицелием, выращенным в темноте [668]. Выращенные на свету культуры *P. blakesleeanus* показывают более высокий уровень активности алкогольдегидрогеназы [321]. Что касается фоточувствительности метаболизма азота, то у грибов она изучена довольно незначительно. Всё же некоторые исследователи полагают, что связь между светом и азотным обменом может существовать [370; 544; 571]. Обнаружено,

что среди генов, контролирующих циркадные ритмы, есть несколько генов, участвующих в метаболизме азота [256]. У *N. crassa* синий свет индуцирует снижение нитратредуктазной активности [401]. Наличие такой информации позволяет предположить, что свет может влиять на метаболизм азота и углерода грибов, и следовательно, концентрации источников азота и углерода, в свою очередь, могут влиять на их чувствительность к свету.

4.1. Влияние способа культивирования на фотоиндуцированную ростовую активность макромицетов

Нами впервые получены данные по влиянию способа культивирования на фотоиндуцированную активность макромицетов [137]. Исследования проводили на агаризованных и жидких средах (сусло-агар и жидкое сусло 7⁰Б). Облучению подвергали мицелий одного возраста, выращенный поверхностно на агаризованной среде в чашках Петри. Сразу после этого вырезали диски (5 мм в диаметре) с мицелием. При поверхностном культивировании на агаризованной среде диск помещали в центр чашки и инкубировали в темноте, измеряя диаметры роста колоний ежедневно.

При культивировании на жидких средах по 5 дисков с облученным мицелием и необлученным, в качестве контроля, помещали в колбы Эленмейера со средой и культивировали в стационарном или динамическом режиме. Длительность культивирования определялась видовой принадлежностью штаммов и их исходными ростовыми характеристиками. Изменение ростовых показателей после облучения светом низкой эффективности определяли в % по отношению к контролю.

Результаты, представленные в таблице 4.1, свидетельствуют о несомненном влиянии способа культивирования на процессы, определяющие количественные изменения роста, вызванные светом.

Таблица 4.1

Влияние способа культивирования на фотоиндуцированные изменения роста макромицетов

Вид	Длина волны, нм					
	632,8 нм когерентный	625.0 нм некогерентный	514.5 нм когерентный	522.0 нм некогерентный	488.0 нм когерентный	463 нм некогерентный
1	2	3	4	5	6	7
<i>C. militaris</i>	Линейный рост на агаризованной среде, % увеличения скорости роста					
	10,3±0,13*	5.1±0,21	0	0	13,8±0,6*	9,5±0,17*
	Поверхностный рост на жидкой среде, % увеличения биомассы					
	6,1±0,3	5,9±0,17*	1,6±0.17	0	15,3±0,3*	9,3±1,12*
	Рост при глубинном культивировании, % увеличения биомассы					
	19,5±0,5*	11,6±0.24*	7,8±0,17*	1,6±0,4	25,9±1,21*	11,9±1,18*
<i>F. velutipes</i>	Линейный рост на агаризованной среде, % увеличения скорости роста					
	13,8±0,2*6	9,5±0,3*	0	0	12,6±0,32*	10,3±0,31*
	Поверхностный рост на жидкой среде, % увеличения биомассы					
	25,3±0,29	19,6±1,6*	1,1±0,15	0	34,2±1,9*	21,0±2,5*
	Рост при глубинном культивировании, % увеличения биомассы					
	56,2±1,8*	36,3±0,7*	-11,6±1,0*	0	78,1±1,1*	44,2±4,4*

Продолжение таблицы 4.1

1	2	3	4	5	6	7
<i>G. applanatum</i>	Линейный рост на агаризованной среде, % увеличения скорости роста					
	10,9±0,5*	8,3±0,30*	0	0	0	0
	Поверхностный рост на жидкой среде, % увеличения биомассы					
	11,7±0,4*	10,7±0,6*	0	0	18,4±1,1*	12,3±0,7*
	Рост при глубинном культивировании, % увеличения биомассы					
	42,7±1,2*	26,6±0,7*	0	0	55,7±1,8*	37,6±1,4*
<i>G. lucidum</i>	Линейный рост на агаризованной среде, % увеличения скорости роста					
	7,8±0,7*	6,7±0,7*	- 1,9±0,1	1,6±0,1	10,4±1,0*	9,6±0,7*
	Поверхностный рост на жидкой среде, % увеличения биомассы					
	25,8±1,2*	17,9±0,6*	10,8±0,8*	6,0±0,3*	36,5±1,4*	8,5±0,8*
	Рост при глубинном культивировании, % увеличения биомассы					
	66,7±1,4*	41,7±1,1*	34,9±0,8*	26,0±0,8*	75,3±0,6*	38,7±0,6*
<i>H. erinaceus</i>	Линейный рост на агаризованной среде, % увеличения скорости роста					
	37,5±1,1*	18,7±0,9*	32,9±0,7*	20,0±1,3*	29,6±2,4*	21,1±2,8*
	Поверхностный рост на жидкой среде, % увеличения биомассы					
	39,2±1,8*	29,7±0,18	32,2±1,1*	20,3±0,8*	45,5±5,2*	33,3±1,8*
	Рост при глубинном культивировании/ % увеличения биомассы					
	51,9±3,3*	36,5±4,2*	43,1±1,8*	31,0±2,3*	68,9±2,8*	43,5±1,8*

Продолжение таблицы 4.1

1	2	3	4	5	6	7
<i>I. obliquus</i>	Линейный рост на агаризованной среде, % увеличения скорости роста					
	11.3±0.2*	10.7±0.1*	1.1±0.2	- 0,7±0,1	26.6±1.4*	22.3±0.78*
	Поверхностный рост на жидкой среде, % увеличения биомассы					
	12.6±0.8*	7.9±0.3*	1.3±0.1	1.8±0.1	36.6±1.8*	21.03±0.7*
	Рост при глубинном культивировании, % увеличения биомассы					
	17.2±0.8*	9.7±0.4*	2.2±0.1*	5.3±0.2*	56.9±2.0*	23.6±0.9*
<i>L. edodes</i>	Линейный рост на агаризованной среде, % увеличения скорости роста					
	0	0	3.5±0.6	2.2±0.6	12.5±1.0*	1.2±0,2
	Поверхностный рост на жидкой среде, % увеличения биомассы					
	75.0±1.7	28,9±1,4*	66,8±2,0*	20,3±1,3*	76.8±1,9*	45,8±1,3*
	Рост при глубинном культивировании, % увеличения биомассы					
	139,9±2,5*	93,4±0,8*	117,5±2,3*	87,7±1,7*	153,9±3,0*	104,2±3,3*
<i>M. conica</i>	Линейный рост на агаризованной среде, % увеличения скорости роста					
	0	0	0	0	0	0
	Поверхностный рост на жидкой среде, % увеличения биомассы					
	9,6±0,17	7,6±0,19	0	0	0	0
	Рост при глубинном культивировании, % увеличения биомассы					
	19,6±0,17*	13,9±0,2*	0	0	0	0

Продолжение таблицы 4.1

1	2	3	4	5	6	7
<i>M. esculenta</i>	Линейный рост на агаризованной среде					
	0	0	0	0	0	0
	Поверхностный рост на жидкой среде					
	27,7±0,36	6,9±0,18	0	0	0	0
	Рост при глубинном культивировании					
	32,7±0,29*	11,9±1,1*	0	0	0	0
<i>P. ostreatus</i>	Линейный рост на агаризованной среде					
	25,5±0,2	22,2±0,29	14,4±0,4	12,6±0,13	14,7±0,14	10,5±0,17
	Поверхностный рост на жидкой среде					
	41,8±1,5	36,3±0,6	34,7±0,3	32,3±0,3	20,7±0,18	12,8±0,4
	Рост при глубинном культивировании					
	57.3±1,1*	44,8±1,2*	46.1±1,6	43,6±1,5	29,1±0,15*	24,8±0,8*

Примечание: * - обозначено статистически достоверные различия по отношению к контролю, ($p \leq 0,05$), результаты представлены как $M \pm n$ $n=4-5$

Достоверного отличия скорости роста облученного мицелия на агаризованной среде от контроля не обнаружено у *L. edodes*, *M. conica* и *M. esculenta* при всех режимах облучения. У *C. militaris*, *F. velutipes*, *G. lucidum* и *I. obliquus* не отмечалось различий в линейной скорости роста по отношению к контролю при облучении зеленым светом. У *G. applanatum* изменений скорости роста на агаризованной среде не обнаружено после обработки мицелия как синим, так и красным светом.

Анализ поверхностного роста мицелия макромицетов на жидкой среде путем определения биомассы выросшего мицелия показал достоверные различия этого показателя при тех же режимах световых воздействий по отношению к контролю. В данном случае отсутствие достоверных отличий между опытом и контролем для некоторых макромицетов при росте на агаризованных средах можно объяснить различием их морфологических изменений в ответ на световые воздействия. При определении линейной скорости роста не учитываются такие важные показатели роста как высота и густота мицелия. Поэтому А.С. Бухало было предложено проводить сравнительную характеристику роста разных штаммов макромицетов по ростовому коэффициенту (РК), который рассчитывается по формуле

$$PK = \frac{hdg}{t}$$

где d - диаметр колонии и h - высота в мм, t - возраст (сут.) [30].

Нами было установлено, что скорость роста мицелия гриба, облученного в разных спектрах, может достоверно не отличается от контроля [97;123; 134; 137]. Однако, за счет формирования более высокого и плотного мицелия при облучении, в опыте ростовой коэффициент у *L. edodes* был в 2-3 раза выше. Для *P. ostreatus* и *H. erinaceus* отмечалось как увеличение скорости линейного роста, так и ростового коэффициента более, чем в 2-3 раза. У *F. velutipes* и *C. militaris* скорость роста мицелия после облучения красным светом был незначительным, тогда как ростовой коэффициент увеличивался почти в 2 и 4 раза соответственно. Недостатком этого метода

оценки поверхностного роста, по нашему мнению, является некоторая субъективность при определении высоты и густоты мицелия, поэтому его использование не давало возможности определить достоверность влияния света на интенсивность роста на твердой среде (табл. 4.2).

Таблица 4.2

Мицелиальный рост облученных и контрольных штаммов грибов на агаризованной среде

	Ростовой коэффициент		
	контроль	632,8 нм	514,5 нм
1	2	3	4
<i>L. edodes</i>			
Ростовой коэффициент	58,0±7,9	173,0±5,9	170,4±3,9
Скорость роста, мм/сут	5,7	5,7	5,9
<i>P. ostreatus</i>			
Ростовой коэффициент	368,7±6,7	693,4±5,8	576,9±6,5
Скорость роста, мм/сут	7,2	8,8	8,1
<i>H. erinaceus</i>			
Ростовой коэффициент	43,4±3,1	153,4±3,3	148,8±5,9
Скорость роста, мм/сут	5,6	7,7	7,2
<i>F. velutipes</i>			
Ростовой коэффициент	320,0±6,2	631,7±4,4	332,3±3,6
Скорость роста, мм/сут	8,3	9,0	8,0
<i>C. militaris</i>			
Ростовой коэффициент	46,3±3,2	205,5±6,3	50,7±3,5
Скорость роста, мм/сут	6,1	6,6	5,9

Поэтому для получения достоверной картины, на наш взгляд, целесообразно проводить сравнение показателей роста на жидких средах при разных способах культивирования.

Для получения наибольшего стимулирующего эффекта от облучения глубинное культивирование оказалось наиболее предпочтительным. Увеличение накопления биомассы при культивировании в динамическом режиме варьировало в зависимости от штамма и режима облучения от 12 до более, чем 200 % по сравнению с культивированием на той же среде в стационарном режиме.

Таким образом, нами впервые для макромицетов установлено, что способ культивирования облученных штаммов макромицетов в значительной степени влияет на степень фотостимуляции ростовых процессов.

4.2. Влияние концентраций глюкозы на фотоиндуцированную ростовую активность макромицетов.

Принимая во внимание упомянутую ранее взаимосвязь между фотоиндуцированной активностью грибов и их метаболизмом, нами было высказано предположение, что концентрации основных источников питания могут оказывать влияние на изменения интенсивности роста и биологической активности макромицетов вызванные светом низкой интенсивности.

С целью экспериментальной проверки этого предположения нами было изучено накопление биомассы макромицетов на жидкой глюкозо-пептонной среде с разными концентрациями глюкозы (10, 30 и 50 г/л) при использовании посевного мицелия (5% от объема), облученного низкоинтенсивным красным светом (632,8 нм). Этот режим облучения был выбран как один из наиболее эффективных для активации посевного

материала введённых в опыт видов макромицетов, что было установлено нами ранее. Культивирование проводили в стационарном режиме.

У всех исследованных штаммов макромицетов наибольший стимулирующий эффект после облучения наблюдался при росте на среде с 10 г/л глюкозы (табл. 4.3).

Таблица 4.3

**Влияние концентрации глюкозы на фотоиндуцированную
стимуляцию роста макромицетов**

Содержание глюкозы, г/л	Биомасса, г/л		% увеличения биомассы
	Контроль	Облучение	
1	2	3	4
<i>C. militaris</i>			
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
<i>G. lucidum</i>			
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
<i>L. edodes</i>			
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
<i>H. erinaceus</i>			
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
<i>P. ostreatus</i>			
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

Примечание: * - обозначено статистически достоверные различия по отношению к контролю, ($p \leq 0,05$) результаты представлены как $M \pm n$ $n=5$

Увеличение концентрации глюкозы в 3 и 5 раз снижало увеличение накопления биомассы по сравнению с контролем у *C. militaris* на 7,3 %, у *G. lucidum* – 9 %, *L. edodes* – 24 % на среде с 30 г/л глюкозы и на 47% на среде с 50 г/л. Аналогичную тенденцию мы наблюдали и для *H. erinaceus* и *P. ostreatus*, где снижение эффективности облучения по этому показателю составляло 19 и 31% у *H. erinaceus* и 10 и 23% у *P. ostreatus* соответственно. Таким образом, можно констатировать наличие зависимости фотоиндуцированной стимуляции роста макромицетов от концентрации источника углерода в питательной среде. Этот факт инициировал предположение, что облучение низкой интенсивности приводит к изменениям трофики макромицетов, что выражается в увеличении эффективности потребления источника углерода на средах с пониженным содержанием глюкозы по сравнению с необлученным контролем.

Для проверки роли ограничения источника углерода в среде было проведено изучение потребления глюкозы при культивировании облученных и контрольных штаммов на средах с разной концентрацией глюкозы. Критерием оценки этого параметра служила величина экономического коэффициента. Полученные данные подтвердили наше предположение (рис. 4.1).

Эффективность потребления глюкозы как контрольными, так облученными штаммами макромицетов, была выше на среде, содержащей 10 г/л глюкозы. Это вполне объяснимо с экологической точки зрения адаптацией организма к негативным изменениям окружающей среды. Однако, повышение экономического эффекта у фотоактивированных штаммов значительно сильнее выражено при низком содержании источника углерода. Если у контрольных штаммов макромицетов эффективность освоения субстрата на среде с 10 г/л глюкозы выше на 10% по сравнению с культивированием на среде с 30 г/л глюкозы, то у опытных штаммов на 30-45% по сравнению со средой с 30 г/л глюкозы и на 35-56% с 50 г/л глюкозы.

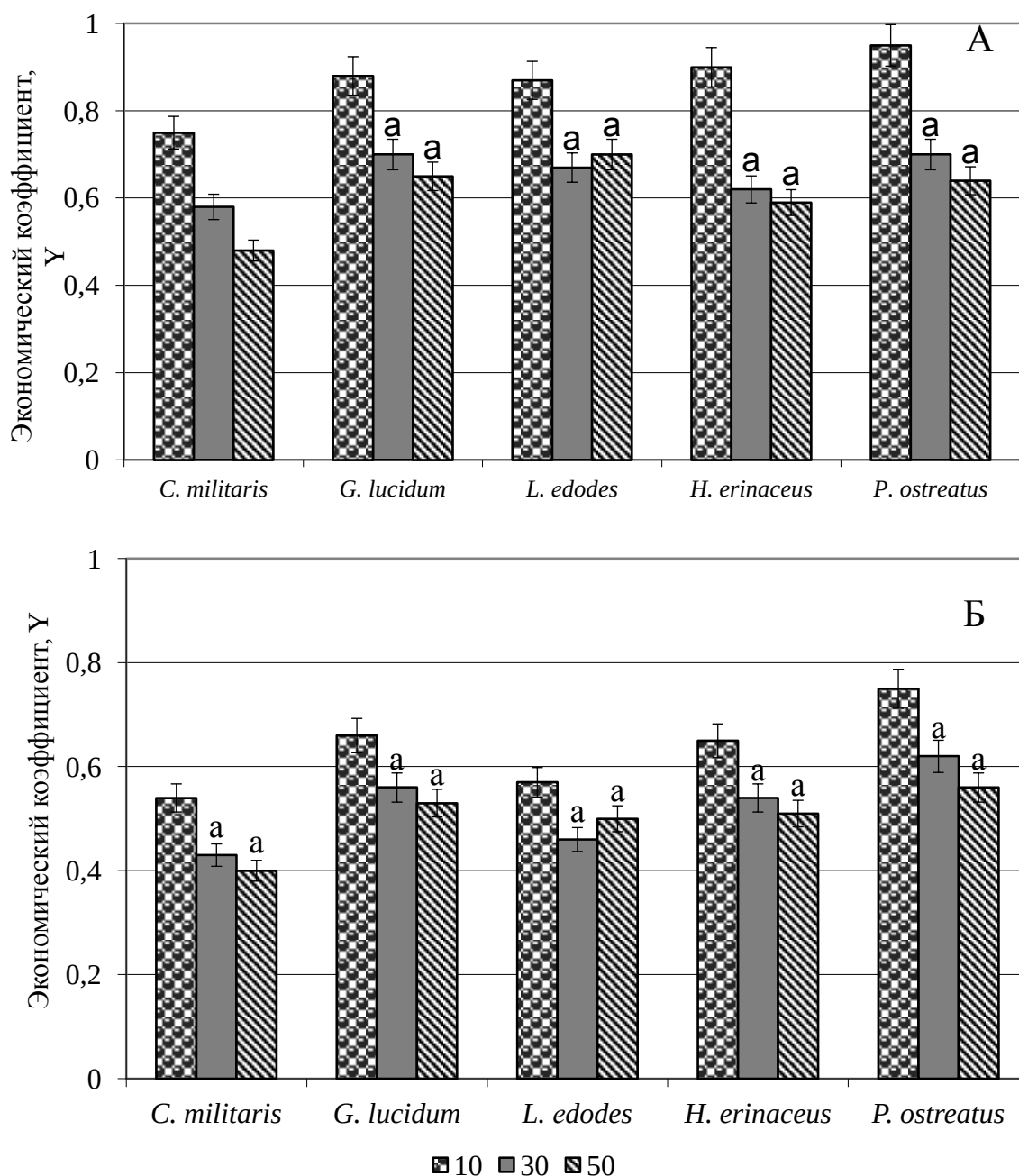


Рис. 4.1. Эффективность потребления глюкозы штаммами макромицетов на средах с разными концентрациями глюкозы (А – облученные штаммы, Б – контрольные, без облучения)

Примечание: одинаковыми буквами (а) обозначены значения, не имеющие достоверно значимых отличий

Таким образом, нами установлено, что свет низкой интенсивности вызывает изменение трофики макромицетов, что выражается в увеличении

эффективности потребления источника углерода на средах с пониженным содержанием глюкозы.

4.3 Влияние концентраций источника азота на фотоиндуцированную ростовую активность макромицетов

Как уже упоминалось выше, фоточувствительность метаболизма азота у грибов изучена довольно незначительно. Тем не менее, некоторые исследователи полагают, что связь между светом и азотным обменом может существовать [370; 544]. На этом этапе исследований нами проведено изучение влияния разных концентраций пептона (1, 3 и 4 г/л) на фотоиндуцированную ростовую активность макромицетов. Облучение проводили низкоинтенсивным лазерным светом с длиной волны 632,8 нм. Исследования проводили на глюкозо-пептонной среде, содержащей в качестве источника углерода 30 г/л глюкозы и соответствующие концентрации пептона. Полученные нами результаты (рис. 4.2) не показали достоверного влияния концентрации азота на фотоиндуцированную стимуляцию роста макромицетов.

И все же мы предположили, что концентрация азота может влиять на реализацию других фотоиндуцированных изменений биологической активности этих грибов, таких, например, как синтез различных биологически активных соединений и ферментов, что не всегда коррелирует с их ростовой активностью [11; 13; 14; 26; 94; 151; 154; 155; 213; 214; 519-522].

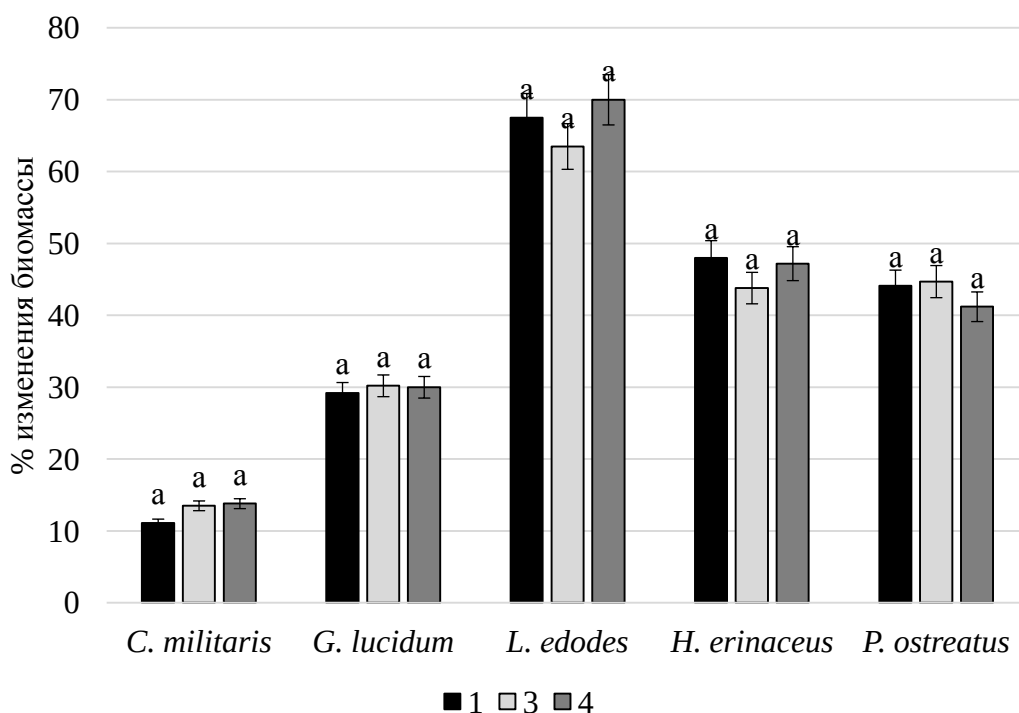


Рис. 4.2. Рост фотоактивированного мицелия макромицетов на среде с разными концентрациями пептона

Примечание: одинаковыми буквами (a) обозначены значения, не имеющие достоверно значимых отличий

Это явилось основанием для поведения исследований направленных на изучение влияния концентраций азота на фотоиндукцию синтеза макромицетами таких биологически активных соединений как меланины, а также их ферментативную активность [131; 133; 138; 525].

Представленные в разделе результаты освещены в следующих публикациях: 26; 123; 134; 136; 137.

РАЗДЕЛ 5

ИНТЕНСИФИКАЦИЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ СЪЕДОБНЫХ И ЛЕКАРСТВЕННЫХ МАКРОМИЦЕТОВ ПРИ ПОВЕРХНОСТНОМ И ГЛУБИННОМ КУЛЬТИВИРОВАНИИ НА ЖИДКИХ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕДАХ

Одним из важных показателей, определяющих экономическую эффективность той или иной биотехнологии, является длительность процесса получения целевого продукта и его количество. Поэтому при изучении влияния различных факторов, регулирующих процессы роста и биосинтетической активности продуцентов, неотъемлемым этапом является изучение динамики их роста и биосинтетической активности как при поверхностном, так и при погруженном культивировании на жидких средах.

Изучению факторов регуляции роста и биологической активности макромицетов – объектов наших исследований и оптимизации условий их глубинного культивирования уделяли внимание как мы [11; 13; 14; 22; 150; 213; 214; 566] так и многие другие исследователи [152; 155; 185; 195; 211; 299; 422; 528; 529]. В основном применялись традиционные подходы, используемые в биотехнологических исследованиях: влияние источников углерода, азота, микроэлементов, температуры, pH среды, аэрации и различных органических добавок на процессы накопления биомассы и биологически активных соединений.

Нами впервые проведены исследования возможности использования света низкой интенсивности как фактора регуляции роста и биосинтетической активности наиболее практически значимых макромицетов для интенсификации технологических этапов их культивирования [26; 116; 120; 134; 136; 137].

Поскольку нами было установлено, что кратковременное облучение посевного мицелия различных макромицетов светом низкой интенсивности

активизирует рост их вегетативного мицелия, было сделано предположение, что использование фотоактивированного мицелия позволит сократить сроки их культивирования и увеличить синтез биологически активных веществ.

5.1. Динамика накопления биомассы макромицетами при использовании фотоактивированного посевного мицелия

Установлено, что облучение посевного мицелия изученных макромицетов низкоинтенсивным светом при глубинном культивировании приводит к сокращению лаг-фазы и увеличению скорости роста культуры (рис. 5.1) Процесс роста мицелия *L. edodes* и *H. erinaceus* достигал стационарной фазы на 2 дня раньше, чем в контроле при облучении лазерным светом в красном и синем диапазоне длин волн. У *G. lucidum* после активации посевного материала в том же режиме стационарный рост отмечали на 4 дня раньше. Изучение динамики накопления биомассы *P. ostereatus* подтвердило полученные нами ранее данные об эффективности использования зеленого света для активизации его посевного мицелия в стадии стационарного роста. Использование активизированного в этом режиме мицелия позволило сократить длительность культивирования и достичь стационарной фазы роста на 4 дня раньше. Такими же были результаты при использовании красного света. Синий свет выявился не столь эффективным для стимуляции ростовых процессов у этого штамма. У *I. obliquus* ростовые процессы оказались более чувствительными к синему свету низкой интенсивности, облучение которым позволило получить наибольший выход биомассы (6,6 г/л) уже через 9 суток культивирования, тогда как накопление биомассы мицелия с использованием лазерного света с длиной волны 632,8 нм составляло 4,4 г/л через 12 суток культивирования (в контроле и при использовании зеленого света - 3,5 г/л).

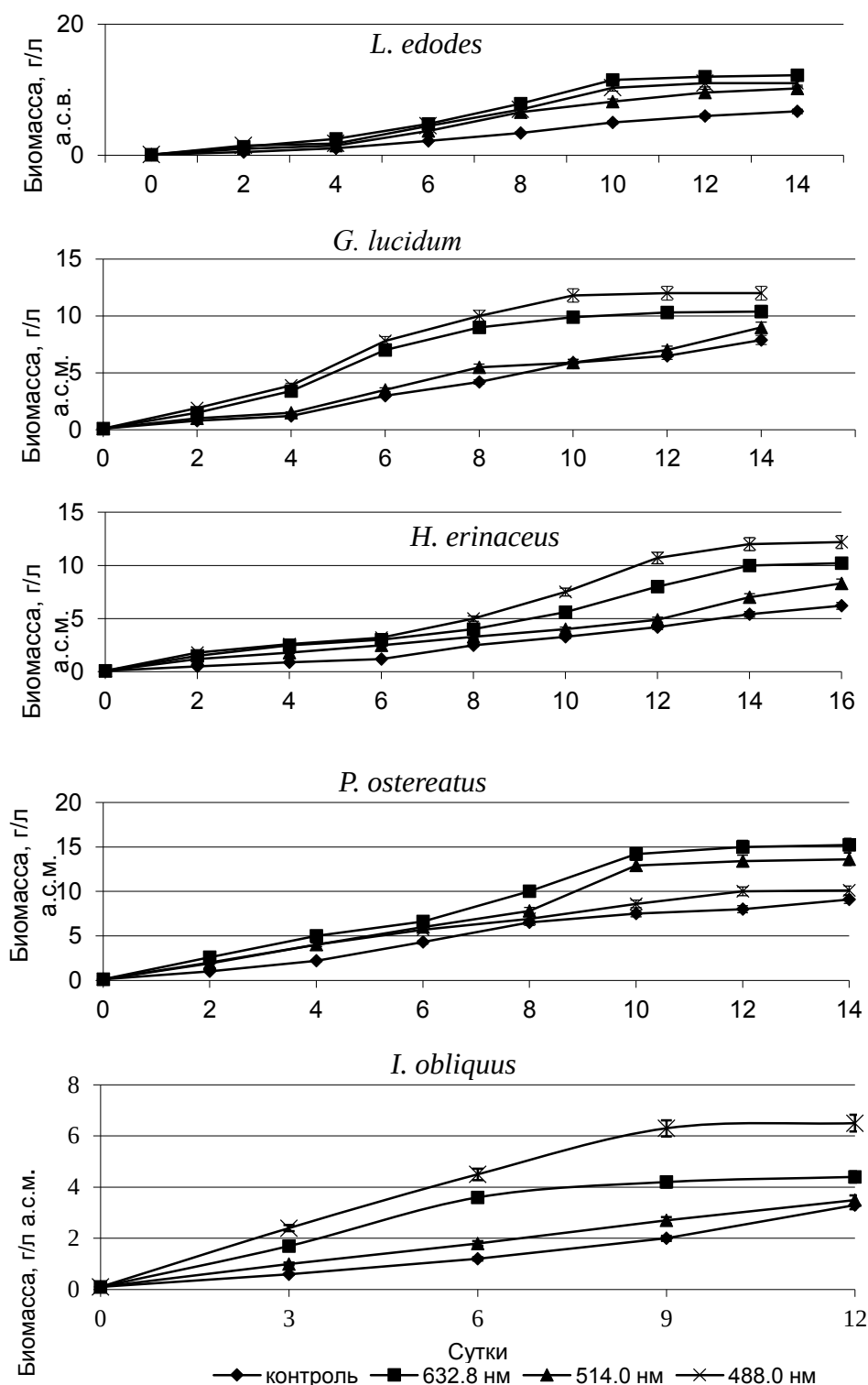


Рис.5.1. Динамика накопления биомассы при использовании фотоактивированного посевного материала

Таким образом, световая обработка позволяет значительно сократить сроки культивирования при получении биомассы мицелия.

Как показали исследования ученых, разрабатывавших технологии глубинного культивирования лекарственных макромицетов родов *Ganoderma* и *Lentinus*, увеличение количества биомассы, как правило, сопровождается увеличением синтеза как экзо- так и эндополисахаридов, [211; 214; 299; 528; 529; 588-591]. Поэтому мы предположили, что фотоиндуцированная стимуляция роста у макромицетов, относящихся к аско- и базидиомицетам, может сопровождаться увеличением синтеза полисахаридов.

5.2. Влияние облучения на синтез полисахаридов

Исследования возможности использования света низкой интенсивности для увеличения синтеза полисахаридов проводили в стационарных условиях на жидкой питательной среде. Объектами исследования были базидиомицеты *G. lucidum* и *L. edodes*, широко известных в настоящее время как продуценты полисахаридов [245; 543; 619; 623; 624; 627], а также аскомицеты *C. miliaris*, *C. sinensis*, *M. conica* и *M. esculenta*, как относительно новые объекты современных биотехнологий [15-17; 94-96; 124; 487; 522; 529; 566; 657].

Кордицепс в странах Восточной Азии считается самым лучшим и универсальным средством для укрепления организма и профилактики различных заболеваний. В народной медицине Китая, Японии, Кореи, Малайзии применяются *C. militaris*, *C. sinensis*, *C. sobolifera*, *C. ophioglossoides* и др. [359; 583; 615]. Лекарственные свойства этих грибов подтверждаются современными научными исследованиями [489]. Они содержат уникальный комплекс физиологически активных веществ: белки, незаменимые аминокислоты, липиды, ненасыщенные жирные кислоты, эргостерол, витамины В₁, В₂, В₁₂, Е и К, углеводы (моно-, ди-, олиго- и полисахариды), стеролы, нуклеозиды, макро- и микроэлементы (К, Na, Са, Mg, Fe, Cu, Mn, Zn, Se, Al, Ni и др.).

Биологическое действие кордицепса определяют, в первую очередь, иммуномодулирующие полисахариды, активирующие иммунные клетки,

увеличивающие продукцию цитокинов и интерферона, а также другие производные сахаров, такие как кордицепсовая кислота (D-маннитол). Противоопухолевое действие полисахаридов кордицепса, как и у других лекарственных грибов, связывают с повышением иммунитета организма, хотя механизм их действия полностью не изучен. Водные экстракты *S. militaris* и *S. sinensis* обладают противоопухолевой и иммуномодулирующей активностями *in vivo* и *in vitro* [398; 425; 501; 649; 650; 657]. В настоящее время все чаще используют метод глубинного культивирования этого гриба как наиболее экономичного для широкомасштабного получения его биомассы [359].

M. conica и *M. esculenta* (сморчки) содержат уникальный комплекс физиологически активных веществ: белки (до 25%), незаменимые аминокислоты (лизин, метионин, лейцин, изолейцин, треонин, валин), все витамины группы В, липиды, углеводы (моно-, ди-, олиго- и полисахариды), макро- и микроэлементы (К, Na, Ca, Mg, Fe, Cu, Mn, Zn и др.) [240; 287 ; 288; 294; 460 ; 526; 605; 646]. В последние годы активно ведутся работы по изучению биохимической характеристики различных полисахаридных фракций. Из плодовых тел *M. esculenta* получено две полисахаридные фракции, определены их молекулярный вес, структурные формулы, типы связей и степень разветвления. Установлено, что высокомолекулярный полисахарид – галактоманнан, который входит в состав плодовых тел *M. esculenta*, обладает высокой биологической активностью [287; 288]. Практическое использование некоторых видов рода *Morchella* тесно связано с получением грибного мицелия пищевого назначения на основе их глубинного культивирования. По мнению многих исследователей [297; 364; 431; 549] виды рода *Morchella* можно отнести к перспективным продуцентам не только пищевой биомассы, а также и различных биологически активных и ценных химических веществ, которые могут быть как конечным продуктом при культивировании мицелия этих грибов, так и побочным при промышленном производстве биомассы.

В целом, глубинному культивирования видов рода *Morchella*, по сравнению с другими макромицетами, уделяется значительно меньшее внимание. Нами впервые, наряду с традиционно изучаемыми факторами регуляции развития макромицетов, изучено влияние света на рост и синтез полисахаридов *M. conica* и *M. esculenta* [94; 109; 130; 134; 136].

Изучение образования полисахаридов грибами во всех вариантах опыта показало, что накопление биомассы и полисахаридов коррелируют у *G. lucidum* и *L. edodes* (табл. 5.1), что полностью подтверждает результаты других исследователей [211; 214; 299; 528; 529; 588-591]. Облучение посевного мицелия как когерентным, так и некогерентным светом низкой интенсивности во всех используемых диапазонах длин волн вызывало увеличение синтеза полисахаридов у этих грибов.

Таблица 5.1

**Влияние света низкой интенсивности на биосинтез полисахаридов
макромицетами**

Излучение, длина волны, нм	Биомасса, г/л	Полисахариды			
		экзо-, г/л	% изменения	эндо-, %	% изменения
1	2	3	4	5	6
<i>G. lucidum</i>					
Контроль, без облучения	6,9±0,2	4,6±0,1		7,6±0,2	
632,8	12,6±0,4	6,8±0,3*	47,9	12,3±0,1*	61,9
625,0	10,3±0,2	6,0±0,1*	30,4	12,2±0,2*	60,5
514,5	9,0±0,2	5,8±0,1	26,0	10,1±0,1*	32,9
522,0	8,7 ±0,2	5,5±0,2	19,6	9,8±0,3*	28,9
488,0	12,9±0,1	6,3±0,2*	43,7	12,6±0,3*	64,0
463,0	8,3±0,1	5,1±0,2*	10,8	12,0±0,2*	57,9
<i>L. edodes</i>					
Контроль, без облучения	6,3±0,1	3,2±0,1		5,2±0,1	
632,8	10,8±0,3*	4,5±0,2*	40,6	6,9±0,2*	32,7
625,0	8,1±0,2*	4,2±0,1*	31,3	6,6±0,3*	26,9
514,5	10,4±0,3*	4,6±0,3*	43,8	6,2±0,2*	19,2
522,0	7,6±0,2*	3,9±0,1*	18,8	5,9±0,1*	13,5
488,0	11,3±0,4*	4,8±0,3*	50,0	7,2±0,4*	38,5

Продолжение таблицы 5.1

1	2	3	4	5	6
463,0	9,2±0,2*	4,0±0,2*	25,0	7,0±0,3*	34,6
C. militaris					
Контроль, без облучения	5.3±0.1	2.6±0.2		9.0±0.2	
632,8	5.7±0.1*	1.8±0.1*	-30.8	9.5±0.2	5,6
625,0	5.5±0.2	1.7±0.2*	-34.6	9.1.±0.1	1,1
488,0	7.5±0.3*	2.0±0.1*	-23.0	9.1±0.2	1,1
463,0	6.2±01*	2.3±0.1	- 11,5	9.3±0.1	3,3
C. sinensis					
Контроль, без облучения	9.2±0.4	5.5±0.2		12.2±0.2	
632,8	10.6±0.3	3.8±0.1*	- 31,1	12.5±0.2	2,5
625,0	9.8±0.2	3.7±0.1*	-32,3	12.0±0.1	-1,6
488,0	11.5±0.2	3.5±0.1*	- 36,4	12.1±0.2	-0,8
463,0	10.8±0.3	3.3±0.1*	- 40,0	12.3±0.1	0,8
M. conica					
Контроль, без облучения	7,9 ± 0,2	3.7±0.3		Исследования не проводились	
632,8	9.4±0.3*	4.7±0.2*	27.0		
625,0	8,8 ± 0,1*	4,3 ± 0,2	16.2		
488,0	7.7±0.2	3.5±0.3	-5,5		
463,0	7.6±0.1	3,4 ± 0,4	-8,1		
M. esculenta					
Контроль, без облучения	6,0 ± 0,1	2,5 ± 0,1		Исследования не проводились	
632,8	7.8±0.4*	3.9± 0,3*	56,0		
625,0	6.6± 0,2*	2.9± 0,1*	16,0		
488,0	5,5 ± 0,3	2.3 ± 0,2	-8,0		
463,0	5,5 ± 0,3	2.2± 0,1	-12,0		

Примечание: * - обозначено статистически достоверные различия по отношению к контролю, ($p \leq 0,05$) результаты представлены как $M \pm n$ $n=4-5$

Облучение лазерным красным светом индуцировало увеличение синтеза экзополисахаридов на 17,5% больше у *G. lucidum*, чем при облучении LED в том же диапазоне длин волн, и на 32,9% при облучении синим лазерным светом. Не обнаружено достоверных отличий синтеза как экзо-, так и эндополисахаридов при облучении посевного мицелия этих

видов когерентным и некогерентным светом во всех остальных вариантах опыта. Таким образом, достоверное преимущество когерентного света, отмеченное при анализе ростовых характеристик (накопление биомассы) у *G. lucidum* и *L. edodes*, не сопровождается аналогичным увеличением синтеза эндополисахаридов. И только у *G. lucidum* облучение посевного мицелия когерентным синим и красным светом более эффективно, чем некогерентным светом, для стимуляции роста и синтеза полисахаридов.

Данные литературы об образовании полисахаридов и других БАВ *S. militaris* и *Cordyceps sinensis* при погруженном культивировании часто противоречивы. В качестве питательных сред используются полусинтетические или на основе мелассы. Процесс культивирования гриба достаточно длительный [280; 397]. Для повышения продуктивности этих макромицетов применялись различные способы: подбор и оптимизация состава питательных сред, добавление предшественников и активаторов биосинтеза БАВ, различные режимы аэрации [9; 15; 16; 151; 153; 155; 566]. Нами впервые изучена возможность использования света низкой интенсивности для регуляции синтеза полисахаридов этих грибов [127; 566].

Облучение светом низкой интенсивности в синем диапазоне длин волн аскомицетов *S. militaris* и *C. sinensis* индуцировало увеличение накопления биомассы, но не изменяло уровня синтеза эндополисахаридов и снижало накопление экзомеланинов на 30-40% при облучении светом всех длин волн. Похожую тенденцию обнаружили китайские ученые, которые изучали влияние дневного света и света, полученного от светодиодных источников в красном (620-630 нм) и синем диапазонах (440-450 нм) длин волн на рост и синтез кордиципина и аденозина при глубинном культивировании этого гриба [281]. В отличие от наших исследований глубинно культивируемый мицелий *S. militaris* подвергали световым воздействиям по 12 часов каждый день на протяжении 7 суток. Они также отмечали, что длина волны света оказывает значительное влияние на рост мицелия и метаболизм: красный свет в используемых режимах освещения был оптимальным для роста

мицелия и накопления аденозина, тогда как синий свет был оптимальным для синтеза кордицепина. Обобщая полученные данные, авторы рекомендуют выбирать режимы освещения в соответствии с целевым биоактивным компонентом.

Однако если в их исследованиях освещение красным светом увеличивало накопление биомассы на 23%, а синим снижало на 40%, то в наших исследованиях кратковременное облучение красным светом не влияло на рост этого гриба, а синим индуцировало увеличение накопления биомассы на 17-42%. Выявленные различия в полученных результатах, по-видимому, можно объяснить зависимостью фотоиндуцированной изменчивости метаболических путей от длительности световых воздействий. Кроме того, логично предположить, что чувствительность макромикетов к определенному диапазону длин волн может меняться не только на разных стадиях онтогенеза, но и зависеть от режимов световых воздействий на одной и той же фазе развития.

У *M. conica* и *M. esculenta* повышение активности роста и синтеза экзополисахаридов вызывало только облучение красным светом. В данном случае использование лазерного света вызвало больший стимулирующий эффект, чем использование некогерентного света LED источников. Облучение посевного мицелия у *M. conica* красным светом с длинами волн 632,8 нм и 625,0 (когерентный и некогерентный) увеличивало синтез экзополисахаридов на 27,0 и 16,2% соответственно, а у *M. esculenta* на 56,0 и 16,0%.

Ранее нами было установлено, что использование импульсного света низкой интенсивности в красном и синем диапазонах длин волн более эффективно для активации посевного мицелия *C. militaris*, *G. lucidum* и *L. edodes* с целью увеличения накопления биомассы. Использование красного импульсного света было более эффективным для стимуляции роста *M. conica* и *M. esculenta*. Исходя из этих данных, мы предположили, что облучение им

может вызвать дополнительную стимуляцию синтеза полисахаридов этими грибами.

Для проверки этого предположения нами было проведено облучение импульсным красным когерентным светом посевного мицелия этих макромицетов. Этот режим обработки был выбран потому, что его использование было эффективным для активации роста всех указанных видов. Результаты использования активированного таким образом инокулюма при глубинном культивировании представлены на рисунке 5.2.

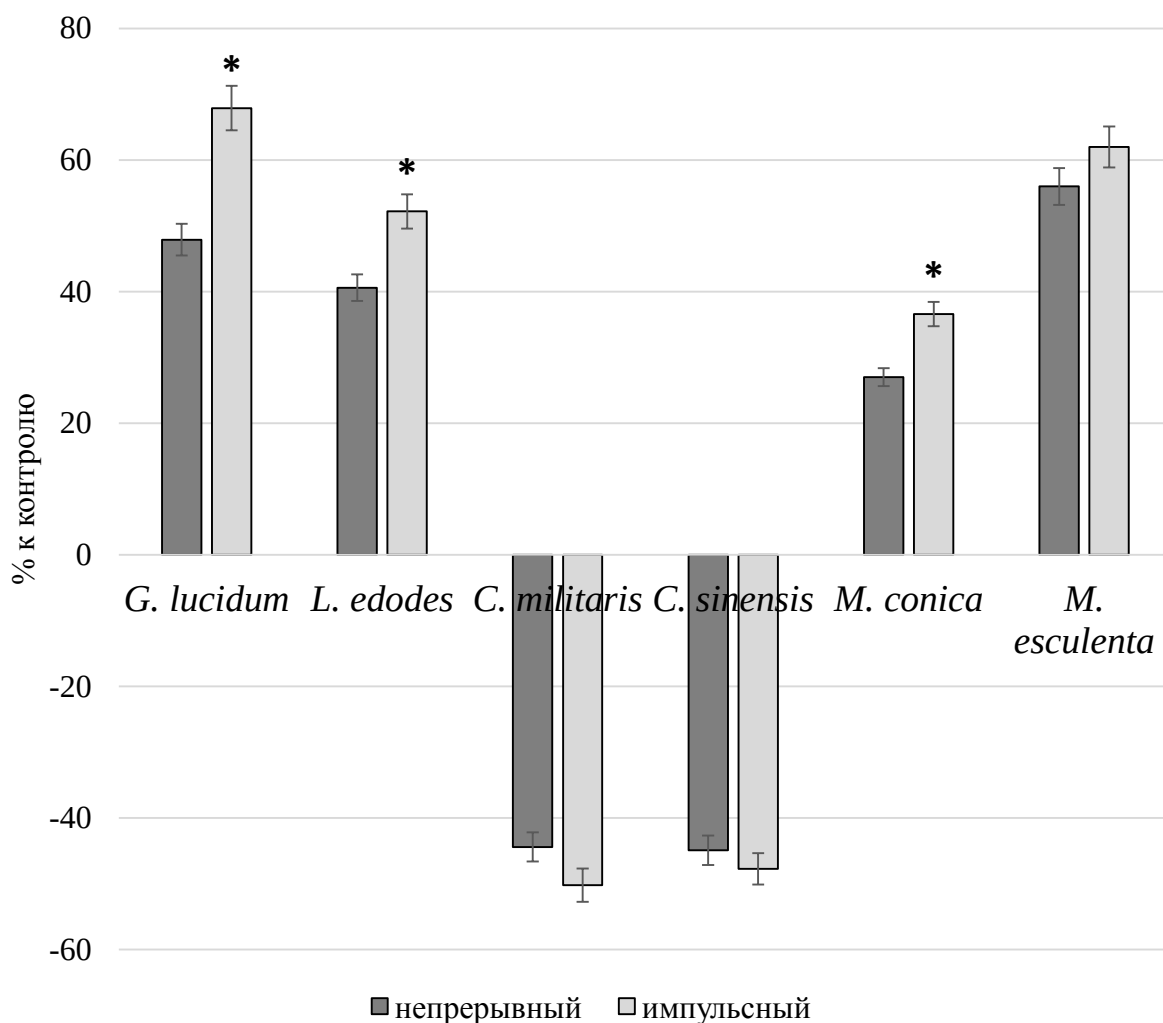


Рис. 5.2. Влияние природы света на синтез экзополисахаридов

Примечание: * - обозначено статистически достоверные различия по отношению к облучению непрерывным светом, ($p \leq 0,05$) результаты представлены как $M \pm n$ $n=4-5$

Импульсный свет оказался более эффективным, чем непрерывный той же длины волны и когерентности, для стимуляции синтеза экзополисахаридов у *G. lucidum*, *L. edodes*, *M. conica*. У *C. militaris* и *C. sinensis* он так же угнетал синтез полисахаридов, как и непрерывный.

Таким образом, облучение посевного мицелия *G. lucidum* и *L. edodes* низкоинтенсивным светом во всех используемых в работе диапазонах длин волн и когерентности увеличивало как интенсивность роста, так и синтез полисахаридов. Наибольшей стимулирующей активностью обладало НИЛИ в красном и синем диапазоне длин волн. Анализ результатов накопления полисахаридов при использовании активированного посевного мицелия показал, что эффективность когерентного света была на 10-30% выше, чем некогерентного.

У *C. militaris* и *C. sinensis* увеличение биомассы после облучения в изученных режимах не коррелировало с накоплением полисахаридов. Уровень синтеза эндополисахаридов оставался неизменным, а экзополисахаридов снижался на 30-63%.

Для *M. conica* и *M. esculenta* наиболее эффективным для повышения активности роста и синтеза экзомеланинов является облучение красным светом. В данном случае использование лазерного света также вызвало больший стимулирующий эффект, чем использование некогерентного света LED источников.

Использование импульсного света вызывало дополнительную активацию биосинтетической активности у видов макромицетов, чувствительных к положительной фотоиндукции.

5.3. Влияние облучения на углеводный состав полисахаридов *G. lucidum*, *L. edodes* и *C. militaris*

Согласно информации об исследованиях, проводимых на этих видах макромицетов другими исследователями [8; 10; 11; 13; 14; 23; 160; 191; 211;

213; 214; 566], оптимизация условий образования полисахаридов не оказала существенного влияния на их углеводный состав. Как при выращивании грибов на контрольной среде, так и на подобранных специально средах экзо- и эндополисахариды *G. lucidum* и *L. edodes* являлись гетерогликанами, основной мономер которых представлен глюкозой. Полисахариды *G. lucidum* 362 оказались преимущественно глюканами, в то время как полисахариды *G. lucidum* 171 – гетерогликанами, состоящими из глюкозы, галактозы и незначительных количеств маннозы. Выращивание этого гриба на оптимизированной среде приводило к снижению галактозы в экзополисахаридах и увеличению её в 2 раза в эндополисахаридах. Установлено, что содержание глюкозы в эндо- и экзополисахаридах каждого вида варьировало незначительно. Экзополисахариды *L. edodes* отличались от эндополисахаридов значительно меньшим содержанием (в 2 раза) маннозы и галактозы.

Как следует из наших данных, представленных в таблице 5.2, полисахариды используемых в работе *G. lucidum* и *L. edodes* также являются гетерогликанами, основным мономером которых служит глюкоза, кроме того, присутствуют манноза и галактоза, что полностью согласуется с вышеуказанными данными других авторов.

На углеводный состав полисахаридов влиял способ культивирования макромицетов на жидкой среде. При глубинном культивировании *G. lucidum* содержание глюкозы в экзополисахаридах было в 2 раза выше, чем при стационарном культивировании на той же среде, а галактозы и маннозы в три раза меньше (табл. 5.2). Облучение в исследованных нами режимах существенно влияло на углеводный состав экзополисахаридов как в стационарной культуре, так и при глубинном культивировании *G. lucidum*. Облучение инокулюма низкоинтенсивным лазерным светом 632,8 нм и 488,0 нм способствовало увеличению процентного содержания в

экзополисахаридах галактозы и глюкозы и значительному уменьшению маннозы в стационарной культуре гриба на жидкой среде. При глубинном культивировании *G. lucidum* на такой же среде облучение инокулюма в аналогичных режимах, напротив, приводит к уменьшению содержания галактозы и глюкозы и значительному увеличению маннозы. Это позволяет допустить, что трансформация световой энергии, которая была поглощена грибными клетками, в значительной мере определяется последующими условиями выращивания гриба.

Таблица 5.2

Влияние облучения на состав углеводов в экзополисахаридах *G. lucidum*

Режим облучения	Углеводы, %			
	галактоза	манноза	ксилоза	глюкоза
Стационарная культура на жидкой среде				
контроль	33,4	27,4	Сл.	40,2
632,8 нм	47,0	11,5	-	41,5
488,0 нм	49,1	8,2	-	42,7
514,5 нм	39,9	17,8	-	42,3
Глубинное культивирование				
контроль	10,9	8,3	-	81,7
632,8 нм	8,9	41,1	-	50,0
488,0 нм	8,1	38,3	-	53,6
514,5 нм	10,7	9,5	-	79,8

Как следует из данных, представленных в таблице 5.3, внутриклеточные полисахариды *G. lucidum* по своему моносахаридному составу довольно близки к внеклеточным и облучение индуцирует аналогичные изменения их углеводного состава как при поверхностном, так и при глубинном культивировании.

Таблица 5.3

Влияние облучения на состав углеводов в эндополисахаридах *G. lucidum*

Режим облучения	Углеводы, %			
	галактоза	манноза	ксилоза	глюкоза
Стационарная культура на жидкой среде				
контроль	38,0	11,7	Сл.	50,3
632,8 нм	43,5	5,5	-	51,0
488,0 нм	47,1	3,1	-	49,8
514,5 нм	40,0	7,8	-	52,3
Глубинное культивирование				
контроль	12,0	3,3	-	84,7
632,8 нм	6,4	26,1	-	67,5
488,0 нм	7,1	19,3	-	73,6
514,5 нм	11,7	5,8	-	82,5

Аналогичные изменения углеводного состава полисахаридов мы наблюдали при поверхностном и глубинном культивировании *L. edodes*. Также, как и у *G. lucidum*, при глубинном культивировании как эндо-, так и экзополисахариды содержали значительно больше глюкозы и соответственно меньше маннозы и галактозы (табл 5.4). Облучение во всех диапазонах длин волн не вызывало значительных изменений количества глюкозы в стационарной культуре и снижало в глубинной, но не столь значительно по сравнению с *G. lucidum*.

Таблица 5.4

Углеводный состав внеклеточных полисахаридов *L. edodes*

Режим облучения	Углеводы, %		
	галактоза	манноза	глюкоза
Стационарная культура на жидкой среде			
контроль	25,3	19,1	56,6
632,8 нм	30,1	9,4	60,5
488,0 нм	31,2	9,4	59,5
514,5 нм	28,0	10,5	61,5
Глубинное культивирование			
контроль	4,6	7,4	88,8
632,8 нм	3,8	16,0	80,2
488,0 нм	3,2	14,1	82,7
514,5 нм	3,6	17,4	79,0

При изучении изменения состава углеводов в эндополисахаридах *L. edodes* после облучения посевного мицелия наблюдались те же тенденции, что и у *G. lucidum* (табл. 5.5).

Таблица 5.5

Углеводный состав внутриклеточных полисахаридов *L. edodes*

Режим облучения	Углеводы, %		
	галактоза	манноза	глюкоза
1	2	3	4
Стационарная культура на жидкой среде			
контроль	28,7	32,2	39,1
632,8 нм	39,5	18,5	42,0
488,0 нм	33,4	26,2	40,4
514,5 нм	40,5	21,1	37,9

Продолжение таблицы 5.5

1	2	3	4
Глубинное культивирование			
контроль	10,5	14,0	75,5
632,8 нм	7,0	37,3	55,7
488,0 нм	6,5	33,2	50,3
514,5 нм	7,3	39,4	53,3

В настоящее время известно, что полисахариды мицелия и плодовых тел *C. militaris* содержат α -(1→4)-D-гликозидные связи в главной цепи и α -(1→6)- в ответвлениях, средняя молекулярная масса полисахаридов – $5,0 \times 10^3 - 1,3 \times 10^4$ [649; 650], внутриклеточные полисахариды *C. militaris* являются пептидогликанами, молекулярной массой 20-1000 кДа, имеющими в своей структуре α - и β -гликозидные типы связей. По углеводному составу эндополисахариды - гетерогликаны с основными мономерами глюкозой, маннозой и галактозой.

По данным Wu Y., полисахариды мицелия *C. sinensis* (кордиглюканы), экстрагируемые горячей водой и 0,05 М NaOH, содержат β -(1→3)-D-гликозидные связи, а экзополисахариды имеют β -(1→3)-D-гликозидные связи в главной цепи и β -(1→4)- связи в ответвлениях [634].

Внеклеточные полисахариды *C. militaris* являются пептидогликанами с молекулярной массой 20-1000 кДа. По углеводному составу они – гетерогликаны с основным мономером глюкозой. Исследование спектральной характеристики позволило установить в их структуре наличие α - и β -гликозидных типов связей [15; 16; 150-153]. В отличие от полисахаридов, синтезируемых высшими базидиомицетами и являющихся преимущественно глюканами, на углеводный состав полисахаридов *C.*

militaris значительно влияют условия культивирования. При погруженном культивировании в условиях постоянного перемешивания питательной среды в полисахаридах присутствует примерно равное количество глюкозы и маннозы и в 2 раза меньшее – галактозы.

Нами также установлено варьирование углеводного состава эндополисахаридов в зависимости от условий культивирования и облучения лазерным светом различных длин волн (табл. 5.6). В контрольном образце, при глубинном культивировании в полисахаридах, полученных из биомассы, содержание глюкозы в 2 раза ниже, чем маннозы и галактозы, по сравнению с мицелием, выращенным в стационарных условиях. Облучение красным светом посевного мицелия и последующее его поверхностное культивирование на жидкой среде приводило к значительному снижению в эндополисахаридах содержания маннозы и галактозы (12,64 и 9,06%, соответственно), а полисахариды из образца, облученного синим светом, на 99,5% состояли из глюкозы.

Таблица 5.6

Углеводный состав внутриклеточных полисахаридов *C. militaris*

Режим облучения	Углеводы, %		
	галактоза	манноза	глюкоза
Стационарная культура на жидкой среде			
контроль	45,3	36,1	18,6
632,8 нм	9,1	12,6	78,3
488,0 нм	0,2	0,3	99,5
Глубинное культивирование			
контроль	21,2	38,5	40,3
632,8 нм	29,0	20,4	50,6
488,0 нм	33,4	10,3	56,3

При динамическом культивировании *L. edodes* на той же среде мы также наблюдали увеличение в эндополисахаридах глюкозы и снижение

маннозы после облучения в указанных режимах. Однако, при этом режиме культивирования в опытных образцах отмечалось увеличение количества галактозы (на 57,5 и 37,45%).

По углеводному составу внеклеточный полисахарид *C. militaris* (табл. 5.7) является гетерогликаном. Хроматографический анализ выявил в нем наличие тех же углеводов, что и во внутриклеточных полисахаридах, но в несколько другом соотношении. При глубинном культивировании преобладающим мономером экзополисахарида являлась глюкоза, содержание которой (64,1%) оказалось в 1,5 раза выше, чем у эндополисахарида в мицелии, выращенном тем же методом (40,3%). Также присутствуют манноза (21,23%) и галактоза (14,7%).

Таблица 5.7

Углеводный состав внеклеточных полисахаридов *C. militaris*

Режим облучения	Углеводы, %		
	галактоза	манноза	глюкоза
Стационарная культура на жидкой среде			
контроль	35,5	26,0	38,5
632,8 нм	47,3	12,4	40,3
488,0 нм	37,5	18,3	44,2
Глубинное культивирование			
контроль	14,7	21,2	64,1
632,8 нм	9,1	46,4	45,5
488,0 нм	9,1	40,0	50,9

Анализ состава углеводов экзополисахаридов, полученных после облучения посевного материала *C. militaris* в указанных режимах, показал незначительное увеличение глюкозы и галактозы при поверхностном культивировании и напротив уменьшение при глубинном культивировании глюкозы на 40,9 и 25,9%, а галактозы на 61,55. Соответственно меняется и

количество маннозы – уменьшается при стационарном культивировании и увеличивается при динамическом.

Полисахариды *C. sinensis* также являются гетерогликанами и включают в качестве основных мономеров глюкозу, маннозу и галактозу (табл.5.8). Полученные нами результаты исследования углеводного состава экзо- и эндополисахаридов показали, что, как по качественному составу, так и количественному соотношению, они близки к результатам, полученным на этом объекте другими исследователями [155; 529; 566].

Таблица 5.8

Углеводный состав внеклеточных полисахаридов *C. sinensis*

Режим облучения	Углеводы, %		
	галактоза	манноза	глюкоза
Стационарная культура на жидкой среде			
контроль	23,1	60,3	46,6
632,8 нм	35,2	10,7	53,7
488,0 нм	32,2	22,3	55,5
Глубинное культивирование			
контроль	23,1	60,3	16,6
632,8 нм	7,8	77,7	14,5
488,0 нм	6,9	82,4	10,7

В отличие от изученных нами ранее макромицетов, у которых преобладающим мономером при глубинном культивировании была глюкоза, у *C. sinensis* в контрольных образцах, как при стационарном, так и при динамическом режимах культивирования, наиболее высоким в полисахаридах мицелия и культуральной жидкости было содержание маннозы. При культивировании облученного мицелия поверхностно содержание глюкозы и галактозы в экзополисахаридах увеличивалось, количество маннозы уменьшалось. В глубинной культуре, при использовании в качестве инокулюма мицелия, активированного в тех же

режимах, отмечалось снижение глюкозы и галактозы и увеличение на 28,9% - 36,7% маннозы.

Динамика изменения углеводного состава внутриклеточных полисахаридов *C. sinensis* после облучения при стационарном культивировании была аналогична *C. militaris*. При использовании света 488,8 нм для активации инокулюма содержание глюкозы увеличивалось более, чем в 3 раза на фоне снижения галактозы и маннозы (табл. 5.9). При глубинном культивировании количество глюкозы увеличивалось более значительно – в 3,3 раза после облучения красным НИЛИ и в 8,9 раз после облучения синим. Эти изменения сопровождались снижением уровня маннозы и увеличения галактозы.

Таблица 5.9

Углеводный состав внутриклеточных полисахаридов *C. sinensis*

Режим облучения	Углеводы, %		
	галактоза	манноза	глюкоза
Стационарная культура на жидкой среде			
контроль	40,3	40,3	28,1
632,8 нм	27,2	27,2	50,3
488,0 нм	5,6	5,6	90,8
Глубинное культивирование			
контроль	10,8	81,6	7,6
632,8 нм	17,2	57,5	25,3
488,0 нм	14,4	17,7	67,9

Таким образом, нами установлено, что кратковременное облучение посевного мицелия низкоинтенсивным светом значительно влияет на процентное соотношение углеводов как в экзо-, так и эндополисахаридах у изученных нами представителей макромицетов, принадлежащих к аско- и

базидиомицетам. Зависимость этого показателя от способа культивирования подтверждает полученные нами ранее данные, что трансформация световой энергии, которая была поглощена грибными клетками, в значительной мере определяется последующими условиями выращивания гриба [раздел 4, 134; 136]. На наш взгляд, такая зависимость не является уникальной, присущей только отдельным организмам.

Сравнительный анализ изменений углеводного состава полисахаридов у макромицетов, относящихся к базидиомицетам и аскомицетам, позволил выявить значительные различия в их динамике под действием кратковременных НИЛИ и отличия между видами, принадлежащих к разным систематическим группам (табл. 5.10).

Таблица 5.10

Сравнительный анализ изменений углеводного состава полисахаридов у разных видов макромицетов после облучения

Вид		Полисахариды	Способ культивирования					
			поверхностное			глубинное		
			галактоза	манноза	глюкоза	галактоза	манноза	глюкоза
Базидиомицеты	<i>G. lucidum</i>	Экзо-	Λ	∇	—	∇	Λ	∇
		Эндо-	Λ	∇	—	∇	Λ	∇
	<i>L. edodes</i>	Экзо-	Λ	∇	—	∇	Λ	∇
		Эндо-	Λ	∇	—	∇	Λ	∇
Аскомицеты	<i>C. militaris</i>	Экзо-	Λ	∇	Λ	∇	Λ	∇
		Эндо-	∇	∇	Λ	Λ	∇	Λ
	<i>C. sinensis</i>	Экзо-	Λ	∇	Λ	∇	Λ	∇
		Эндо-	∇	∇	Λ	∇	∇	Λ

Примечание: (Λ) – увеличение количества углевода; (∇) – уменьшение количества углевода; (—) – отсутствие достоверных изменений

Представленные виды, согласно характеру фотоиндуцированного изменения соотношения их основных мономеров в полисахаридах можно четко разделить на две группы – *G. lucidum* и *L. edodes* (базидиомицеты) и *C. sinensis* и *C. militaris* (аскомицеты).

У базидиомицетов *Ganoderma lucidum* и *Lentinus edodes* фотоиндуцированная активность посевного мицелия при поверхностном культивировании проявляется в увеличении в полисахаридах процентного содержания галактозы и снижении уровня маннозы, а при глубинном культивировании наоборот. У аскомицетов *Cordyceps militaris* и *C. sinensis* основные отличия от представителей базидиомицетов на аналогичные режимы световых воздействий проявляются на уровне эндополисахаридов, что выражается в уменьшении доли галактозы при поверхностном культивировании и маннозы - при глубинном.

Полученные нами результаты демонстрируют перспективность использования низкоинтенсивного света в красном и синем диапазонах длин волн для целенаправленной регуляции углеводного состава в полисахаридах, синтезируемых макромицетами. В то же время, выявленные нами различия в фоточувствительности синтеза углеводов у представителей двух разных таксонов диктует необходимость дальнейшего поиска более эффективных режимов фотостимуляции, в данном случае для представителей аскомицетов *C. sinensis* и *C. militaris*.

5.4. Влияние облучения на жирнокислотный состав липидов *G. lucidum*, *C. sinensis* и *C. militaris*

В зависимости от физиологической принадлежности способность макромицетов к синтезу липидов различна. Так, например, было отмечено, что содержание липидов в мицелии гриба *Laetiporus sulphureus* (бурая гниль) при культивировании его на среде с сахарозой может достигать 57% [491], что позволяет отнести его к истинным липидным продуцентам.

По сравнению с грибами бурой гнили, грибы белой гнили, к числу которых относятся и лекарственные грибы *L. edodes* и *G. lucidum*, синтезируют меньшее количество липидов (5-10% от абсолютно сухой биомассы). В то же время для липидов грибов этой физиологической группы характерно очень высокое (более 40 %) содержание фосфолипидов (ФЛ) в плодовом теле и в глубинном мицелии [18; 35; 36; 69-72; 192; 383]. В липидах глубинного мицелия *G. lucidum* и *C. militaris* нейтральные липиды составляют 62,0-73,0%, полярные – 27,0-38,0%. В составе нейтральных липидов количественно преобладают триацилглицерины, полярных – фосфатидилхолин, фосфатидилэтаноламин и кардиолипин. Установлена высокая антиоксидантная активность липидов исследуемых грибов, что связано с присутствием в них низко- и высокомолекулярных фенольных и липофильных соединений, в т. ч. пигментов, нейтральных и фосфолипидов.

В составе липидов базидиальных грибов обнаружены те же жирные кислоты, которые встречаются и у других эукариотных организмов. Жирнокислотный состав липидов представлен гомологичными сериями насыщенных и ненасыщенных кислот с 12-18 атомами углерода в цепочке. Преобладающими среди ненасыщенных жирных кислот, как правило, является линолевая ($C_{18:2}$) (от 30-40% и более от суммы кислот) и олеиновая ($C_{18:1}$) (10-20 %) кислоты, необходимые для синтеза простагландинов, а среди насыщенных – пальмитиновая ($C_{16:0}$) (20 – 30 % от общей суммы кислот). Что же касается других кислот, то они содержатся в незначительном количестве [648].

У многих микроорганизмов, способных адаптироваться к действию определенных экологических факторов, в частности, различного режима освещения, высоких и низких температур, загрязнения почвы тяжелыми металлами, наблюдаются соответствующие изменения жирнокислотного состава клеточных липидов. Это обусловлено изменениями в проницаемости их мембран, метаболизме жирных кислот и активности перекисных процессов [175-177; 179; 463; 574; 631]. Кроме того, особенности

жирнокислотного профиля у многих микромицетов при воздействии определенных факторов окружающей среды являются дополнительным хемотаксономическим признаком [463; 574]. Согласно данным литературы, подавляющее большинство (80% - 90%) радиационных повреждений происходит опосредованно через стимуляцию свободнорадикальных процессов, включая изменения в содержании насыщенных и ненасыщенных жирных кислот как в мембранах, так и в запасных веществах клеток различных групп микроорганизмов [27].

В литературе имеются данные о повышении степени ненасыщенности клеточных липидов у гифомицетов при действии определенных абиотических факторов [73; 175; 176; 309; 494].

В то же время есть сведения и о снижении этого параметра при росте грибов в условиях низких температур, то есть не всегда высокий уровень антропогенной нагрузки приводит к формированию адаптации в виде повышения степени ненасыщенности клеточных липидов [176].

Однако, в литературе практически отсутствуют аналогичные данные о влиянии различных экологических, в том числе антропогенных факторов на липидный обмен и жирнокислотный состав макромицетов.

В настоящее время известно, что величина конечного эффекта кратковременного НИЛИ зависит от изначального физиологического состояния облучаемого объекта, которое определяется его редокс-потенциалом (смещение в сторону более окисленного состояния связано со стимуляцией жизнедеятельности клетки, в сторону более восстановленного состояния – связано с её подавлением). Вследствие светового воздействия происходит нормализация редокс-потенциала клетки [77]. Эффект облучения является тем более выраженным, чем больше редокс-потенциал клетки отодвинут в восстановленную сторону. При этом одним из важных компонентов окислительно-восстановительной системы клетки являются ненасыщенные жирные кислоты клетки, которые являются субстратом для дополнительного создания свободных радикалов в клетке под действием

облучения. Исходя из вышесказанного, мы выдвинули гипотезу, состоящую в том, что одним из механизмов, обеспечивающих способность грибов к фоторецепции света разного типа, являются соответствующие изменения в их жирнокислотном профиле и в степени ненасыщенности клеточных липидов.

Чтобы проверить это предположения, нами проведено исследование жирнокислотного профиля *C. militaris*, *C. sinensis* и *G. lucidum*, которые входят в число перспективных объектов современной биотехнологии.

По данным белорусских исследователей, липиды аскомицета *C. militaris* по жирнокислотному составу отличаются от таковых базидиальных грибов более низким содержанием линолевой кислоты. Процентное содержание жирных кислот значительно варьировало в зависимости от условий выращивания, состава питательной среды и режимов лазерного облучения. При глубинном культивировании с перемешиванием среди жирных кислот преобладали олеиновая ($C_{18:1}$), пальмитиновая ($C_{16:0}$) и линолевая ($C_{18:2}$) [17; 18]. В наших исследованиях при стационарном культивировании (табл. 5.11) наблюдалось более высокое содержание диеновой линолевой кислоты (48,35-65,2%). Коэффициент ненасыщенности липидов (контрольный образец) был выше в среднем в 1,7 раз по сравнению с данными, полученными этими авторами.

Анализ жирнокислотного состава липидов мицелия *C. militaris* свидетельствует о значительном увеличении содержания насыщенных жирных кислот - пальмитиновой (на 55-58%) и гептадекановой (на 65-156 %), и ненасыщенной - пальмитолеиновой (в 6,3-6,7 раз) после его облучения как красным, так и синим светом. Как положительное изменение можно рассматривать значительное увеличение пальмитолеиновой кислоты, которая обладает антимикробными свойствами в отношении грамположительных микроорганизмов, таких как золотистый и эпидермальный стафилококки, и является неотъемлемой составляющей себума (кожного сала) [451].

Таблица 5.11

Жирнокислотный состав липидов мицелия *C. militaris*

Кислота	Контроль	632,8 нм	488,0 нм
C _{14:0}	сл.	сл.	сл.
C _{15:0}	сл.	сл.	сл.
C _{16:0}	14,84	23,42	23,02
C _{16:1}	0,43	2,89	2,71
C _{17:0}	0,34	0,87	0,56
C _{18:0}	5,37	6,17	5,04
C _{18:1}	12,36	17,10	13,61
C _{18:2}	65,20	48,35	53,34
C _{18:3}	1,46	1,20	1,72
$\sum_1$ ненасыщенных	79,45	69,54	71,38
$\sum_2$ насыщенных	20,55	30,46	28,62
$\sum_1/\sum_2$	3,87	2,28	2,49
К ненасыщенности	1,48	1,20	1,28

Жирнокислотный состав этого гриба более чувствителен к красному свету. В тоже время облучение мицелия привело к снижению в составе липидов содержания полиненасыщенной линолевой кислоты (на 18-26 %), которая доминирует как у исследуемого *C. militaris*, так и в большинстве культивируемых ксилотрофных съедобных видов грибов с лекарственными свойствами – *Pleurotus ostreatus*, *Lentinus edodes* и др. В целом увеличение в составе липидов после облучения мицелия насыщенных жирных кислот и уменьшение ненасыщенных привело к снижению коэффициента ненасыщенности жирных кислот на 14-20 %.

Среди жирных кислот *C. sinensis* преобладали олеиновая (40,76-66,99%), пальмитиновая (23,81-37,14%) и линолевая (6,67-25,59%), что совпадает с данными полученными другими исследователями [90].

Облучение синим светом посевного мицелия значительно увеличивало содержание пальмитиновой кислоты (на 37,0%), а красным – олеиновой (на 64,2%) (табл. 5.12). В отличие от *C. militaris* у этого макромикета облучение в 1,9 – 4,2 раза снижало содержание пальмитолеиновой кислоты, стеариновой в 2,6-3,0 раза и линолевой в 2,2-3,8 раза. Однако, здесь мы наблюдали ту же тенденцию - облучение приводит к снижению коэффициента ненасыщенности жирных кислот (18-24 %).

Таблица 5.12

Жирнокислотный состав липидов мицелия *C. sinensis*

Кислота	Контроль	632,8 нм	488,0 нм
C _{14:0}	сл.	0,35	-
C _{15:0}	сл.	-	-
C _{16:0}	27,21	23,81	37,14
C _{16:1}	1,65	0,87	0,39
C _{17:0}	сл.	0,06	0
C _{18:0}	3,26	1,25	1,09
C _{18:1}	40,76	66,99	49,3
C _{18:2}	25,59	6,67	12,08
C _{18:3}	1,53	-	-
Σ_1 ненасыщенных	69,53	74,53	61,77
Σ_2 насыщенных	30,47	25,47	38,23
Σ_1/Σ_2	2,28	2,93	1,62
К ненасыщенности	0,98	0,81	0,74

Анализ жирнокислотного состава липидов мицелия *G. lucidum* также как и у *C. militaris* показал значительное увеличение содержания пальмитиновой кислоты (на 39,6-79,4%) и снижение линолевой кислоты (8,6-30,8%) (табл. 5.13). Однако количество гептодекановой значительно уменьшается при облучении красным светом и практически не меняется под

воздействием синего света. В отличие от *C. militaris*, у которого облучение в красном и синем диапазонах длин волн вызывало увеличение пальмитолеиновой кислоты, у *G. lucidum* не наблюдалось значительного изменения её количества. У этого вида макромикета мы наблюдаем ту же тенденцию – кратковременное воздействие низкоинтенсивного света на вегетативный мицелий приводит к увеличению в составе липидов насыщенных жирных кислот и уменьшения ненасыщенных (на 10-12 %).

Таблица 5.13

Жирнокислотный состав липидов мицелия *G. lucidum*

Кислота	Контроль	632,8 нм	488,0 нм
C _{14:0}	0,09	сл.	0,07
C _{15:0}	0,31	0,46	0,88
C _{16:0}	9,93	13,87	17,81
C _{16:1}	1,15	1,18	0,99
C _{17:0}	0,20	сл.	0,24
C _{18:0}	0,47	5,98	0,49
C _{18:1}	7,21	2,23	11,50
C _{18:2}	80,64	74,28	68,51
Σ ₁ ненасыщенных	89,0	77,69	81,0
Σ ₂ насыщенных	11,0	22,31	19,0
Σ ₁ /Σ ₂	8,09	3,5	4,3
К ненасыщенности	1,69	1,51	1,49

Ненасыщенные жирные кислоты являются важными физиологически активными компонентами, функция которых заключается в уменьшении содержания липидов в крови и защите от сердечно-сосудистых заболеваний. И хотя в наших исследованиях во всех вариантах опытов облучение приводит к снижению коэффициента ненасыщенности, содержание

ненасыщенных жирных кислот остается выше насыщенных, что является важным при создании на основе этих грибов коммерческих препаратов [90].

Кроме этого нельзя не отметить положительной динамики в сторону увеличения полиненасыщенной пальмитолеиновой кислоты после облучения посевного мицелия *C. militaris* красным и синим светом, и мононенасыщенной незаменимой олеиновой кислоты у *C. sinensis* после облучения красным светом. Это дает основания утверждать, что свет низкой интенсивности может успешно использоваться в биотехнологиях глубинного культивирования макромицетов с целью целенаправленной регуляции синтеза жирных кислот, имеющих практическое значение для медицины, косметологии и др. областей промышленности. Однако для этого необходимы дальнейшие исследования по установлению эффективных режимов облучения, учитывающих специфические особенности фоточувствительности продуцента.

Полученные данные дают основания предположить существование у макромицетов некоторых общих механизмов адаптации к световым воздействиям через соответствующие изменения жирнокислотного состава клеточных липидов, что обусловлено изменениями в проницаемости их мембран, метаболизме жирных кислот и активности перекисных процессов.

В связи с этим, представляло, как научный, так и практический интерес, изучить влияние кратковременного светового воздействия низкой интенсивности на биохимический состав *G. lucidum* и *C. militaris*, в качестве примера.

5.5. Влияние облучения на физиологически активные соединения *G. lucidum* и *C. militaris*

В таблицах 5.14 и 5.15 приведены биохимический состав контрольного и опытных образцов мицелия *G. lucidum* и *C. militaris*, выращенных в условиях стационарной культуры (без перемешивания). Как следует из полученных данных, облучение обоих видов не приводило к значительному изменению общего содержания углеводов, однако влияло на синтез полисахаридов. Воздействие красного света приводило к небольшому повышению содержания белка и липидов. По сравнению с контролем в облученных образцах несколько снижалось количество фосфолипидов, общих фенольных соединений и антиоксидантная активность.

Таблица 5.14

Физиологически активные соединения *C. militaris*

Показатели	Контроль	632,8 нм	488 нм
Общее содержание углеводов, % от АСБ	40,0±2,5	42,3±1,2	41,7±3,0
Эндополисахариды, % от АСБ	13,2±0,4	13,5±0,6	13,3±1,9
Экзопполисахариды, г/л	5,5±0,5	3,8±0,3*	3,5±0,4*
Общий белок, % от АСБ	30,6-32,0	34,2	32,1-32,8
Общие липиды, % от АСБ	11,2±0,9	12,2±1,3	10,2±1,5
Фосфолипиды, % от АСБ	3,0±0,3	2,4±0,2	1,8±0,1*
Общие фенольные соединения, мг%	1500-1570	1350-1370	1200-1290
Антиокислительная активность, % от ионола	87,3	83,6-84,0	80,0-83,6

Примечание: * - обозначено статистически достоверные различия по отношению к контролю, ($p \leq 0,05$) результаты представлены как $M \pm n$ $n=4-5$

Таблица 5.15

Физиологически активные соединения *G. lucidum*

Показатели	Контроль	632,8 нм	488 нм
Общее содержание углеводов, % от АСБ	35,6±2,1	44,4±03,3*	42,8±2,4*
Эндополисахариды, % от АСБ	7,6±0,2	12,3±0,1*	12,6±0,3*
Экзопполисахариды, г/л	4,6±0,1	6,8±0,3*	6,3±0,2*
Общий белок, % от АСБ	24,0-27,0	31,2	30,1-32,8
Общие липиды, % от АСБ	8,5±0,1	10,8 ±0,2*	12,2±0,3*
Фосфолипиды, % от АСБ	6,0±0,2	4,3±0,1	5,1±0,2*
Общие фенольные соединения, мг%	1250-1270	1170-1200	1230-1270
Антиокислительная активность, % от ионола	67,3±0,6	63,7±0,8*	63,6±0,5*

Примечание: * - обозначено статистически достоверные различия по отношению к контролю, ($p \leq 0,05$) результаты представлены как $M \pm n$ $n=4-5$

Такие близкие реакции представителей разных систематических групп макромицетов на световые воздействия подтверждают гипотезы некоторых исследователей об универсальности механизмов фоторецепции у грибов.

5.6. Влияние света на синтез меланинов и ферментативную активность *I. obliquus*

I. obliquus – широко известный меланинсодержащий гриб, обладающий широким спектром лекарственных свойств [216; 621; 627]. Некоторые исследователи рассматривают этот гриб, как перспективный продуцент

меланинов и меланинсодержащих субстанций [4; 7; 190; 212]. Еще в шестнадцатом веке этот гриб использовали в качестве народного средства в России, Восточной Европе, и большинство из стран Балтии. [246; 661; 662], где его ценили за мощный эффект при лечении ряда заболеваний человека при отсутствии каких-либо неприемлемых токсических побочных эффектов [555; 665]. В природе этот гриб ограничивается очень холодными местами обитания и растет очень медленно на стволах деревьев березы. Химические исследования показали, что *I. obliquus* синтезирует широкий спектр вторичных метаболитов, включая фенольные соединения, меланины и тритерпеноиды. Среди них обнаружены активные компоненты, обладающие антиоксидантным, противоопухолевым и противовирусным действием, а также повышающие иммунитет человека против инфекции патогенными микробами. В последнее время в связи с увеличением спроса на этот гриб, его природные запасы почти исчерпаны [662]. Попытки вырастить этот гриб глубинным способом сосредоточены в основном на накоплении биомассы мицелия [617], меланина [7; 663] и полисахаридов [246].

Производство меланиновых пигментов свойственно многим грибам. Меланиновые пигменты грибов являются нетоксичными, обладают фото- и радиопротекторным действием, проявляют, в зависимости от источников получения и особенностей химического строения, антиоксидантную, генопротекторную, противоопухолевую, антибактериальную, иммуномодулирующую и гепатопротекторную активности [5; 6; 29; 86]. Как показывают данные литературы, наиболее исследованными являются меланины грибов-микроспоридий: представители родов *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Alternaria*, *Paecilomyces*, *Verticillium* [5; 6; 28; 61; 189]. Меланиновые пигменты базидиальных грибов остаются наименее изученными в химическом и структурном отношении [7; 190; 624]. В настоящее время наблюдается очевидный прогресс в исследовании меланинов высших базидиальных грибов, что, несомненно, связано с появлением новых подходов и методов в изучении их физико-химических и

биологических свойств, в частности метода термической деструкции, используемого для идентификации и изучения структуры меланинов [169].

В условиях неблагоприятной экологии, именно меланинсинтезирующие грибы характеризуются высокой устойчивостью к широкому спектру повреждающих факторов, причем факторов различного механизма воздействия на живые организмы [439, 546; 660]. Ведущая роль в устойчивости, по всем данным, принадлежит меланинам, чья "барьерная" функция объясняется особенностями их физико-химических свойств и локализацией в поверхностных структурах мицелия на границе контакта организма с внешней средой. Барьерный принцип представляется наиболее простым, надежным и при определенной полифункциональности протектора довольно универсальным средством изоляции клеточных структур от повреждающего воздействия того или иного фактора.

В настоящее время есть основания признавать у меланинсодержащих грибов существование, как минимум, двух фоторецепторных систем: миксохромной и системы с участием меланинового пигмента в качестве первичного фоторецептора [60]. Известно, что пигменты коричневого и черного света вырабатываются клетками многих живых организмов, как защитная реакция в ответ на излучения разного вида. Сложность структуры меланинов позволяет этим биополимерам перехватывать и рассеивать фотоны и электроны. В результате происходит ослабление энергии облучения и преобразование ее в энергию химических связей. Имеются указания о положительном влиянии освещения в видимой части спектра на интенсивность пигментации разных видов микромицетов. Поскольку свет является на определенных стадиях онтогенеза грибов не только фактором регуляции их развития и биосинтетической активности, но в какой-то мере и фактором стресса, который может привести к стимуляции синтеза метаболитов, защищающих клетки от возможных повреждений.

Данные о влиянии низкоинтенсивного излучения на рост макромицетов и синтез ими меланиновых пигментов в литературе практически отсутствуют.

Почти нет информации о ферментативной активности *I. obliquus*, включая антиоксидантные ферменты и ферменты, ответственные за синтез пигментов. Меланогенез регулируется ферментами, такими как тирозиназа и полифенолоксидаза [248]. Тирозиназа играет решающую роль в начальной стадии синтеза меланина, катализируя окисление L-тирозина (L-Туг) в 3,4-дигидроксифенилаланин (ДОФА) и окисление ДОФА в допахинон [570; 580; 667].

Основными ферментами, которые обеспечивают антиоксидантную защиту клеток и поддержание концентрации активных форм кислорода при физиологическом уровне, являются каталазы и пероксидазы, разлагающие пероксид водорода [317; 553]. Считается, что каталаза является естественным антимутагеном и нейтрализует мутагенное действие перекиси водорода. Вполне возможно, что неудачные попытки вызвать мутации у некоторых организмов с помощью перекиси водорода объясняются высоким содержанием фермента в клетках этих организмов. Пероксидазы привлекли внимание в промышленном масштабе в качестве катализатора в клинической диагностике в составе дифференциально-диагностических питательных сред для выявления патогенных и условно-патогенных микроорганизмов, как компонент биосенсоров для количественного определения содержания перекиси водорода и этанола. Её используют в процессах деградации остаточных количеств перекиси водорода в технологиях легкой, химической и пищевой промышленности. [37; 56; 166; 201].

В 1986 году открыли пероксидазу, которая синтезировалась внеклеточно гифомицетом. Впервые подобная пероксидаза была найдена в культуральном фильтрате базидиомицета *Coprinus cinereus* [477]. Известны исследования и других видов базидиомицетов продуцирующих пероксидазы и каталазы внеклеточного и внутриклеточного происхождения [34; 372; 576].

Установлено, что некоторые штаммы *F. velutipes*, *Agrocybe cylindracea*, *Fistulina hepatica* и *P. ostreatus* являются продуцентами оксидоредуктаз, штаммы *P. ostreatus* P-01 и P-208 - активными продуцентами внеклеточной каталазы, а штаммы *F. hepatica* Fh-08 - внутриклеточной каталазы. Разработаны методы получения ферментов каталазы и пероксидазы вне-и внутриклеточного происхождения и получены новые антиоксидантные ферменты, которые имеют уникальные свойства и перспективы применения в различных отраслях промышленности и научных исследований. За последние 12 лет, уникальное применение нашли пероксидазы. В настоящее время макромицеты рассматривают как новый источник пероксидазы для промышленных целей в дополнение к корням хрена. Возможность синтеза ферментов макромицетами дает возможность их использования для получения целевых недорогих метаболитов. Одной из важных особенностей таких продуцентов является отсутствие спороношения на стадии вегетативного мицелия, что обеспечивает безопасность их культивирования [302; 303].

Исследование ферментативной активности макромицетов является одним из важных способов понять их физиологические, биохимические особенности для того, чтобы использовать их многообещающий потенциал.

В настоящее время можно найти много информации об оптимизации условий культивирования *I. obliquus* с целью повышения продуктивности биотехнологических процессов [23; 212; 617]. Поскольку известно, что ферменты фенолоксидазного комплекса базидиальных грибов (о-дифенолоксидаза, лакказа), принимающие участие в синтезе предшественников меланина, являются медьзависимыми [88], изучалось влияние различных концентраций меди в питательной среде на образование меланина *I. obliquus*. Дополнительное внесение в питательную среду 0,008% ионов меди приводило к увеличению продукции эндомеланина практически в 3 раза, экзо меланина – в 1,5 по сравнению с контрольной средой [23]. Установлено, что дополнительное внесение в питательную среду возможных

предшественников меланиновых пигментов служит одним из факторов, регулирующих меланиногенез грибов [88; 91]. Ряд моноциклических фенольных соединений (пирокатехин, тирозин, бензойная и пара-оксибензойная кислоты) в концентрации 0,02% оказывали стимулирующее действие на синтез меланинов. При добавления тирозина и пирокатехина в среду образование пигмента у *I. obliquus* повышалось в 1,5 раза.

Свет как фактор регуляции роста и биосинтетической активности этого макромицета практически не рассматривался. Нами удалось найти информацию о том, что свет регулирует у *I. obliquus* в глубинной культуре биосинтез полифенолов и их последующую антиоксидантную активность [664].

Нами впервые было установлено, что облучение посевного мицелия *I. obliquus* синим и красным светом при глубинном культивировании приводит к увеличению скорости роста культуры и накоплению биомассы гриба, а также позволяет значительно сократить длительность культивирования (раздел 5.1).

Полученные нами результаты дают основание утверждать, что низкоинтенсивный свет в видимой части спектра может быть использован в биотехнологии глубинного культивирования *I. obliquus* не только как стимулятор роста, но и как стимулятор синтеза меланина (рис. 5.3). Здесь следует отметить ту же тенденцию – использование НИЛИ в значительно большей степени индуцировало синтез меланина, чем облучение неполяризованным светом. Облучение посевного материала синим лазерным светом (488 нм) увеличивало количество синтезируемого грибом меланина при глубинном культивировании более чем в 2,5 раза, что сопоставимо с вышеуказанными результатами, полученными другими авторами при использовании в качестве стимуляторов роста и биосинтетической активности ионов меди и предшественников меланиновых пигментов [23]. Изучение динамики накопления меланина показало, что его синтез достигает стационарной фазы после облучения лазерным светом с длиной волны 488

нм на 9 сутки, тогда как в контроле и при других режимах облучения на 12 сутки культивирования перехода в стационарную фазу не было отмечено. Таким образом, облучение посевного материала в указанном режиме позволило не только значительно увеличить выход меланина, но и сократить время культивирования.

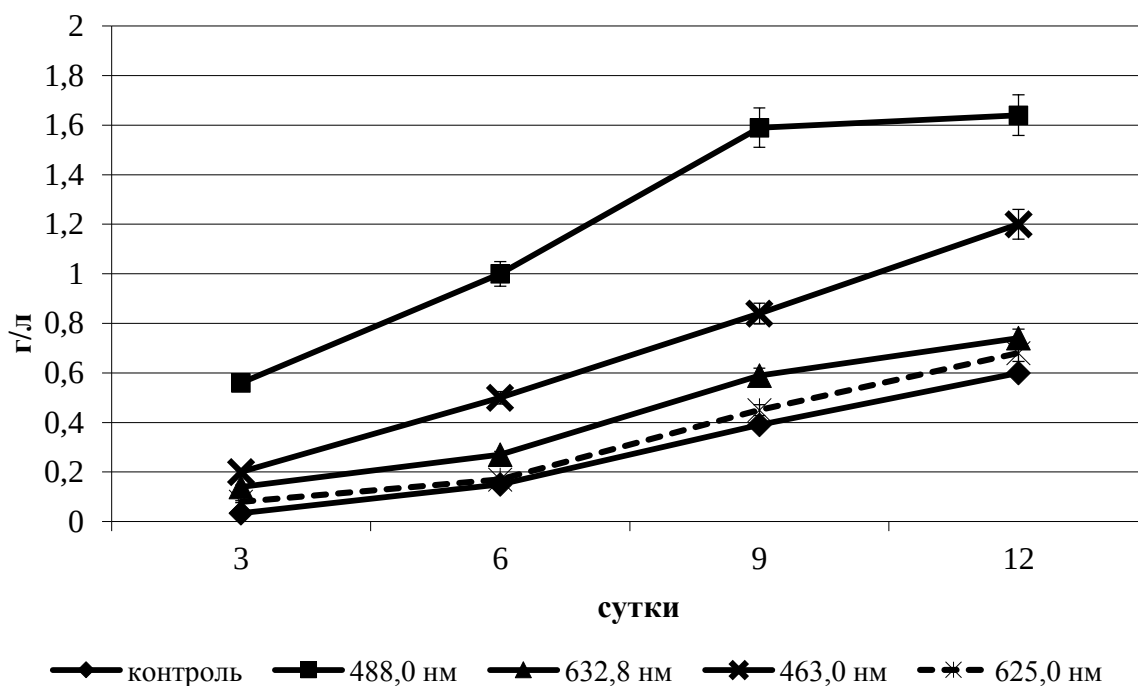


Рис. 5.3. Динамика накопления меланина *I. obliquus*

Результаты, представленные на рисунке 5.4, демонстрируют корреляцию между накоплением биомассы мицелия и синтезом меланина *I. obliquus* после облучения посевного мицелия когерентным и некогерентным светом низкой интенсивности в синем и красном диапазонах длин волн, поскольку ранее нами было определено, что этот макромицет обладает большей чувствительностью именно к свету этих длин волн (раздел 4). Максимальную стимуляцию роста, которая выражалась в увеличении накопления биомассы мицелия, вызывало облучение посевного материала синим когерентным светом – 56,9% по отношению к контролю. При этом количество эндомеланина увеличивалось на 250,0%. Облучение некогерентным светом той же длины волны было менее эффективным –

увеличение биомассы составляло 17,6%, а эндомеланина – 181,0%. Стимулирующая активность красного света была значительно ниже. Фотоиндуцированное увеличение синтеза экзомеланина было незначительным и составляло всего 2,5-7,2%.

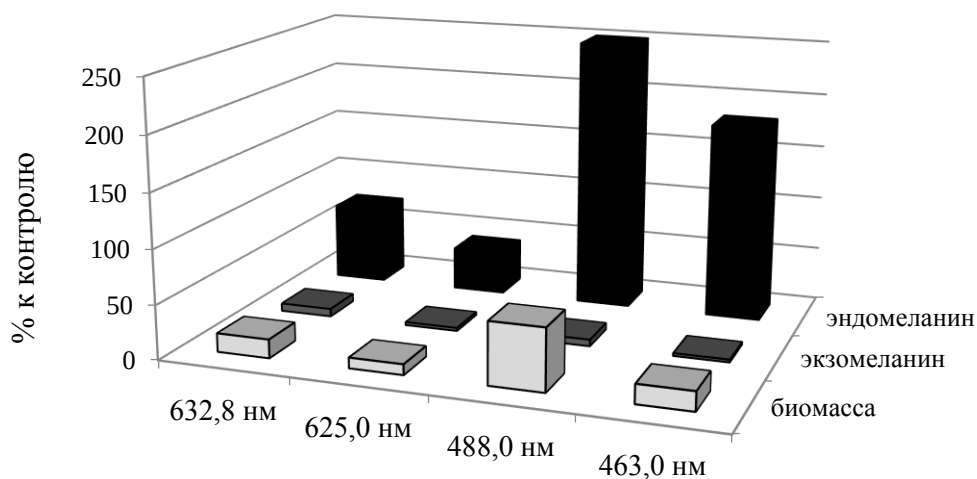


Рис. 5.4. Влияние света низкой интенсивности на рост и синтез меланина *I. obliquus*

Таким образом, увеличение меланина после активизации посевного мицелия в указанных режимах происходило за счет эндомеланина. Поскольку эти изменения были довольно значительными и фиксировались даже визуально (рис. 5.5)



Рис. 5.5. Фотоиндукция синтеза меланина *I. obliquus*

Нами также был проведен сравнительный анализ эффективности облучения непрерывным и импульсным светом разной когерентности и длины волны посевного мицелия на накопление экзомеланина. Результаты, представленные на рис. 5.6 демонстрируют опять же преимущество использования импульсного света не только для стимуляции роста и синтеза полисахаридов, но и для интенсификации синтеза меланина.

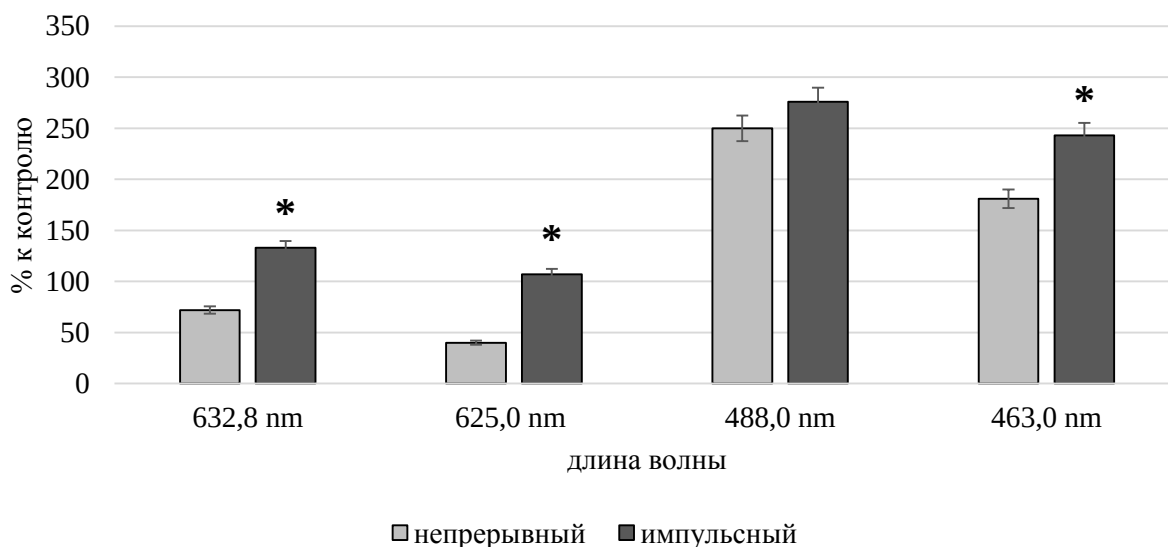


Рис. 5.6. Влияние природы света на синтез меланина *I. obliquus*

Примечание: * - обозначено статистически достоверные различия по отношению к облучению непрерывным светом, ($p \leq 0,05$) результаты представлены как $M \pm n$ $n=4-5$

Здесь прослеживается та же тенденция, которую отмечали исследователи на других биологических объектах [386, 391], а мы при изучении влияния света низкой интенсивности на прорастание спор и рост вегетативного мицелия макромицетов [раздел 3; 512; 525]. Эффекты фотостимуляции тем выше, чем ниже исходные показатели активности клеток. Максимальный дополнительный стимулирующий эффект от использования импульсного света (67%) отмечали в красном диапазоне длин волн, где стимуляция синтеза меланина составляла 40% при облучении непрерывным светом той же длины волны и когерентности. При облучении

инокулюма импульсным светом 488,0 нм стимулирующий эффект увеличивался на 26% по сравнению с его облучением непрерывным светом, который увеличивал накопление меланина мицелием на 250%.

Поскольку некоторые исследователи полагают, что свет может влиять на метаболизм азота у грибов [256; 370; 544; 571] мы предположили, что концентрация азота может влиять на фотоиндукцию биосинтетической активности *I. obliquus*. Для проверки этой гипотезы мы изучали биосинтетическую активность этого макромикета на средах с разными концентрациями азота (2 и 4 г/л пептона).

Результаты, представленные на рисунке. 5.7, демонстрируют достоверную зависимость фотостимуляции синтеза меланина от концентрации источника азота в среде. Снижение концентрации азота увеличивает стимулирующий эффект НИЛИ с длиной волны 488 нм более, чем в 2 раза.

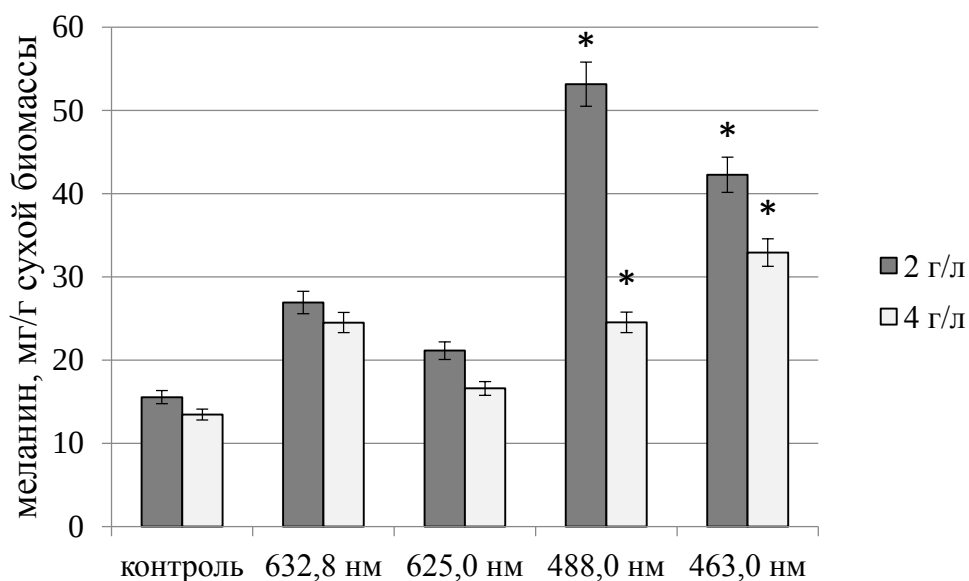


Рис. 5.7. Влияние концентрации источника азота на фотоиндукцию меланина *I. obliquus*

Примечание: * - обозначено статистически достоверные различия между концентрациями источника азота ($p \leq 0,05$); результаты представлены как $M \pm n$ $n=4-5$

В целом, полученные нами результаты вписываются в современные представления об универсальных механизмах фоторегуляции живых организмов, согласно которым фотохимические реакции обусловлены возбуждением электронов в атомах, поглощающего свет вещества. На молекулярном уровне это выражается в виде фотоионизации вещества, его восстановления или фотоокисления, фотодиссоциации молекул, в их перестройке - фотоизомеризации. Исследования показали, что лазерная радиация избирательно поглощается содержащимися в клетках пигментными веществами. Пигмент меланин поглощает свет наиболее активно в сине-фиолетовой области, порфирин и его производные – в красной, а фермент каталаза - 628 nm.

Учитывая ключевую роль каталазы и других ферментов во многих звеньях энергообразования и биологических процессах в организме, особый интерес представляло изучение влияния низкоинтенсивных кратковременных световых воздействий на активность ферментов макромикетов, в частности катализирующих синтез меланина, вне- и внутриклеточных полифенолоксидазы и тирозиназы. Анализ полученных результатов (рис. 5.8 и 5.9) показал значительное изменение уровня их активности у *I. obliquus* во всех вариантах опыта. Максимальный стимулирующий эффект на активность как вне-, так и внутриклеточных ферментов оказывал синий когерентный свет. Облучение увеличивало активность внутриклеточных полифенолоксидазы и тирозиназы в 25 и 27 раз, а внеклеточных – в 6 и 2 раза соответственно. Однако достоверного изменения в соотношении этих ферментов не наблюдается (внутриклеточная тирозиназа: внутриклеточная полифенолоксидаза = 1 : 10). Оба эти фермента принимают участие в синтезе меланина и в норме функционируют взаимосвязано. Очевидно, что для нормального метаболизма существенно сохранение определенного соотношения между активностями этих ферментов. Отмечена положительная корреляция между активностью ферментов, регулирующих меланиногенез, и его синтезом.

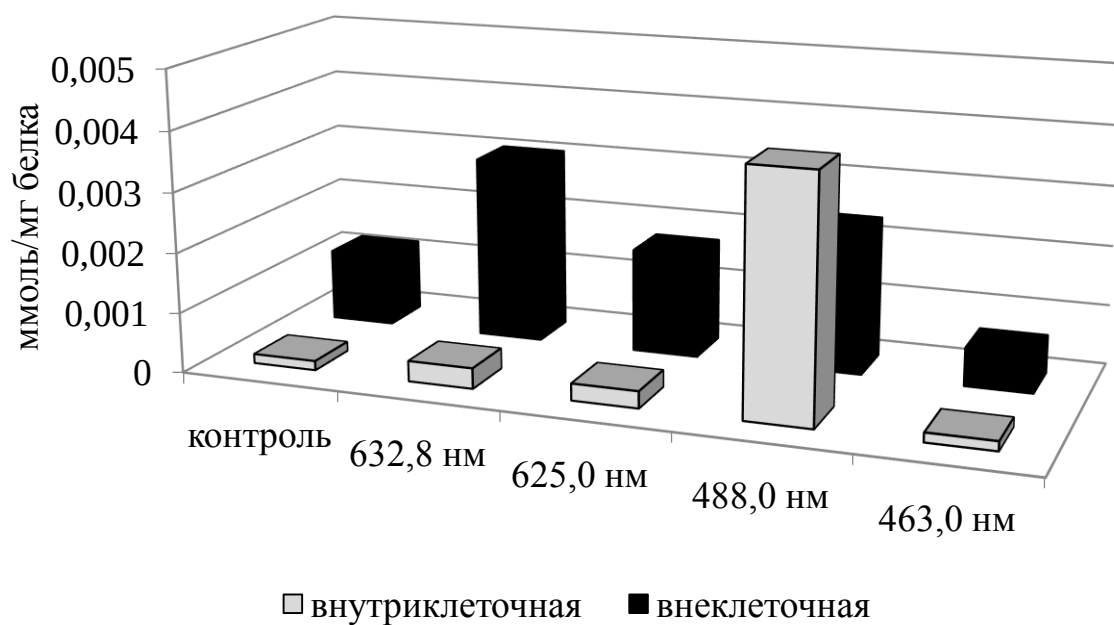


Рис. 5.8. Влияние облучения на тирозиназную активность *I. obliquus*

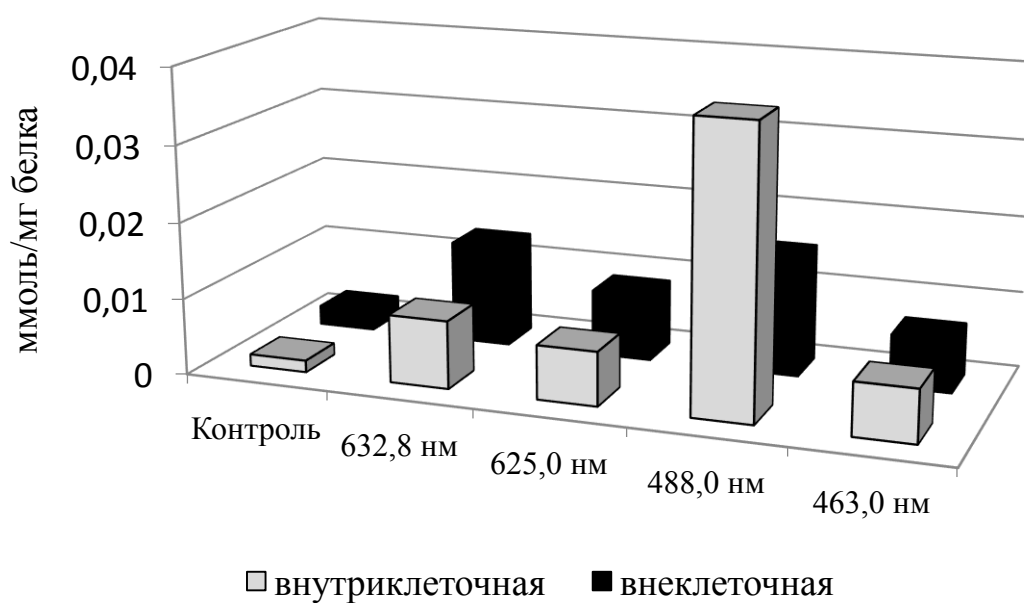


Рис. 5.9. Влияние облучения на полифенолоксидазную активность *I. obliquus*

При разработке методов интенсификации технологических этапов культивирования *I. obliquus* с помощью световых воздействий несомненно

большой интерес представляет изучение динамики изменения уровня активности ферментов, которые осуществляют антиоксидантную защиту клеток, после облучения в разных диапазонах длин волн и когерентности.

Как синий, так и красный свет, как из лазерных источников, так и LED в разной степени ингибировали активность внеклеточной пероксидазы (рис. 5.10). Причем некогерентный свет оказывал больший негативный эффект по сравнению с когерентным. В то же время когерентный свет увеличивал активность внутриклеточной пероксидазы в 15-20 раз.

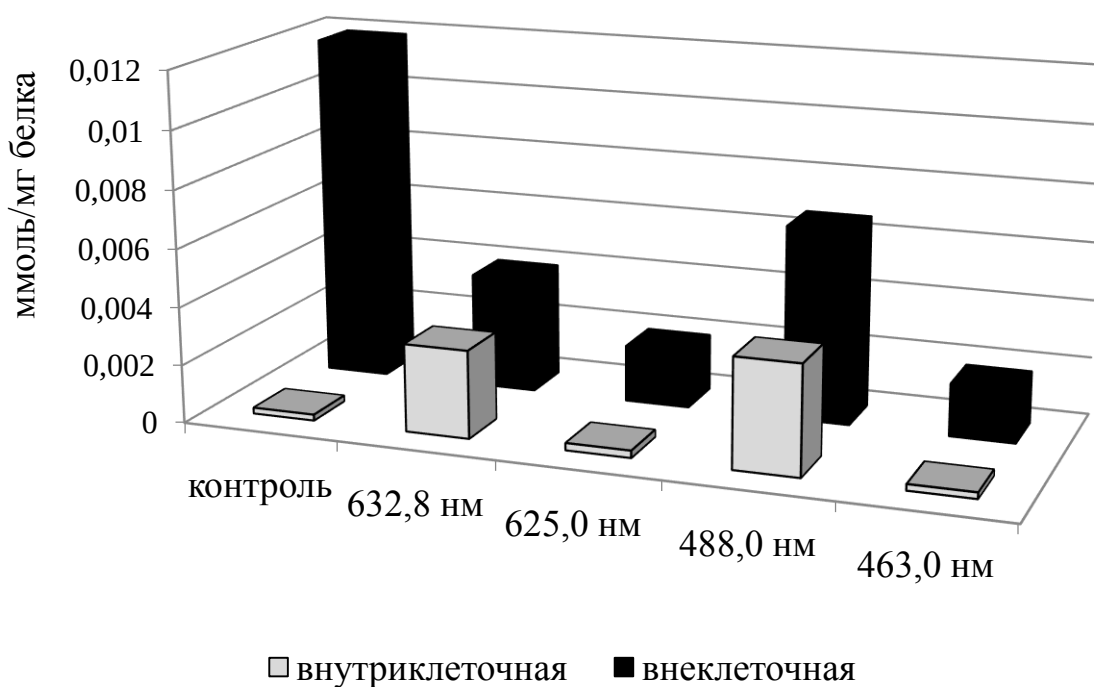


Рис. 5.10. Влияние облучения на пероксидазную активность *I. obliquus*

Облучение *I. obliquus* когерентным светом, как в синем, так красном диапазонах длин волн, напротив, увеличивало активность внеклеточной каталазы в 30 раз по отношению к контролю, тогда как некогерентный свет не вызывал значительных изменений. Световые воздействия в изученных режимах практически не изменяли активность внутриклеточной каталазы (рис. 5.11).

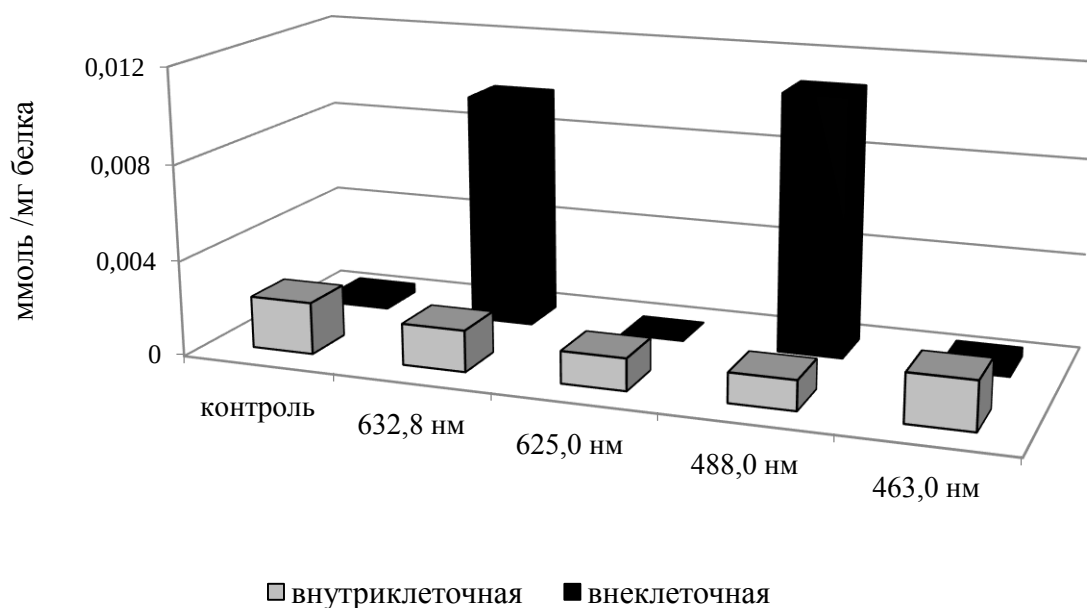


Рис. 5.11. Влияние облучения на активность каталазы *I. obliquus*

Нельзя не отметить, что ферментативная активность *I. obliquus* более чувствительна к когерентному свету как в красном, так и в синем диапазонах длин волн. Некоторые исследователи считают, что у растений более контрастно стимуляционный эффект НИЛИ проявляется в условиях лимитации источников питания и кислорода. Так, семена гороха, обработанные в течении 10 мин НИЛИ 10мВт/см² при последующем 48 часовом затоплении, проросли на 57%, тогда как контрольные на 10% [67]. Они связывают антистрессорное действие когерентного излучения связано с увеличением активности дыхательных ферментов (супероксидмутаза, пероксидазы, каталазы и др.).

Поскольку в процессе наших исследований влияния кратковременного облучения светом низкой интенсивности на биосинтетическую активность *I. obliquus* была впервые обнаружена зависимость фотоиндуцированной интенсивности синтеза меланина от концентрации источника азота, вполне логичным было изучить влияние этого фактора на активность вышеуказанных ферментов данного макромицета.

Лимитация источника азота в питательной среде приводила к повышению стимулирующего эффекта после облучения как лазерным, так и светом LED только по отношению к внеклеточной тирозиназе (рис. 5.12). На среде с 2 г/л пептона после облучения посевного мицелия светом с длиной волны 632,8 нм и 488,0 нм тирозиназная активность, по сравнению с культивированием на среде, содержащей 4 г/л пептона, увеличивалась на 42,7% и 65,0% соответственно. Поскольку известно, что тирозиназа катализирует синтез меланина, то вполне объяснимо параллельное увеличение в 2 раза синтеза этого пигмента в том же варианте опыта.

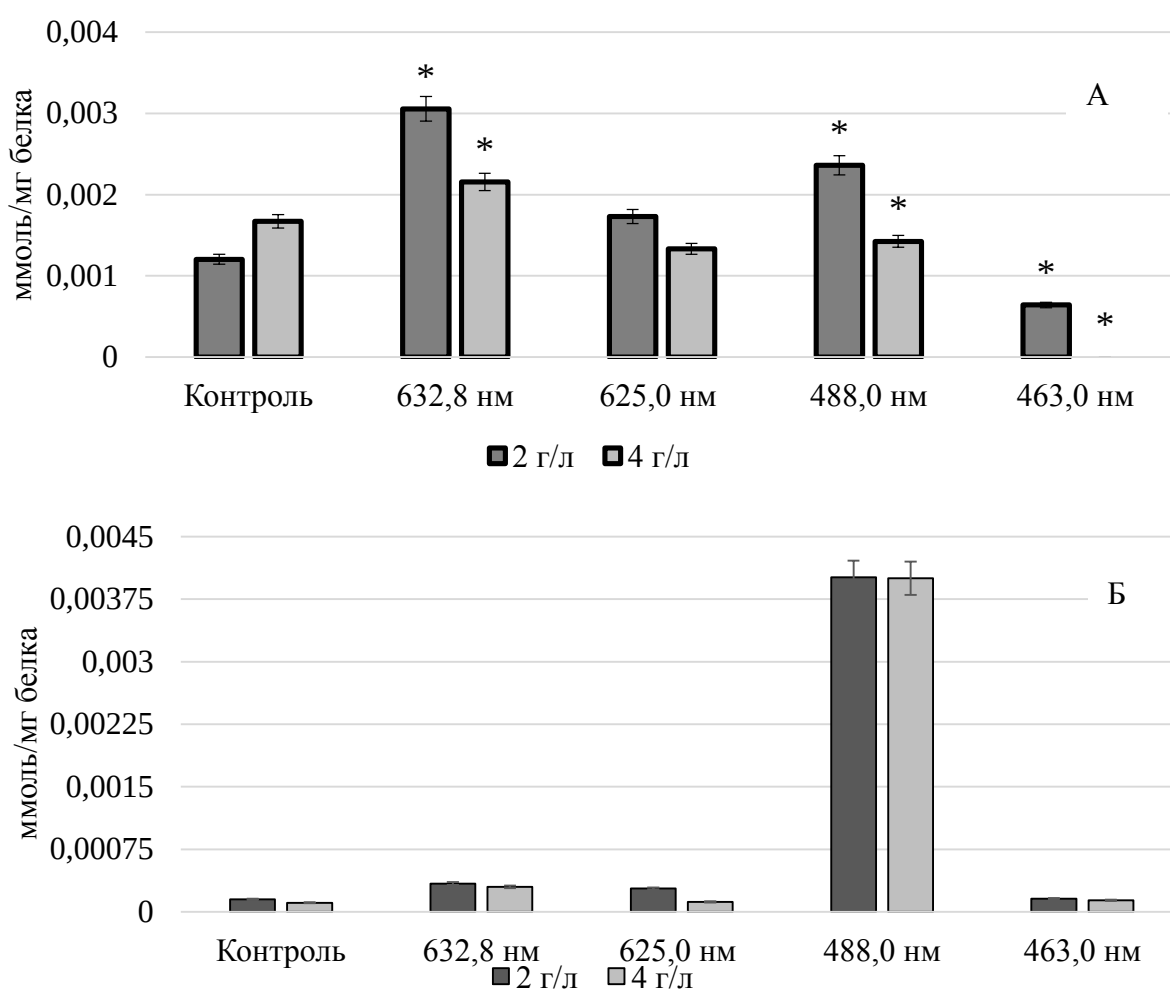


Рис. 5.12. Влияние концентрации источника азота на активность тирозиназы *I. obliquus*; (А) – внеклеточной и (Б) – внутриклеточной

Примечание: * - обозначено статистически достоверные различия между концентрациями источника азота ($p \leq 0,05$); результаты представлены как $M \pm n$ $n=4-5$

Концентрация пептона в среде культивирования никак не влияла на активность тирозиназы в мицелии *I. obliquus*.

Изучение динамики изменения активности полифенолоксидазы, другого фермента, ответственного за синтез меланина у *I. obliquus* (рис. 5.13) показало, что снижение концентрации азота в среде культивирования приводит, напротив, к снижению 42,4% уровня внутриклеточной ферментативной активности при использовании в качестве посевного материала мицелия, облученного синим лазерным светом. Достоверное снижение активности полифенолоксидазы в мицелии отмечали и при использовании других режимов облучения, но они не были столь значительны.

На среде с пониженным содержанием азота увеличивалась более чем в 2 раза активность внеклеточной полифенолоксидазы при активации посевного мицелия красным некогерентным светом (рис. 5.13).

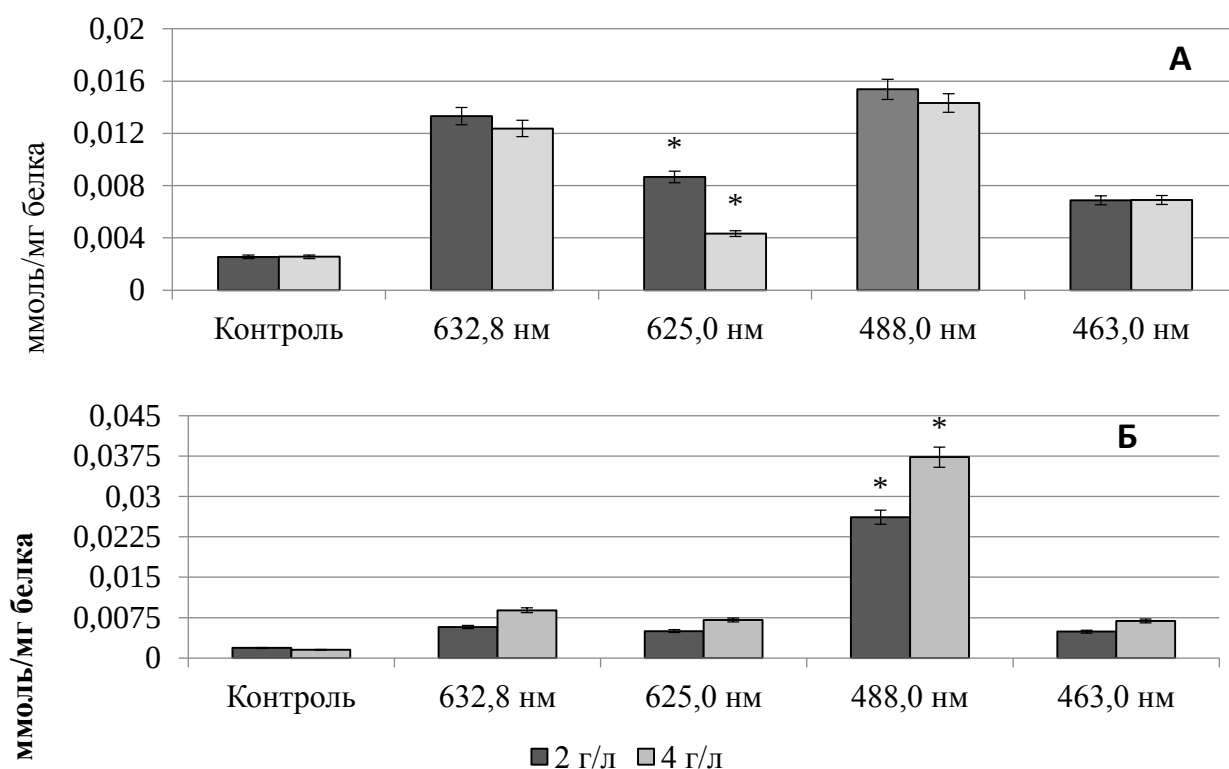


Рис. 5.13. Влияние концентрации азота на активность полифенолоксидазы *I. obliquus*; (А) – внеклеточной и (Б) – внутриклеточной

Примечание: * - обозначено статистически достоверные различия между концентрациями источника азота ($p \leq 0,05$); результаты представлены как $M \pm n$ $n=4-5$

Более высокая внеклеточная пероксидазная активность у *I. obliquus* отмечалась на среде, содержащей 2 г/л азота при использовании необлученного инокулюма (контроль). Облучение же снижало ферментативную активность культуральной жидкости при культивировании этого макромицета на средах с обоими концентрациями азота (рис. 5.14).

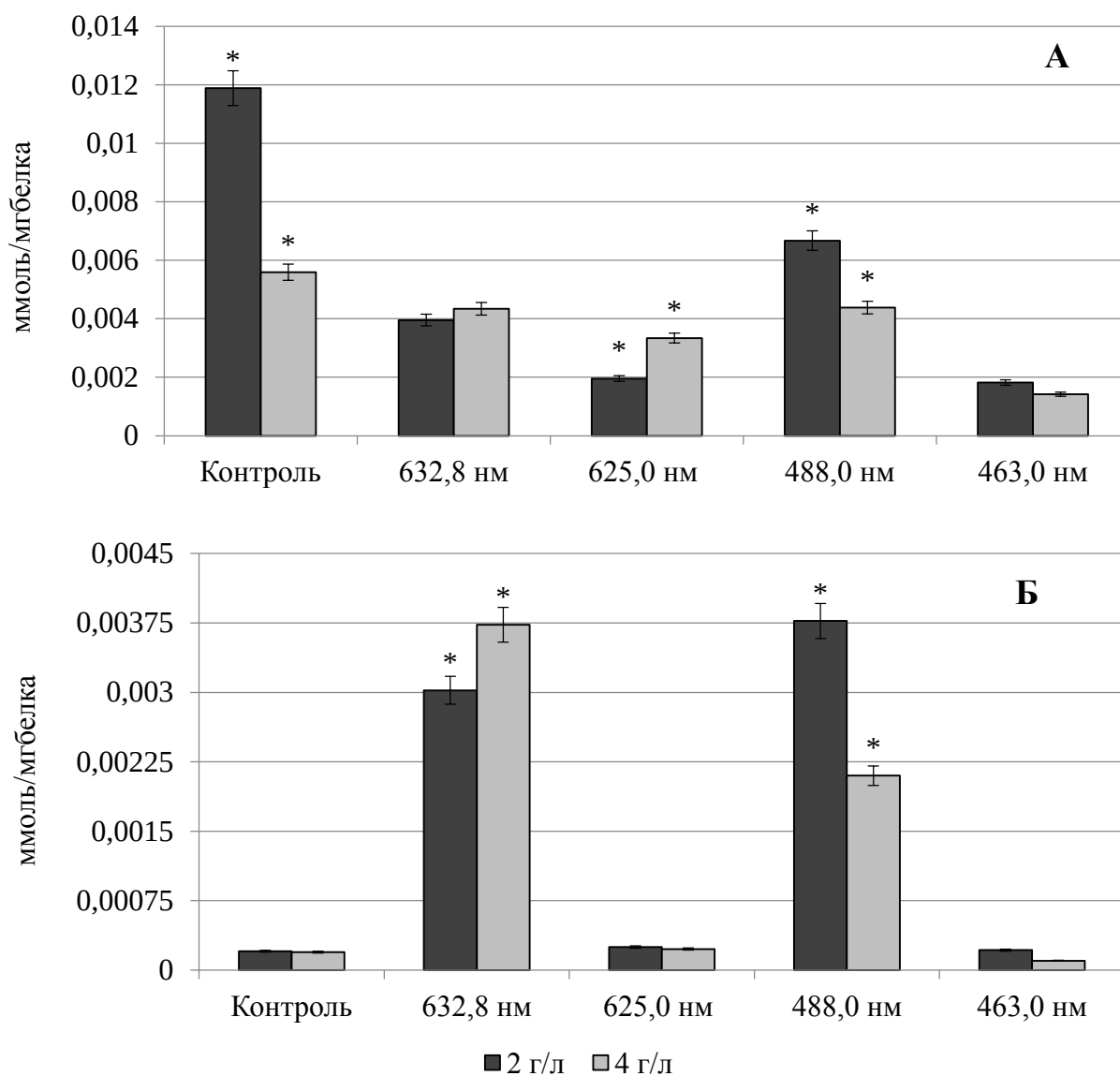


Рис. 5.14. Влияние концентрации азота на активность пероксидазы *I. obliquus* (А) – внеклеточной и (Б) – внутриклеточной

Примечание: * - обозначено статистически достоверные различия между концентрациями источника азота ($p \leq 0,05$); результаты представлены как $M \pm n$ $n=4-5$

Уменьшение концентрации азота не влияло на активность внутриклеточной пероксидазы в контроле и после облучения мицелия некогерентным светом. Облучение как синим, так и красным когерентным светом вызывало повышение активности пероксидазы в мицелии *I. obliquus*, однако изменения концентрации азота в среде оказывали различное влияние на фотоиндукцию этого фермента. Так, при культивировании мицелия на среде с 2 г/л пептона, облученного светом с длиной волны 632,8 нм ферментативная активность его ниже, чем при культивировании на среде с 4 г/л пептона. При инокуляции этих сред мицелием, активированным синим когерентным светом, наблюдалась противоположная реакция. Мы можем только предполагать, что свет разной длины волны и когерентности индуцирует различные изменения метаболизма, приводящие к изменению пероксидазной активности мицелия. Изучение механизмов таких изменений несомненно представляет практический и научный интерес и заслуживает специального внимания.

Что касается влияния концентраций источника азота на реализацию фотоиндуцированных изменений активности каталазы, то наши исследования однозначно показали преимущества использования сред с пониженным содержанием источника азота при культивировании фотоактивированного посевного материала для получения дополнительного стимулирующего эффекта (рис. 5.15). Активность внеклеточной каталазы после облучения красным и синим когерентным светом на среде с 2 г/л пептона была выше соответственно в 2,6 и 10,0 раз, чем при культивировании на среде с более высоким содержанием азота. Активность внутриклеточной каталазы при культивировании на среде с низким содержанием азота была на 11,1 – 29,4% выше, чем с более высоким, во всех вариантах опыта, включая контроль. Можно предположить, что фотоиндукция внутриклеточной каталазы не затрагивает метаболизм азота у *I. obliquus*.

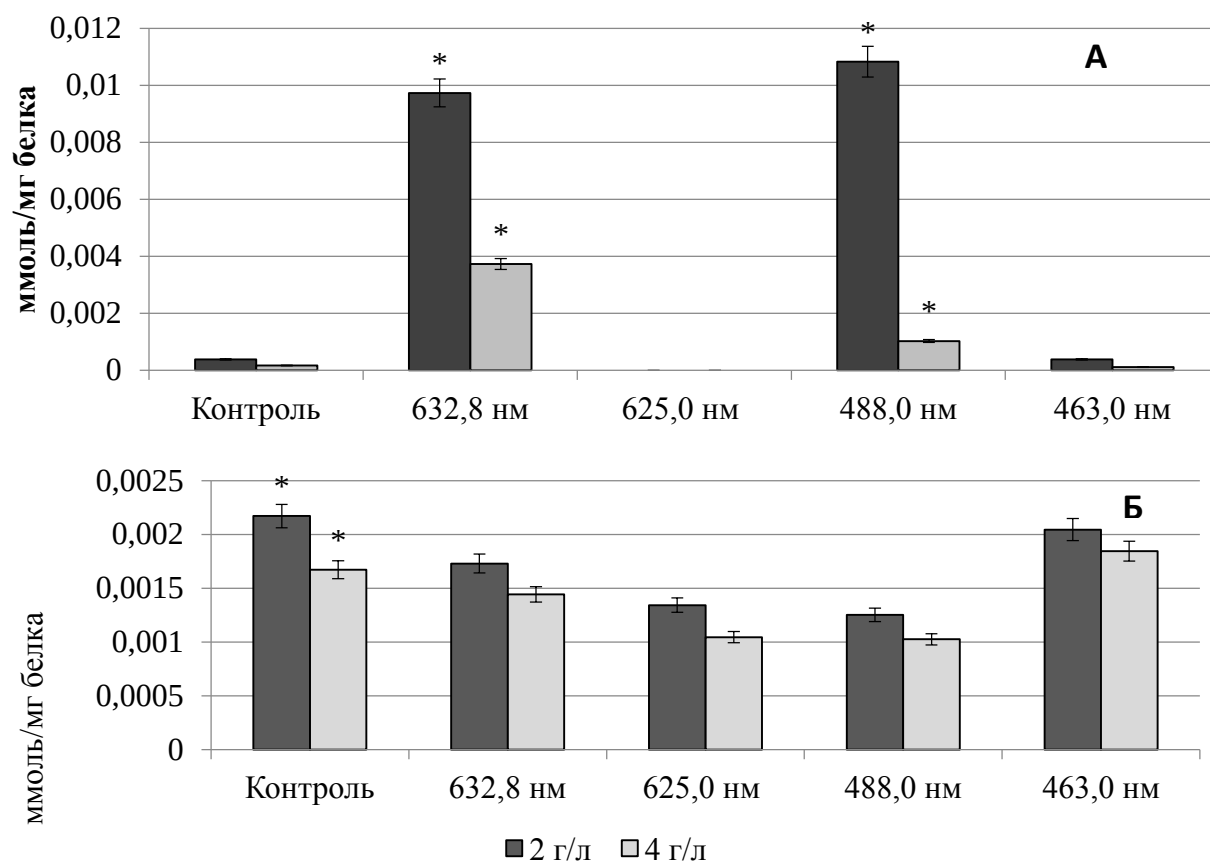


Рис. 5.15. Влияние концентрации азота на активность каталазы *I. obliquus*; (А) – внеклеточной и (Б) – внутриклеточной

Примечание: * - обозначено статистически достоверные различия между концентрациями источника азота ($p \leq 0,05$); результаты представлены как $M \pm n$ $n=4-5$

Анализ полученных нами данных по эффективности кратковременного облучения посевного мицелия *I. obliquus* светом низкой интенсивности для повышения его биосинтетической активности впервые показано, что использование синего когерентного света в технологии культивирования *I. obliquus* оптимально для стимуляции роста мицелия, синтеза меланина, повышения внеклеточной и внутриклеточной активностей тирозиназы и полифенолоксидазы, а также внеклеточной каталазы. Красный когерентный свет может эффективно использоваться как для стимуляции роста мицелия, так и для повышения внутриклеточной и внеклеточной активности полифенолоксидазы, внеклеточной каталазы и тирозиназы, внутриклеточной

пероксидазы. Некогерентный свет в большинстве вариантов наших исследований оказывал меньший стимулирующий эффект на биосинтетическую активность *I. obliquus* [108; 131; 134; 138; 523]. Однако, его применение эффективно и экономически целесообразно при культивировании, направленном на получение меланина, полифенолоксидазы и внеклеточной тирозиназы даже при более низких показателях. Это обусловлено большей доступностью и энергоэффективностью светодиодов [523].

Использование питательных сред с пониженным содержанием источника азота целесообразно для повышения фотоиндуцированного стимулирующего эффекта при получении меланина, внеклеточной каталазы, тирозиназы и полифенолоксидазы, внутриклеточной пероксидазы.

Нами впервые доказано, что использование импульсного света для активации посевного мицелия с целью увеличения синтеза меланина более эффективно, чем непрерывного в тех же диапазонах длин волн, когерентности и интенсивности.

При культивировании *I. obliquus* параметры и режимы световой обработки посевного мицелия следует корректировать в соответствии целевыми биологически активными компонентами. Механизмы регуляции метаболических путей биоактивных компонентов с помощью света разных диапазонов длин волн и когерентности должны быть объектом систематического контроля в зависимости от конкретных биотехнологических задач.

5.7. Индукция антимикробной активности макромицетов светом низкой интенсивности

Бактериемия является в настоящее время бичом современной медицины. В последние годы обнаружено огромное количество патогенных для человека бактерий, обладающих лекарственной устойчивостью [204]. В

результате уменьшается число эффективных антимикробных лекарственных средств и возрастает потребность в изыскании новых антибиотиков [157-159; 269; 279; 432; 479]. После открытия пенициллина в 1928 году на протяжении четверти века грибы были основным объектом поиска новых антибиотиков. Уже к 1965г, в разных лабораториях мира было проверено около 3 тысяч видов макромицетов и определена химическая природа свыше 40 антибиотиков [186]. В настоящее время антибиотики описаны у широкого круга прокариот и эукариот, причем в последнее десятилетие грибы, в том числе высшие, опять стали наиболее многочисленной группой организмов в данной области исследований [53; 54; 58; 85; 115; 129; 134; 134; 141; 170-172; 199; 200; 202; 224; 292; 432; 536; 538].

Многие из них содержат антибиотические вещества, активные против бактерий и грибов: полиацетилены (виды родов *Clitocybe*, *Polyporus*, *Coprinus*, *Marasmius*, *Agrocybe*, *Ganoderma* и др.), фенольные соединения, кориалин, кампестрин, полипорин, муцидин, иллуидины и др. [199; 200; 371; 483; 536; 620]. Муцидин внедрен в промышленное производство и применяется при дерматозах, полициклический антибиотик плевротин, выделяемый из культуральной жидкости *Pleurotus griseus*, активен против широкого спектра микроорганизмов и применяется в ветеринарии.

Относительно недавно был открыт и идентифицирован ещё целый ряд новых антибиотических веществ, в частности из афиллофоральных грибов [670]. В этом плане особый интерес представляют вещества с активностью против мультирезистентных штаммов патогенных бактерий. Такими, например, являются новые сесквитерпеновые гидрохиноны, названные ганомидинами А и В, изолированные из *Ganoderma pfeifferi* Bres., которые ингибируют рост метициллин-резистентных тест-культур патогенных бактерий [427]. Экстракты, полученные с помощью метанола и хлороформа индийскими исследователями из плодовых тел *Ganoderma applanatum*, подавляли рост *Staphylococcus aureus* и *Bacillus subtilis*, а, кроме того и *Escherichia coli* [483]. Высокую антимикробную активность по отношению к *E. coli* (MTCC-443), *S. aureus* (MTCC-737), *Klebsiella pneumoniae* (MTCC-2405), *B. subtilis* (MTCC-1789), *Salmonella typhi* (MTCC-531) и *Pseudomonas*

aeruginosa (MTCC-779) проявили экстракты из плодовых тел *Ganoderma lucidum*. Ацетоновые экстракты показали максимальную активность, особенно по отношению к *K. pneumoniae* [534]. Кроме того, чувствительность к экстрактам этого гриба проявили патогенные бактерии *Enterococcus faecalis*, *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus mutans*, *Proteus vulgaris*, *Salmonella typhimurium* [380].

Однако, основное направление исследований антимикробной активности макромицетов в настоящее время ограничено, в основном, скринингом и определением химической структуры антибиотиков.

Одним из требований, предъявляемых к потенциальным продуцентам антибиотиков – культивирование в глубинных условиях, позволяющее в дальнейшем, при обнаружении перспективного соединения, разработать технологию и наладить его производство путем биосинтеза. Для достижения большей продуктивности процессов получения целевого продукта основные усилия исследователей направлены на определение оптимальных параметров культивирования и факторов регуляции биологической активности продуцента. Исследования факторов, регулирующих антимикробную активность, ограничено подбором питательных сред и источников азота и углерода [497; 607]. Несмотря на большое количество исследований в этом направлении поиск новых экологически чистых регуляторов роста и биологической активности грибов остается актуальным.

В настоящее время в литературе отсутствуют какие-либо сведения о влиянии света на антимикробную активность грибов и возможности его использования в биотехнологиях с целью интенсификации процессов синтеза антибиотических препаратов и увеличения выхода целевого продукта. Нами впервые проведено изучение влияния света низкой интенсивности на антимикробную активность макромицетов [49; 125; 129; 134; 141; 518; 519; 524] и возможности его использования для интенсификации технологических этапов культивирования грибов-продуцентов антимикробных компонентов и увеличения выхода конечного продукта.

Объектами исследования были 4 штамма 4 видов базидиальных грибов: *F. velutipes* 3923, *P. ostreatus* 531, *G. lucidum* 1908 и *G. applanatum* 1552, у

которых ранее нами была выявлена антимикробная активность [53; 85; 134; 518; 519].

Кратковременное облучение посевного материала светом низкой интенсивности в красном и синем диапазонах длин волн позволило увеличить антимикробную активность макромицетов практически ко всем 12 используемым в исследованиях тест-культурам из Всероссийской коллекции микроорганизмов (ВКМ): грамположительные бактерии (*Bacillus subtilis* ATCC 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, клинический изолят), грамотрицательные бактерии (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Comamonas terrigena* ВКПМ В-7571 (=ATCC 8461), *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, грибы (*Aspergillus niger* ИНА 00760, *Saccharomyces cerevisiae* RIA 259 (табл. 5.16). Зеленый свет либо не вызывал изменения уровня активности, либо подавлял её.

Ранее у штамма 531 *P. ostreatus* нами была выявлена антимикробная активность в отношении грамположительных бактерий *B. mycoides* 537, *B. pumilis* NCTC 8241, *L. mesenteroides* ВКПМ В-4177, *M. luteus* NCTC 8340, *S. aureus* FDA 209P (MSSA) и ИНА 00761 (MRSA, клинический изолят) и грамотрицательных бактерий *E. coli* ATCC 25922, *C. terrigena* ВКПМ В-7571 (=ATCC 8461) и *P. aeruginosa* ATCC 27853 [137]. На данном этапе исследований синтез антибиотических компонентов в контроле фиксировали через 14 суток инкубации (кроме компонентов активных в отношении MSSA и MRSA) (табл. 5.16), что полностью соответствует нашим предыдущим исследованиям. Облучение как лазерным (когерентным) светом (632.8 нм и 488.0 нм), так и светодиодами (некогерентный), в том же волновом диапазоне, индуцировало появление антимикробной активности уже на 7 сутки культивирования у *P. ostreatus* 531 против *B. mycoides*, *B. pumilis*, *L. mesenteroides* и *C. terrigena*. Повышение её уровня более чем на 100%

Таблица 5.16

Антимикробная активность макромицетов после световых воздействий (диаметры зон ингибирования роста, мм)

Тест культура	Сутки роста	Красный		Зеленый		Синий		Контроль без облучения
		когерентный	некогерент ный	когерентный	некогерент ный	когерентный	некогерент ный	
1	2	3	4	5	6	7	8	9
<i>P. ostreatus</i>								
<i>B. mycoides</i> 537	7	11±0.16*	7±0.2*	0	0	9±0.14*	5±0.23*	0
	14	19±0.21*	14±0.18*	(7±0.16)*	(6±0.14)*	14±0.21*	12±0.2*	5±0.21
	21	0	18±0.16*	(6±0.21)*	(8±0.14)*	19±0.1*	17±0.18*	13±0.14
<i>B. pumilis</i> NCTC 8241	7	5±0.2*	5±0.26*	0	0	6±0.12*	4±0.1*	0
	14	15±0.17*	16±0.17*	9±0.12*	6±0.2*	12±0.2*	10±0.16*	8±0.14
	21	0	0	0	0	5±0.14	0	6±0.17
<i>L.</i> <i>mesenteroides</i> ВКПМ В- 4177	7	4±0,12*	4±0.10*	5±0.33*	3±0.10*	8±0.22*	5±0.1*	0
	14	10±0.14*	9±0.19*	10±0,09*	6±0.22*	10±0.16*	6±0.1*	5±0.16
	21	8±0.2*	6±0.12*	0	0	0	3±0.1*	5±0.3

Продолжение таблицы 5.16

1	2	3	4	5	6	7	8	9
<i>S. aureus</i> FDA 209P (MSSA)	7	11±0.2	10±0,14*	8±0.18*	7±0.14*	12±0.21*	10±0.23*	5±0.17
	14	16±0.19*	13±0,26*	8±0.22	7±0.18*	16±1.7*	14±0.23*	8±0.24
	21	0	0	0	0	0	0	0
<i>S. aureus</i> ИНА 00761 (MRSA)	7	12±0.16*	11±0.2*	4±0.12*	5±0.1	14±0.19*	11±0.24*	5±0.2
	14	20±0.3*	18±0.23*	11±0.18*	9±0.17*	19±0.32*	16±0.19*	10±0.15
	21	0	0	(15±0.33)*	(13±0.22)*	0	0	16±0.32
<i>M. luteus</i> NCTC 8340	7	0	0	0	0	0	0	0
	14	11±0.1*	9±0.22*	0	0	7±0.11*	7±0.2*	(6±0.14)
	21	7±0.17*	8±0.12	0	0	11±0.32*	9±0.18*	(8±0.16)
<i>E. coli</i> ATCC 25922	7	0	0	0	0	0	0	0
	14	12±0.12*	10±0.16*	9±0.18*	7±0.18*	13±0.26*	10±0.20*	6±0.23
	21	15±0.28*	13±0.18*	12±0.25*	10±0.23*	16±0.2*	13±0.16*	9±0.2
<i>C. terrigena</i> БКПМ В- 7571	7	10±0.19*	9±0.14*	0	0	10±0.15*	12±0.1*	0
	14	16±0,26*	12±0.17*	7±0.12	7±0.1	18±0.3*	16±0.18*	7±0.12
	21	4±0.23*	6±0.23М	9±0.24*	7±0.1М	0	0	9±0.12

Продолжение таблицы 5.16

	2	3	4	5	6	7	8	9
<i>P. aeruginosa</i>	7	0	0	0	0	0	0	0
ATCC 27853	14	14±0.17*	11±0.18*	(8±0.2)*	(9±0.2)*	14±0.16*	12±0.23*	8±0.21
	21	11±0.16*	7±0.25*	(7±0.14)*	(7 ±0.19)*	8±0.18*	6±0.21*	4±0.17
<i>F. velutipes</i>								
<i>B. mycoides</i>	7	6±0.12*	5±0.19*	0	0	9±0.18*	3±0.1*	0
537	14	15±0.22*	13±0.1*	0	0	14±0.11*	12±0.18*	8±0.23
	21	5±0.2*	5±0.23*	6±0.12*	5±0.2*	6±0.14*	16±0.17*	12±0.32
<i>S. aureus</i>	7	13±0.11*	9±0.16*	0	0	10±0.19*	6±0.31*	0
FDA 209P	14	26±0.3*	24±0.23*	12±0.27	11±0.2*	28±0.25*	23±0.17*	12±0.19
(MSSA)	21	8±0.21*	6±0.15*	18±0.14*	20±0.33*	9±0.25*	8±0.24*	22±0.23
<i>S. aureus</i>	7	7±0.1*	4±0.1*	0	0	11±0.36**	9±0.13*	0
ИHA 00761	14	16±0.14*	14±0.22*	6±0.11*	6±0.16*	18±0.21*	14±0.11*	9±0.1
(MRSA)	21	12±0.31*	12±0.15*	10±0.2*	9±0.21*	9±0.11*	5±0.1*	14±0.26
<i>E. coli</i> ATCC	7	6±0.13*	6±0.2*	0	0	8±0.19*	5±0.17*	0
25922	14	20±0.17*	18±0.32*	9±0.12*	8±0.26*	22±0.34*	19±0.12*	12±0.14
	21	14±0.24*	10±0.11*	15±0.34*	11±0.1*	9±0.19*	8±0.11*	17±0.19

Продолжение таблицы 5.16

1	2	3	4	5	6	7	8	9
<i>A. niger</i> ИНА 00760	7	16±0.11*	12±0.19*	7±0.1*	8±0.15*	19±0.3*	17±0.31*	10±0.12
	14	12±0.29*	15±0.12*	10±0.16*	10±0.22*	12±0.25*	13±0.27*	14±0.21
	21	9±0.12*	10±0.14*	8±0.25*	7±0.2*	6±0.32*	5±0.11*	12±0.2
<i>G. applanatum</i>								
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	7	5±0.11*	0	0	0	7±0.16*	4±0.11*	0
	14	13±0.22*	11±0.16*	8±0.11	9±0.28*	15±0.36*	12±0.18*	8±0.12
	21	6±0.18*	0	0	0	5±0.11*	0	0
<i>S. aureus</i> FDA 209P (MSSA)	7	7±0.1*	5±0.19*	0	0	8±0.23*	6±0.21*	0
	14	17±0.33*	15±0.34*	12±0.22*	11±0.12*	16±0.17*	14±0.3*	13±0.27
	21	4±0.12	0	0	0	6±0.15*	0	0
<i>S. aureus</i> ИНА 00761 (MRSA)	7	9±0.14*	7±0.19*	0	0	10±0.22*	8±0.13*	0
	14	18±0.29*	17±0.24*	10±0.13*	11±0.2*	16±0.32*	14±0.16*	12±0.11
	21	7±0.2*	6±0.21*	0	0	0	0	0

Продолжение таблицы 5.16

1	2	3	4	5	6	7	8	9
<i>G. lucidum</i>								
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	7	9±0.22*	6±0.16*	0	0	7±0.11*	6±0.18*	0
	14	18±0.15*	16±0.13*	12±0.3*	13±0.34	19±0.28*	16±0.26*	13±0.3
	21	6±0.1*	0	0	0	4±0.12*	0	0
<i>S. aureus</i> FDA 209P (MSSA)	7	5±0.1*	5±0.11*	0	0	7±0.1*	6±0.11*	0
	14	12±0.18*	10±0.21*	6±0.12*	8±0.13	14±0.14*	11±0.2*	8±0.15
	21	0	0	0	0	0	0	0
<i>S. aureus</i> ИНА 00761 (MRSA)	7	6±0.12*	0	0	0	4±0.13*	0	0
	14	11±0.2*	10±0.19*	8±0.14	7±0.2*	12±0.21*	9±0.15*	8±0.1
	21	0	0	0	0	0	0	0

Примечание: (*) различия статистически значимы ($p \leq 0,05$);

- в скобках приведены диаметры зон угнетения роста

отмечалось в отношении *B. pumilis*, *L. mesenteroides*, *C. terrigena*, MRSA, MSSA и *E. coli*. Зона подавления роста *B. mycoides* культуральным фильтратом, полученным после 14 суток инкубации облученного красным лазерным светом *P. ostreatus* увеличивалась в 3.8 раза по отношению к таковой в контроле. Облучение синим лазерным светом увеличивало зону подавления роста этой тест-культуры почти в 3 раза. Низкоинтенсивное лазерное излучение вызывало на 10 - 40 % больший стимулирующий эффект по сравнению с излучением LED. После облучения *P. ostreatus* зеленым светом наблюдалось снижение активности культуральной жидкости в отношении *B. mycoides*, MRSA, *M. luteus* и *P. aeruginosa*. Однако, облучение в этом диапазоне как когерентным, так и некогерентным светом, повышало синтез антимикробных компонентов, подавляющих рост *E. coli*. На основании этого можно предположить, что зеленый свет стимулирует синтез этим штаммом узко специфических соединений, активных только против *E. coli*.

У штамма *F. velutipes* антимикробная активность в отношении широкого спектра микроорганизмов (*B. subtilis* ATCC 6633, *S. aureus* FDA 209P, *S. aureus* ИНА 00761 и *E. coli* ATCC 25922) проявляется после двух недель культивирования, а подавление роста *A. niger* ИНА 00760 начинается уже через неделю. При одностадийном и двустадийном культивировании, у него выявлены 3 антибиотических компонента [53]. Облучение посевного мицелия этого гриба синим и красным когерентным светом стимулирует их синтез и соответственно увеличивает активность в отношении всех вышеуказанных микроорганизмов, включая микромицет *A. niger*, на 60 – 150 %. Стимуляция ингибирующей активности *F. velutipes* некогерентным светом в том же режиме составляла 20 - 100 %. Также, как и у *P. ostreatus*, у *F. velutipes* появление антимикробной активности отмечалось на неделю

раньше, чем в контроле. Облучение зеленым светом ингибировало активность этого штамма.

Аналогичные изменения антимикробной активности мы наблюдали, после облучения и у штаммов *G. lucidum* и *G. applanatum*, у которых ранее нами была выявлена антимикробная активность в отношении метициллинстойкого и метициллин-чувствительного штаммов *S. aureus*, а также *B. subtilis* ATCC 6633 [85]. Однако, в отличие от ранее рассмотренных видов, эти штаммы проявляли активность в довольно узком промежутке времени. Кратковременные низкоинтенсивные световые воздействия, опять же в синем и красном диапазоне длин волн, не только повышали антимикробную активность *G. lucidum* и *G. applanatum*, но и увеличивали длительность их биосинтетической активности. Возможно, эти изменения следует рассматривать как позитивные, поскольку некоторые исследователи считают, что для образования антибиотиков необходимо длительное поверхностное или глубинное культивирование [562]. Однако для доказательства этого требуются дополнительные точные количественные исследования синтеза антибиотических компонентов на протяжении всего процесса культивирования. Следует отметить, что механизмы, ответственные за синтез антимикробных соединений у *G. lucidum* и *G. applanatum*, были менее чувствительны к световым воздействиям в заданных нами режимах. Максимальное повышение антимикробной активности *G. applanatum* в отношении *B. subtilis* наблюдалось при облучении когерентным красным и синим светом (82 и 87 % соответственно). У *G. lucidum* фотообработка в тех же режимах в большей степени увеличивала ингибирующую активность культуральной жидкости против MSSA (50%-красный и 75 % синий). Зеленый свет не оказывал достоверного влияния ни

на длительность биосинтеза, ни на уровень активности антимикробных компонентов этих штаммов.

Как уже отмечалось нами ранее, некоторые исследователи установили, что клетки различных организмов более чувствительны к низкоинтенсивному импульсному свету, чем к непрерывному той же интенсивности [145]. Нами были получены неоднозначные данные при изучении влияния облучения в непрерывном и импульсном режиме на прорастание спор разных видов макромицетов [523]. При этом впервые установлены преимущества прерывистого и импульсного света для стимуляции роста и биосинтетической активности некоторых макромицетов [106; 125; 129; 134; 520]. В то же время на данный момент единое мнение о возможных преимуществах импульсного или прерывистого света и его параметрах, способствующих биостимуляции еще не сформировалось [348]. Поэтому мы поставили задачу провести сравнительный анализ фоточувствительности к световым воздействиям низкой интенсивности в непрерывном и импульсном режимах процесса синтеза антимикробных компонентов вышеуказанными макромицетами.

Сравнительный анализ антимикробной активности *P. ostreatus* на 14 день культивирования при использовании посевного мицелия, облученного красным лазерным светом в непрерывном и импульсном режиме, показал, что импульсный свет более эффективен для повышения активности практически по отношению ко всем используемым в работе тест-культурам кроме *B. mycooides* и *S. aureus* FDA 209P (MSSA), чем непрерывный (рис. 5.16). Диаметры зон подавления роста бактерий увеличивались на 23-72% при облучении импульсным светом, по сравнению с непрерывным.

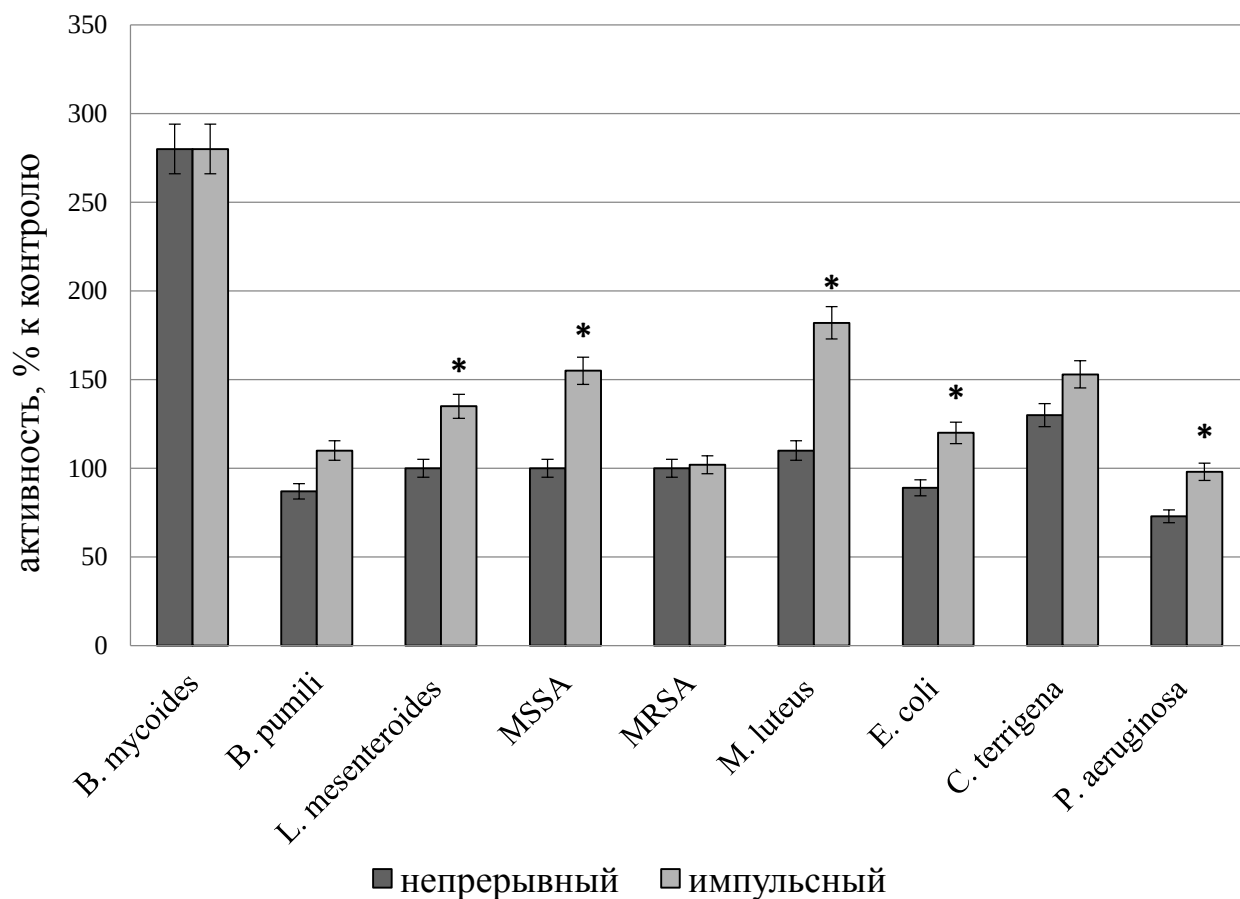


Рис. 5.16. Влияние природы света на антимикробную активность *P. ostreatus*

Примечание: * - обозначено статистически достоверные различия по отношению к облучению непрерывным светом, ($p \leq 0,05$) результаты представлены как $M \pm n$ $n=4-5$

Аналогичные исследования изменений антимикробной активности после активации посевного мицелия *F. velutipes* в тех же режимах показали, что импульсный свет в большей степени, чем непрерывный, стимулировал синтез антимикробных компонентов против *B. mycoides* 537, *S. aureus* FDA 209P (MSSA) и *E. coli* ATCC 25922 (25,5%, 33,0% и 24,9% соответственно) (рис. 5.17). Однако, мы не обнаружили достоверной разницы в стимулирующей активности импульсного и непрерывного света по отношению к *S. aureus* ИНА 00761 (MRSA) и *A. niger* ИНА 00760 (рис 5.17).

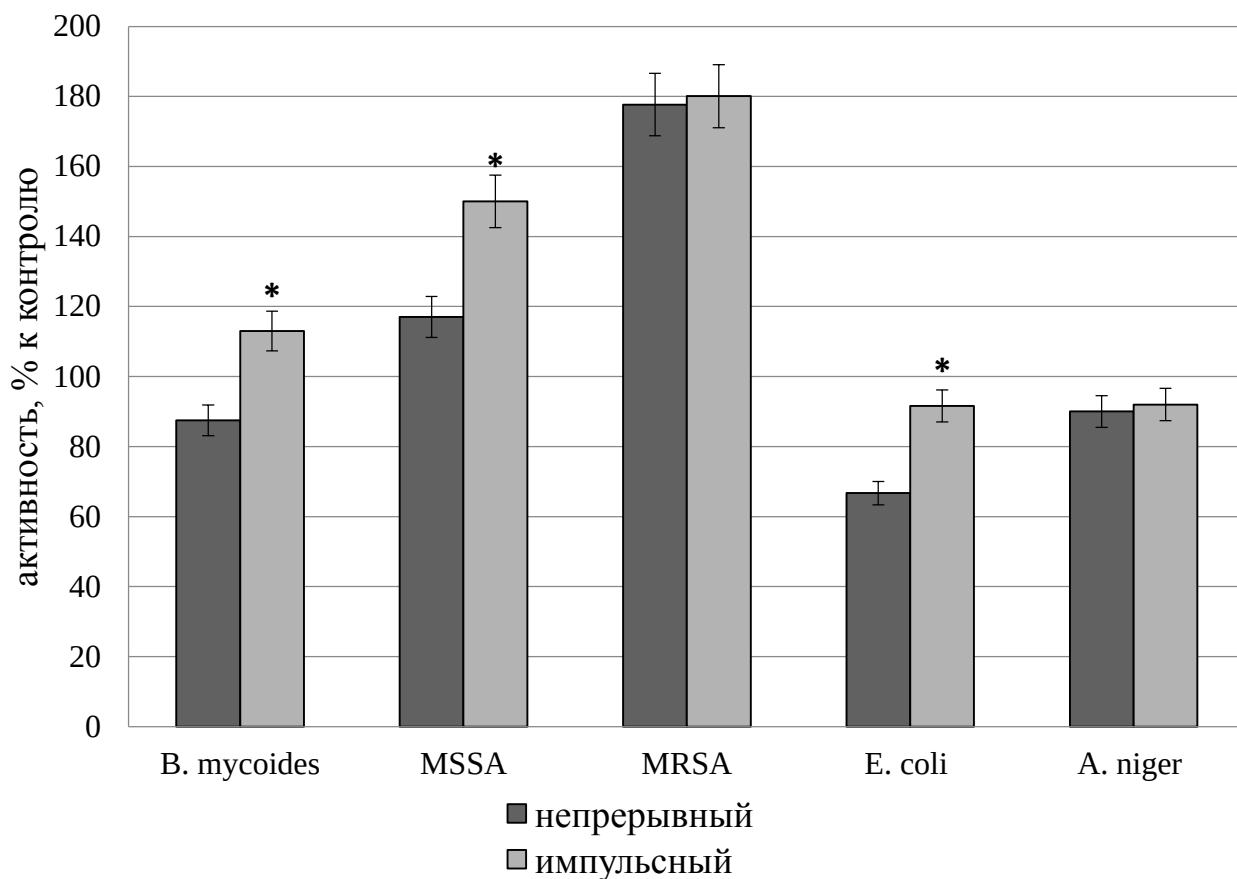


Рис. 5.17. Влияние природы света на антимикробную активность *F. velutipes*

Примечание: * - обозначено статистически достоверные различия по отношению к облучению непрерывным светом, ($p \leq 0,05$) результаты представлены как $M \pm n$ $n=4-5$

Импульсный свет был эффективнее непрерывного при активации антимикробной активности у *G. applanatum* по отношению к *B. subtilis* ATCC 6633 и *S. aureus* FDA 209P (MSSA). Увеличение диаметров зон подавления роста этих объектов составляло 34,1 и 23,0% соответственно (рис. 5.18). *S. aureus* ИНА 00761 (MRSA) проявлял одинаковую чувствительность к облучению в обоих режимах.

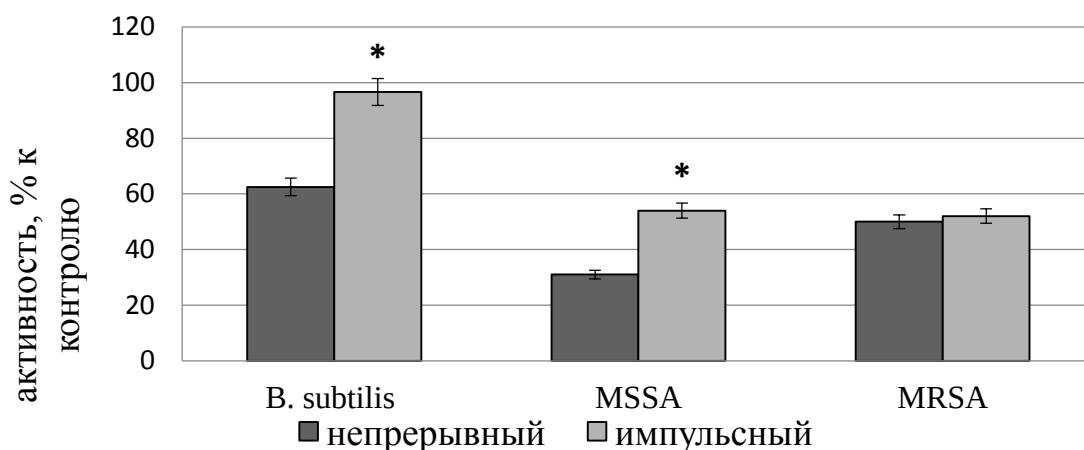


Рис. 5.18 Влияние природы света на антимикробную активность *G. applanatum*.

Примечание: * - обозначено статистически достоверные различия по отношению к облучению непрерывным светом, ($p \leq 0,05$) результаты представлены как $M \pm n$ $n=4-5$

Облучение импульсным красным когерентным посевного материала *G. lucidum* на 14 сутки культивирования увеличивало её антимикробную активность против всех трёх тест-культур на 18,5-53,0% (рис. 5.19).

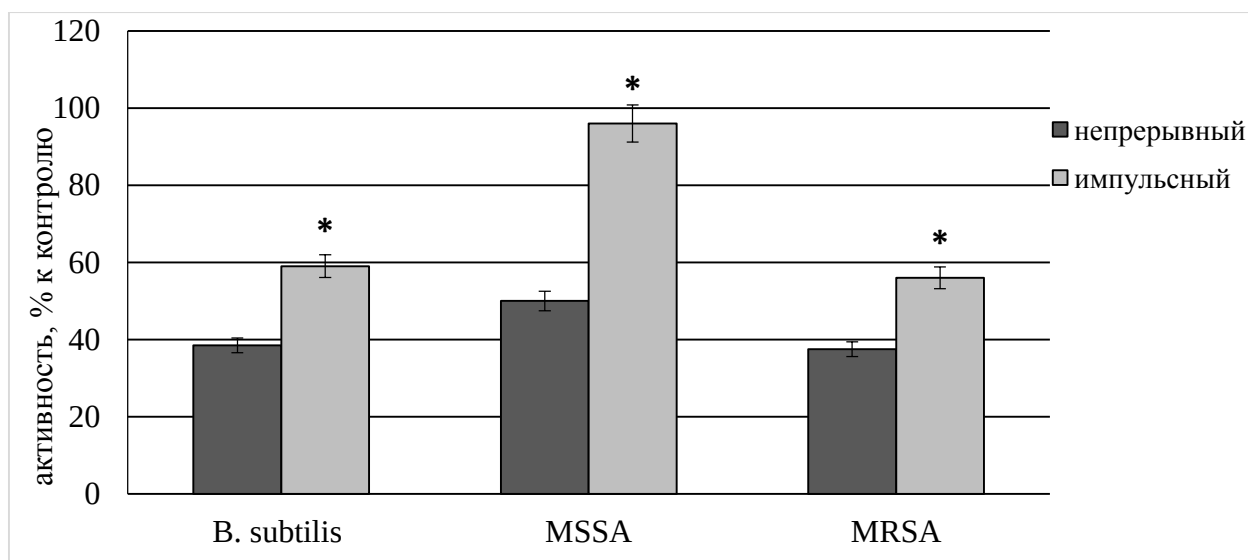


Рис. 5.19. Влияние природы света на антимикробную активность *G. lucidum*

Примечание: * - обозначено статистически достоверные различия по отношению к облучению непрерывным светом, ($p \leq 0,05$) результаты представлены как $M \pm n$ $n=4-5$

Таким образом, в результате наших исследований установлено, что низкоинтенсивный свет с энергией 230 мДж/см², полученный из лазерных и светодиодных источников оказывает значительное влияние на антимикробную активность *F. velutipes*, *P. ostreatus*, *G. lucidum* и *G. applanatum* при глубинном культивировании. Кратковременное облучение посевного мицелия в красном и синем диапазонах длин волн способствовало сокращению периода культивирования до появления антимикробной активности. Когерентный (лазерный) свет обладал большим стимулирующим эффектом, по сравнению с некогерентным (LED), и облучение им в заданных режимах увеличивало ингибирующую активность культуральной жидкости по отношению к разным тест-культурам для *F. velutipes* на 60-150%, *P. ostreatus* - 100-238%, *G. applanatum* – 30-87% и *G. lucidum* – 30-70%. Однако, использование светодиодных источников позволило получить достаточно высокие показатели антимикробной активности у *P. ostreatus* (37-180%) и *F. velutipes* (20-100%).

Ни в одном варианте опыта эффективность импульсного света при измерении антимикробной активности изучаемых макромицетов не была достоверно ниже непрерывного. Диаметры подавления роста бактерий увеличивались до 72% при облучении импульсным светом, по сравнению с непрерывным. Это, несомненно, говорит в пользу его использования в биотехнологиях культивирования макромицетов с целью повышения активности антимикробных компонентов.

Полученные результаты демонстрируют перспективность использования низкоинтенсивного света в качестве экологически чистого стимулятора антимикробной активности в биотехнологиях глубинного культивирования макромицетов.

Таким образом проведённые исследования фоточувствительности макромицетов к свету низкой интенсивности с различными характеристиками позволили установить общие закономерности и индивидуальные особенности их реакций на световые воздействия и

определить эффективные параметры световой обработки, позволяющие получать наибольшую стимуляцию роста и целенаправленно регулировать биологическую активность:

- установлено, что низкоинтенсивный свет в красном и синем диапазонах длин волн обладает наибольшей биологической активностью в отношении *C. militaris*, *F. velutipes*, *G. applanatum*, *G. lucidum*, *H. erinaceus* и *L. edodes*;
- для стимуляции роста и биосинтетической активности *I. obliquus* целесообразно использовать синий свет, а для *M. conica* и *M. esculenta* – красный;
- зеленый свет эффективно может быть использован для активации посевного мицелия *L. edodes* и *P. ostreatus*;
- эффективность когерентного света низкой интенсивности на 5 – 40 % выше, по сравнению с некогерентным, для стимуляции роста и биосинтетической активности видов *C. militaris*, *F. velutipes*, *G. applanatum*, *H. erinaceus*, *I. obliquus*, *L. edodes*, *M. conica*, *M. esculenta* и *P. ostreatus*. Однако, использование светодиодных источников света также целесообразно, поскольку в указанных режимах позволяет получить значительную стимуляцию роста у всех изученных видов;
- использование импульсного света позволяет получить дополнительную стимуляцию роста по сравнению с непрерывным в тех же диапазонах длин волн и энергетической плотности у *C. militaris*, *G. lucidum*, *H. erinaceus*, *L. edodes* и *P. ostreatus* (от 10 до 30%), выхода полисахаридов у *G. lucidum* (на 20%), у *L. edodes* (на 12%), у *M. conica* (на 10%) и у *M. esculenta* (на 6%), меланина у *I. obliquus* (на 60%), повышения антимикробной активности *F. velutipes*, *G. applanatum*, *G. lucidum* и *P. ostreatus* (до 72%);
- питательные среды с пониженным содержанием источника азота (2 г/л) целесообразно использовать для повышения фотоиндуцированного

стимулирующего эффекта у *I. obliquus* при получении меланина, каталазы, внеклеточной тирозиназы и полифенолоксидазы, внутриклеточной пероксидазы.

Результаты исследований, изложенные в разделе 5 отражены в следующих публикациях: 8; 9; 10; 11; 13; 14- 16; 32; 49; 53; 54; 94-97; 106; 108; 109; 112; 115; 123-131; 133; 134; 136-138; 141; 151; 214; 511; 516; 518-522; 524; 525; 566.

РАЗДЕЛ 6.

ИНТЕНСИФИКАЦИЯ ТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ЭТАПОВ ТВЕРДОФАЗНОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ МАКРОМИЦЕТОВ

Первые попытки использования искусственного света разных диапазонов длин волн для усиления роста культур съедобных и лекарственных культур при твердофазном культивировании появились еще в 70-х годах прошлого столетия. Освещение инфракрасными лучами в определенных дозах вызывало усиление роста *Coriolus vaporarius* и *Serpula lacrimans*. Отсутствие или наличие светового воздействия в период вегетативного роста мицелия сказывалось на характере последующего плодоношения *Coprinus congregatus* [444]. Эффекты спектральной зависимости фотореакции грибов отмечены во многих работах. Кроме эффектов, связанных с действием синего света и сравнение этого действия с ответной реакцией на красный и дальний красный свет, исследовалось влияние света других участков спектра. Была изучена спектральная чувствительность фотостимулирующего и фотоингибирующего воздействия на развитие *Coprinus congregatus* в диапазоне 405-730 нм [290]. Культуры облучались в течение 12 часов постоянным числом падающих квантов. Спектральные чувствительности процессов фотоиндуцирования образования примордиев, фотоподавления развития примордиев и фотодозревания примордиев были достаточно схожи, что дает основания для вывода о действии одних и тех же фоторецепторов при морфогенезе плодовых тел. Спектры действия для выявления фотоингибирующего эффекта были исследованы в области 407-690 нм. Наиболее эффективными длинами волн был синий участок спектра (445 нм). Волны длиннее 510 нм были мало эффективными с этой точки зрения. Общая форма этого спектра действия была похожа на спектр, полученный для многих типов реакций на синий свет, в которых фоторецептором считался флавопротеин. С этой точки

зрения реакция *Coprinus congregatus* является типичным примером "реакции на синий свет". Многие организмы демонстрируют широкий набор физиологических реакций на синий и ближний УФ-свет. Так называемая "реакция на синий свет" известна для многих типов организмов: бактерий, грибов, растений и животных. В этих ранних работах считалось, что рецепторами, ответственными за "реакцию на синий свет" являются каротины и флавин, хотя более поздние работы 70-80-х годов содержат аргументации в пользу флавонов [290].

Однако, несмотря на достигнутые успехи в изучении механизмов фотоморфогенеза и фоточувствительности макромицетов использование искусственного света в промышленном грибоводстве ограничено применением люминесцентных ламп, натриевых ламп высокого давления и металлогалогеновых ламп. Оптимизация процессов поверхностного культивирования макромицетов на различных твердых субстратах осуществляется, в основном, путем оптимизации их состава, факторов внешней среды и регуляторов роста.

В то же время мировая наука и практика разработала ряд способов фотоинтенсификации и регуляции роста сельскохозяйственных культур. Источники искусственного освещения для высших растений используют в оранжереях и тепличных комбинатах, при ускоренном выведении новых сортов с-х культур и в селекционных центрах при размножении ценного посевного материала, а также при теоретических исследованиях в области физиологии растений, биофизики и генетики.

Для многих культур определены оптимальные режимы освещения, учитывающие четыре основных его характеристики:

- спектральный состав,
- интенсивность света,
- длительность суточного освещения
- пространственная структура светового поля

Фотометрическая оценка излучения базируется или на энергетической, или на эффективной системе величин, оценивает излучения с помощью селективной функции фотосинтетической эффективности. Последняя имеет ряд преимуществ, которые присущи системам эффективных величин, однако ее практическую ценность для светокультуры существенно снижает отсутствие в некоторых случаях прямой корреляции между интенсивностью фотосинтеза и продуктивностью растений [147]. Специальные исследования показали, что поиск функций спектральной чувствительности для каждого вида растений, видимо, не имеет смысла, поскольку большинство видов растений предъявляют близкие требования к спектру и интенсивности фотосинтетической активной радиации (ФАР).

Новым трендом в растениеводстве является использование светоизлучающих диодов (light emitting diodes, LED) как альтернативы для искусственного освещения в тепличном хозяйстве, обладающей рядом преимуществ [587]. По сравнению с обычными лампами высокого давления и флюоресцентными лампами, LED являются энергоэффективными, безопасными для окружающей среды и долговечными источниками света. Комбинируя различные типы LED, которые доступны для широкого диапазона областей спектра от красного до УФ, можно сформировать спектр для оптимального роста. LED - технология освещения открывает новые возможности культивирования растений, таких как импульсное облучение и динамическая адаптация спектра к суточному циклу и различным фазам роста облучаемых растений.

Поэтому в последние годы появились сообщения об использовании LED при культивировании некоторых видов макромицетов с целью получения плодовых тел [193; 453; 480; 481; 484]. Изучалось влияние освещения светом в синем, зеленом и желтом диапазонах длин волн в период вегетативного роста и формирования примордиев на образование плодовых тел, морфологию и антиоксидантную активность *Pleurotus eryngii* и

Hypsizygus marmoreus [481; 482]. Постоянное освещение синим светом на стадии вегетативного роста приводило к значительному увеличению урожайности и количества плодовых тел *L. edodes*, *F. velutipes*, *Hypsizygus marmoreus*, *Grifola frondosa*, *Pholiota nameko* и *Pleurotus eryngii* [193; 453; 484]. С использованием светодиодов видимого диапазона исследовалось влияние света на мицелий *Coprinus cinereus* [417]. Было обнаружено, что подавление фазы роста синим светом зависит от его интенсивности, тогда как красный и дальний красный свет независимо от его интенсивности не влияет на фазу роста.

Анализ опыта использования искусственного света для стимуляции биологических процессов в растениеводстве и грибоводстве показал, что он ограничен методами, основанными на постоянном освещении культур на разных стадиях морфогенеза [45; 62-64; 193; 453; 480; 481; 484]. Однако, это требует установки специального освещения на больших площадях, дополнительных затрат энергии и обслуживания. Тогда как исследования, проведенные на клетках разных биологических объектов, показали, что кратковременное облучение (от долей секунды до десятков минут) низкоинтенсивным светом в относительно малых дозах ($10^2 - 10^3$ Дж/м²) способствует макроэффекту, который долго сохраняется [74; 75; 77].

Поэтому нами впервые разработаны новые методы фотоинтенсификации технологических этапов поверхностного культивирования макромицетов на твердых субстратах на примере *P. ostreatus*, *L. edodes*, *F. velutipes*, *H. erinaceus* и *C. militaris*, которые имеют ряд преимуществ по сравнению с ранее известными [48-51; 107; 114; 116-118; 120-123; 132; 134; 135-137; 513; 514]. Для этого нами проводилось изучение эффективности использования посевного материала, активизированного путем кратковременного облучения светом низкой интенсивности, для увеличения скорости обрастания ими субстратов. Учитывались

продолжительность процессов формирования примордиев, количество и габитус плодовых тел, урожайность и динамика плодоношения.

6.1. Изучение динамики развития макромицетов на агаризованных питательных средах

Изучение скорости линейного роста макромицетов на агаризованных средах и определение ростового коэффициента, показало, что линейный рост не всегда является достоверным показателем эффективности световых воздействий и активности посевного материала, так как не учитывает высоту и плотность мицелия [раздел 4, 134]. Показатели линейного роста на сусло-агаре мицелия *L. edodes*, облученного в разных диапазонах длин волн, достоверно не отличались от контроля. Однако, за счет формирования более высокого и плотного мицелия при облучении, в опыте ростовой коэффициент в 2-3 раза выше. У *F. velutipes*, *P. ostreatus* и *H. erinaceus* отмечалось как увеличение скорости линейного роста, так и ростового коэффициента более, чем в 2-3 раза. У *F. velutipes* и *C. militaris* среднесуточный прирост мицелия после облучения красным светом был незначительным, тогда как ростовой коэффициент увеличивался почти в 2 и 4 раза соответственно.

Кроме изучения ростовых характеристик, нами исследовались изменения морфологии макромицетов в процессе роста и формирования репродуктивных структур на агаризованных средах после световых воздействий на посевной мицелий.

На рисунке 6.1 продемонстрировано влияние кратковременного облучения на морфологию колонии *C. militaris* на 8-ой день инкубации в темноте на глюкозо-пептон-дрожжевом агаре.



Рис. 6.1. Колонии *C. militaris* на глюкозо-пептон-дрожжевом агаре через 8 суток инкубации; А – после облучения посевного мицелия синим светом (488,0 нм); Б - после облучения посевного мицелия красным светом (632,8 нм)

Через 25 суток инкубации в темноте различия в морфологии колоний *C. militaris* становятся более очевидными (рис. 6.2). Активация посевного мицелия светом низкой интенсивности ускоряет процессы созревания мицелия и перехода его к началу формирования плодоношения, что выражается в появлении пигментации.

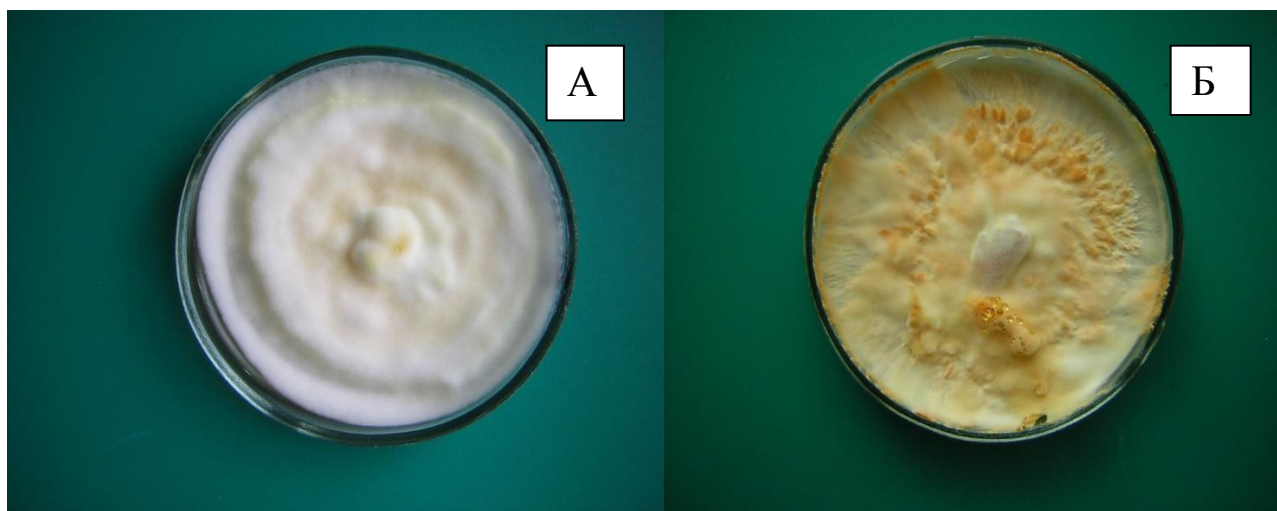


Рис. 6.2. Колонии *C. militaris* на глюкозо-пептон-дрожжевом агаре на 25 день инкубации; А – контроль, без облучения, Б - после облучения посевного мицелия синим светом (488,0 нм)

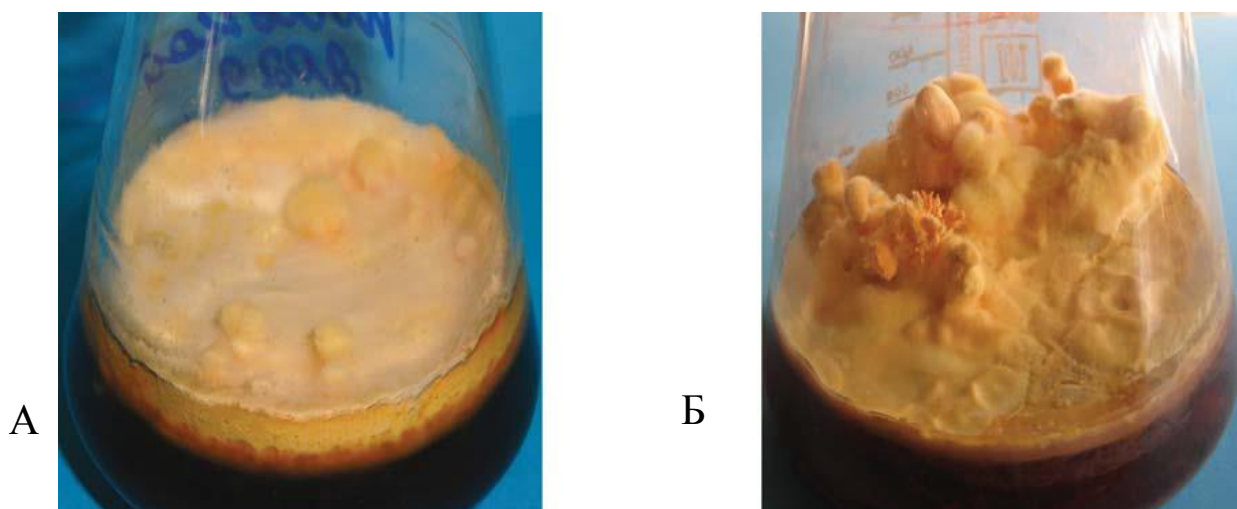


Рис. 6.3. Формирование стром *C. militaris* на жидкой глюкозо-пептон-дрожжевой среде на 70 день инкубации

Примечание: А – контроль, без облучения; Б – после облучения в импульсном режиме синим светом (488,0 нм)

Поскольку процесс поверхностного культивирования и получение плодовых тел *C. militaris* довольно длительный, во избежание высыхания питательной среды аналогичные исследования проводили в колбах, где, по нашему мнению, условия для формирования репродуктивной стадии более благоприятны. Наши исследования динамики развития этого гриба показали, что активация инокулюма путем кратковременного облучения его НИЛИ индуцирует более раннее формирование стром (рис.6.3).

Через 120-130 дней инкубирования *L. edodes* на агаризованной среде, на мицелии подвергавшемся, лазерному излучению начинали формироваться примордии. В контроле в течение 160 суток наблюдений формирования плодовых тел не наблюдалось. После облучения красным светом образование примордиев начиналось на 7-10 дней раньше, чем после облучения зеленым светом, и количество их было значительно большим (Рис. 6.4).



Рис. 6.4. Рост *L. edodes* на агаризованной среде после облучения посевного мицелия красным (А) и зеленым (Б) лазерным светом

Примечание: справа – опыт; слева – контроль, без облучения

Изучение динамики развития *P. ostreatus* на сусло-агаре после облучения светом низкой интенсивности в различных режимах выявило те же тенденции в формировании вегетативных и репродуктивных структур (рис. 6.5). Облучение посевного мицелия индуцировало увеличение скорости роста и формирование более густого мицелия. Появление примордиев и формирование плодовых тел в опыте фиксировали на 5-7 дней раньше, чем в контроле. Наибольшее количество зачатков плодовых тел образовывалось при использовании посевного мицелия, активизированного синим светом.

Аналогичные результаты были получены нами при поверхностном культивировании *F. velutipes* на сусло-агаре. После облучения посевного мицелия синим (488,0 нм) формировался значительно более густой мицелий с большей скоростью линейного роста, на котором формирование примордиев начиналось на 5 дней раньше (рис. 6.6).



Рис. 6.5. Влияние облучения на морфогенез *P. ostreatus* на агаризованной среде



Рис. 6.6. Влияние облучения на морфогенез *F. velutipes* на агаризованной среде

Полученные результаты явились основанием для проведения дальнейших исследований по влиянию режимов активизации посевного

материала на скорость колонизации субстратов, формирование плодоношения, качество и урожайность плодовых тел при твердофазном культивировании на растительных субстратах.

6.2. Методы интенсификации технологических этапов культивирования макромицетов на растительных субстратах

Нами впервые было проведено изучение возможности использования фотоактивированного посевного материала промышленно культивируемых видов съедобных и лекарственных грибов для интенсификации технологических этапов их культивирования [48-51; 107; 114; 116-118; 120-123; 132; 134; 135-137].

Разработка методов интенсификации культивирования базировалась на полученных нами ранее данных о чувствительности разных видов макромицетов к свету низкой интенсивности и активности посевного материала, индуцированной в разных режимах фотообработки.

Исследования проводили на видах, которые в настоящее время культивируются во многих странах мира: *P. ostreatus*, *L. edodes*, *F. velutipes*, *H. erinaceus* и *A. bisporus*. Культивирование проводили как в лабораторных, так и в промышленных условиях. *L. edodes*, *H. erinaceus* и *P. ostreatus* культивировали на субстратных блоках, а *F. velutipes* в стеклянных ёмкостях методами, используемыми в промышленном грибоводстве при интенсивном культивировании [31].

Активизацию посевного материала каждого вида проводили путем облучения в диапазонах тех длин волн, где нами ранее была зафиксирована наибольшая стимуляция ростовых процессов (раздел 4 и 5).

Интенсивная технология поверхностного культивирования макромицетов на растительных субстратах с целью получения плодовых тел включает в себя приготовление маточного мицелия. Эта процедура состоит из первоначальной инокуляции зерна (или другого субстрата) мицелием

выращенным на агаризованных или жидких средах (маточного), инкубацию при температуре 24-26⁰ С до полного обрастания и дальнейшего масштабирования зернового мицелия (маточного). С целью изучения пролонгированности фотоиндуцированной активности посевного материала облучение проводили на разных этапах приготовления посевного мицелия. В первом варианте проводили облучение маточного мицелия, полученного путем глубинного культивирования. После этого им инокулировали предварительно подготовленное стерильное зерно пшеницы и инкубировали до полного обрастания, контролируя при этом скорость колонизации субстрата в опыте и контроле. Затем им инокулировали растительные субстраты, приготовленные как это описано в разделе 2. Во втором варианте проводили облучение зернового мицелия в тех же режимах непосредственно перед его внесением в субстрат. Далее культивирование проводили по общепринятым технологиям контролируя скорость обрастания субстрата, процесс формирования примордиев, количество и габитус плодовых тел, их урожайность, изучали динамику плодоношения. Урожайность определяли, как процентное отношение веса свежих плодовых тел, полученных с одного килограмма увлажненного (60% влажности) субстрата.

Полученные нами результаты, представленные в таблице 6.1, демонстрируют значительное сокращение сроков инкубации до полного обрастания субстрата при использовании фотоактивированного посевного материала. Сравнение двух вариантов зернового мицелия, активированного вышеописанными способами, не показало достоверной разницы при изучении скорости обрастания субстратов ни в одном варианте опыта. Это подтверждает полученные нами и другими исследователями данные о том фотостимуляция имеет пролонгированное действие. Полное обрастание субстратных блоков *L. edodes* сокращалось на 20 дней при использовании света низкой интенсивности в красном и зеленом диапазонах длин волн и на 30 суток при использовании синего света, полученного как из лазерного источника, так и LED.

Таблица 6.1

**Обрастание субстрата (%) инокулированного фотоактивированным
мицелием макромизетов**

Время после инокуляции, сутки	Контроль, без облучения	Красный		Зеленый		Синий	
		632,8 нм	625,0 нм	514,5 нм	522,0 нм	488,0 нм	463,0 нм
L. edodes							
20	20	35	30	25	20	40	35
40	40	60	50	55	50	70	60
60	70	85	80	80	75	95	95
70	85	95	90	90	85	100	100
80	90	100	100	100	100	-	-
100	100						
P. ostreatus							
10	35	45	40	40	40	40	35
20	80	95	90	95	90	85	85
25	95	100	100	100	100	100	100
30	100			-	-	-	-
H. erinaceus							
10	20	40	35	35	30	40	40
20	50	70	60	60	55	75	70
25	60	85	80	70	60	90	85
30	80	100	100	95	90	100	100
40	100			100	100	-	-
F. velutipes							
5	25	30	25	Исследования не проводились		35	30
10	50	60	60			70	70
15	85	100	95			100	100
20	100		100			-	-

Примечание: (-) – исследования не проводились

Активизация посевного мицелия *P. ostreatus* во всех режимах облучения, а *F. velutipes* в синем диапазоне длин волн и красном (лазерный), позволило сократить время инкубации до полного обрастания субстрата на 5 суток. Облучение посевного материала *H. erinaceus* красным и синим светом разной когерентности дало возможность сократить указанный этап культивирования на 10 суток.

Сравнительный анализ стимулирующего эффекта кратковременного облучения светом низкой интенсивности на рост изученных макромицетов на растительных субстратах выявил ту же тенденцию, подтверждающую теорию, выдвинутую ранее упомянутыми исследователями [77]. В наших исследованиях, наибольший период сокращения сроков культивирования на этапе колонизации субстрата (до 30 суток) отмечался у медленно растущего вида *L. edodes*.

В ходе изучения процесса формирования плодоношения у этих макромицетов установлено более раннее начало плодоношения на субстратах, инокулированных зерновым мицелием, активизированным в различных режимах облучения. У *L. edodes* плодоношение начиналось на 35-40 дней раньше при использовании для стимуляции ростовых процессов синего света, на 30 дней – красного и 10-15 дней зеленого (табл. 6.2).

Таблица 6.2.

Характеристика плодоношения *L. edodes* при использовании для инокуляции фотоактивированного посевного материала

Варианты опыта		Среднее кол-во плодовых тел на блоке, шт.	Средняя масса плодового тела, г	Начало плодоношения, сутки после инокуляции	Урожайность, %
1	2	3	4	5	6
Контроль		16	20,0±1,2	160	16,0±0,8
Синий	488,0 нм	24	24,4±1,6*	120	28,0±1,6*
	463,0 нм	23	23,3±1,2	125	26,7±2,4*
Красный	632,8 нм	22	22,9±1,1	130	24,4±1,3*
	625,0 нм	20	23,2±1,3	130	23,6±3,0*

Продолжение таблицы 6.2

1	2	3	4	5	6
Зеленый	514,5 нм	22	21,8±1,3	145	21,9±1,5*
	522,0 нм	18	22,1±1,21	150	19,7±1,1*

Примечание: * - обозначено статистически достоверные различия по отношению к контролю, ($p \leq 0,05$) результаты представлены как $M \pm n$ $n=15$

У *P. ostreatus* период до начала плодоношения, в зависимости от режима активизации посевного материала, сокращался на 4-6 дней (табл. 6.3).

Таблица 6.3

Характеристика плодоношения *P. ostreatus* при использовании для инокуляции фотоактивированного посевного материала

Варианты опыта		Среднее кол-во плодовых тел на блоке, шт.	Средняя масса плодового тела, г	Начало плодоношения, сутки после инокуляции	Урожайность, %
Контроль		46	8,0±0,4	30	18,4±0,8
Синий	488,0 нм	56	10,6±0,3*	24	28,2±2,0*
	463,0 нм	54	9,4±0,5*	25	25,3±2,6*
Красный	632,8 нм	55	10,0±0,7*	24	27,3±3,6*
	625,0 нм	52	9,7±0,6*	24	25,0±1,3*
Зеленый	514,5 нм	55	9,6±0,5*	26	26,0±1,6*
	522,0 нм	50	8,5±0,3	26	21,4±0,6*

Примечание: * - обозначено статистически достоверные различия по отношению к контролю, ($p \leq 0,05$) результаты представлены как $M \pm n$ $n=15$

У *H. erinaceus* этот период сокращался на 11-15 дней (табл. 6.4) и у *F. velutipes* – на 4-12 (табл. 6.5). При этом нами отмечены очевидные преимущества использования синего и красного света разной когерентности, по сравнению с зеленым, для интенсификации технологических этапов культивирования этих макромицетов.

Таблица 6.4

Характеристика плодоношения *H. erinaceus* при использовании для инокуляции фотоактивированного посевного материала

Варианты опыта		Среднее кол-во плодовых тел на блоке, шт.	Средняя масса плодового тела, г	Начало плодоношения, сутки после инокуляции	Урожайность, %
Контроль		10	30,2±3,8	47	15,0±0,8
Синий	488,0 нм	7	66,4±4,2*	32	23,2±1,4*
	463,0 нм	9	52,0±2,6*	35	23,4±2,7*
Красный	632,8 нм	8	56,7±4,9*	33	22,0±1,4*
	625,0 нм	10	46,8±3,3*	33	23,5±2,6*
Зеленый	514,5 нм	8	49,9±5,6*	36	20,6±0,9*
	522,0 нм	9	51,4±1,8*	36	22,9±2,5*

Примечание: * - обозначено статистически достоверные различия по отношению к контролю, ($p \leq 0,05$) результаты представлены как $M \pm n$ $n = 10$ -

Таблица 6.5

Характеристика плодоношения *F. velutipes* при использовании для инокуляции фотоактивированного посевного материала

Варианты опыта		Среднее кол-во плодовых тел на блоке, шт.	Средняя масса плодового тела, г	Начало плодоношения, сутки после инокуляции	Урожайность, %
Контроль		23	1,6±0,1	52	14,7±1,4
Синий	488,0 нм	28	2,2±0,2*	40	24,1±2,5*
	463,0 нм	26	2,0±0,1*	46	20,8±1,2*
Красный	632,8 нм	30	1,9±0,2	44	22,8±3,3*
	625,0 нм	25	2,1±0,1*	48	21,4±2,2*

Примечание: * - обозначено статистически достоверные различия по отношению к контролю, ($p \leq 0,05$) результаты представлены как $M \pm n$ $n=15$

Характеризуя плодоношение контрольных и облученных штаммов *P. ostreatus* и *L. edodes*, можно отметить, что облучение зернового инокулюма в используемых режимах индуцирует формирование большего количества плодовых тел, немного увеличивается их масса. У *F. velutipes* также отмечалось увеличение среднего количества плодовых тел на банку и их массы (25,0-37,5 %) при использовании инокулюма, активизированного синим светом (рис. 6.7). Для *H. erinaceus* характерно уменьшение количества плодовых тел на опытных блоках, но зато значительно увеличивается их размер и масса по сравнению с контролем.



Рис. 6.7. Влияние облучения (488 нм) на плодоношение *F. velutipes* на 40-й день после инокуляции

Изучение динамики плодоношения *L. edodes*, *P. ostreatus* и *H. erinaceus* в разных вариантах опыта показало, что после облучения плодоношение этих грибов имеет четко выраженную первую "волну", которая приходится на первую неделю плодоношения. В контроле у всех изученных видов грибов максимум плодоношения приходится на вторую неделю. Вторая "волна" плодоношения после облучения инокулюма *L. edodes* и *H. erinaceus* наблюдается на 9-й и 4-й неделе плодоношения соответственно, а в контроле у *L. edodes* на 10-й и у *H. erinaceus* на 5-й неделе (Рис. 6.8). Таким образом, облучение способствует сокращению периода, предшествующего плодоношению, и сроков плодоношения. При этом происходит значительное увеличение урожайности плодовых тел.

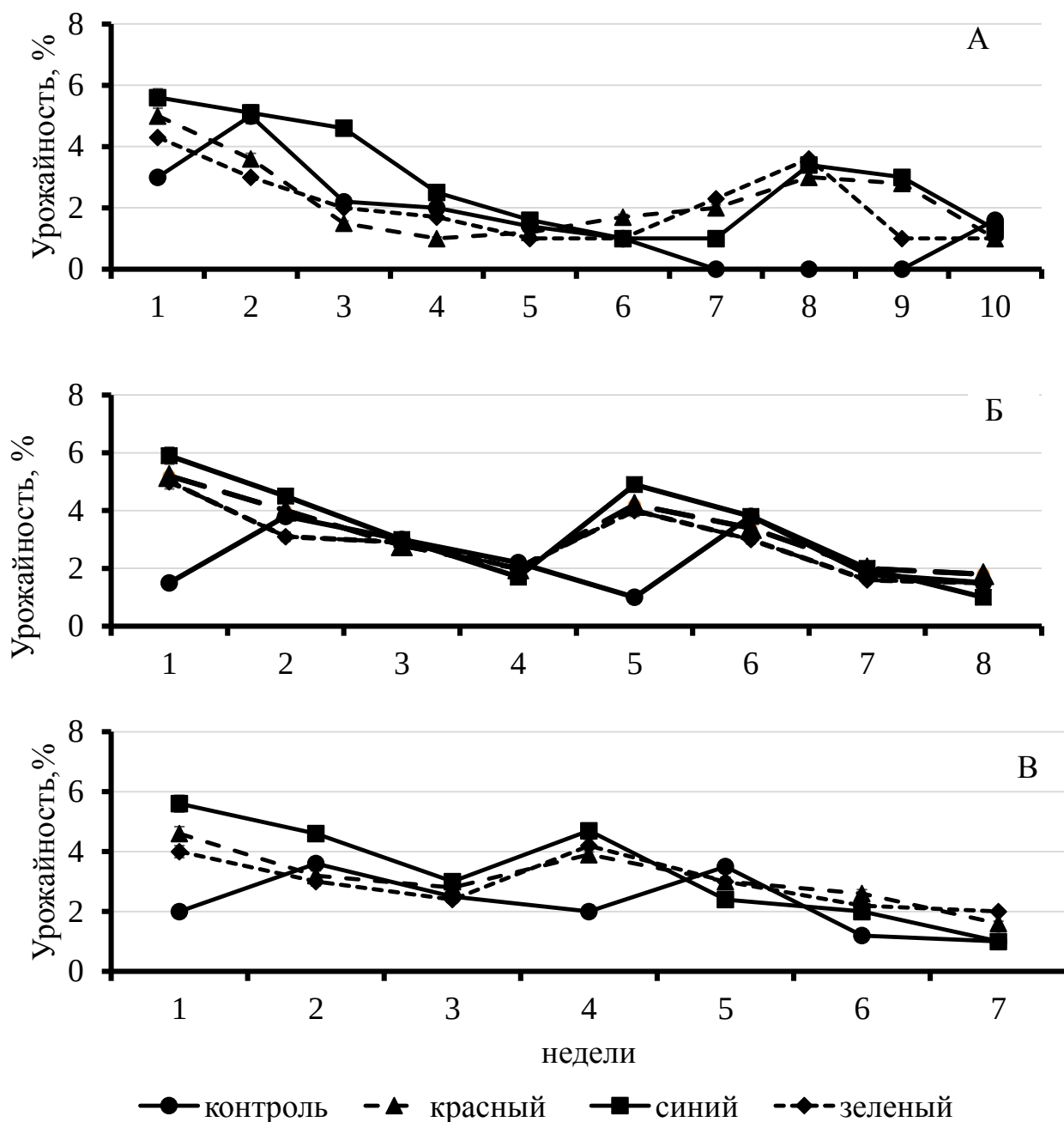


Рис. 6.8. Динамика плодоношения макромикетов: А - *L. edodes*, Б - *P. ostreatus*, В - *H. erinaceus*

Сравнительный анализ стимулирующего эффекта, полученного после облучения зернового посевного мицелия макромикетов в импульсном и непрерывном режиме в синем и красном диапазонах длин волн, не показал достоверной разницы в скорости обрастания субстрата и начала плодоношения ни у одного из изученных видов. Однако, при этом увеличение урожайности, при использовании для инокуляции посевного

мицелия активизированного импульсным светом в красном и синем диапазоне длин волн, по сравнению с непрерывным, нами получено при культивировании *H. erinaceus* (на 4,8 и 4,1% соответственно) (рис. 6.9). Для остальных видов эти отличия были незначимы.

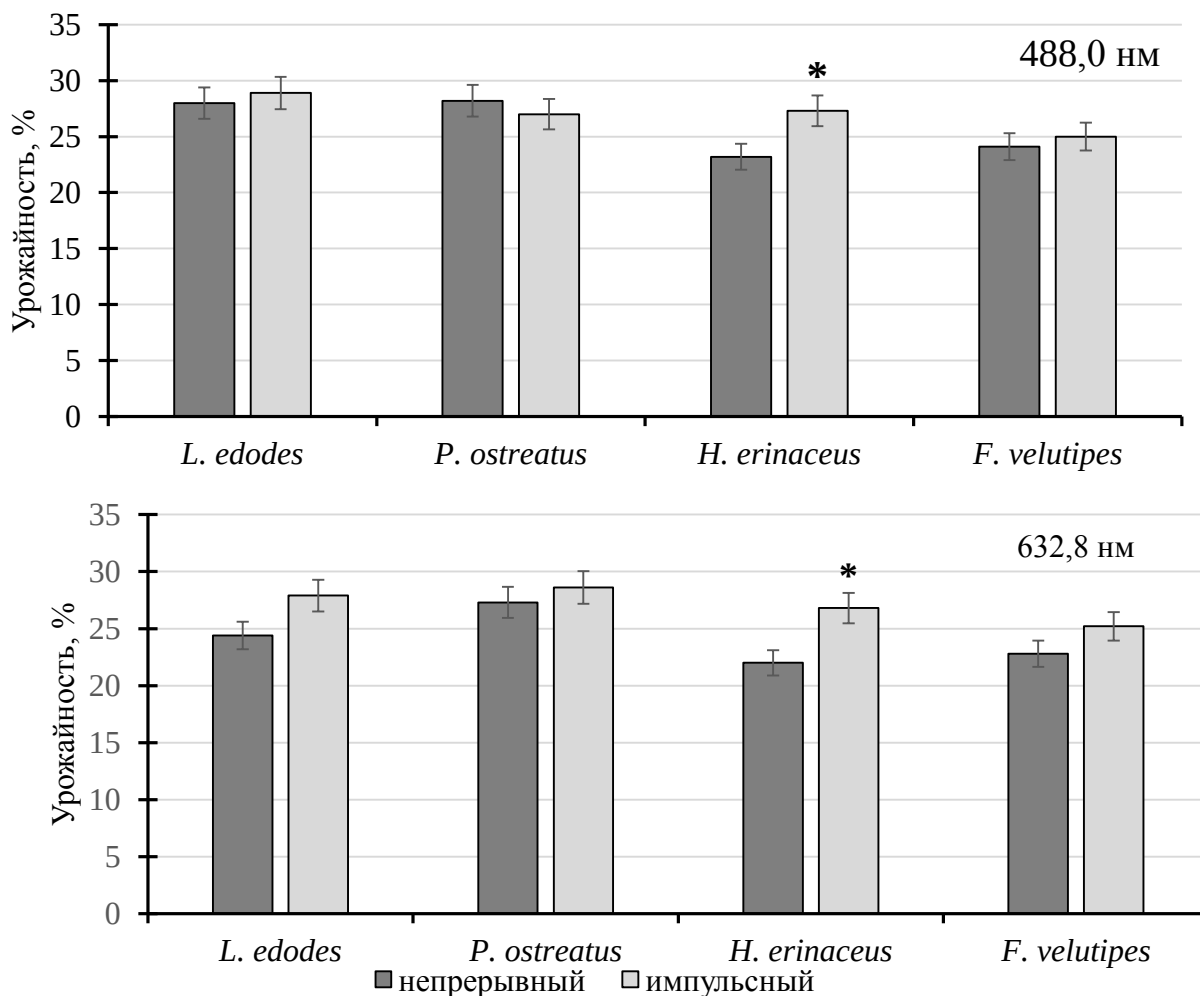


Рис. 6.9. Влияние природы света на урожайность макромицетов

Примечание: * - обозначено статистически достоверные различия по отношению к облучению непрерывным светом, ($p \leq 0,05$) результаты представлены как $M \pm n$ $n=10-15$

В промышленном грибоводстве, также как и в биотехнологиях глубинного культивирования макромицетов, важным фактором, определяющим экономическую эффективность процесса, является количество посевного материала используемого для инокуляции определенного количества субстрата. Нами впервые была доказана, возможность снижения количества посевного мицелия, при условии его

предварительной активизации путем кратковременного облучения светом низкой интенсивности, при глубинном культивировании вышеуказанных макромицетов [разделы 4 и 5; 134; 140].

Исследования, проведенные нами в производственных условиях на грибоводческом комплексе агрокомбината «Пуща Водица» с *P. ostreatus* 431 и *A. bisporus* 5437 [25; 118; 120; 122], а также полученные нами лабораторные данные убедительно доказывают перспективность световой активации мицелия перед инокуляцией субстрата [134; 136; 137].

Облучение посевного зернового мицелия проводили непосредственно перед инокуляцией. При выборе режима облучения руководствовались полученными ранее данными о фоточувствительности этих макромицетов. В обоих случаях для активизации посевного материала использовали некогерентный свет с длиной волны 625 нм. Для определения возможности уменьшения количества инокулюма после его фотактивизации, посевной мицелий вносили в субстраты в разных дозах и контролировали процессы разрастания мицелия и плодоношения.

В качестве субстрата для получения плодовых тел *P. ostreatus* использовали пшеничную солому 60% влажности. Термическую обработку соломы проводили в следующем режиме: нагревание до 60 °С – 6 часов; поддержание температуры на максимальном уровне (60 °С) – 4 часа; понижение температуры до 50-55 °С и поддержание этой температуры в течение 20 часов; охлаждение до 25-28 °С – 6 час. Мицелий вносили в субстрат из расчета 5%, 2,5% и 1,2% от массы влажного субстрата. Культивирование проводилось по применяющейся на комбинате технологии [52].

Изучение характера обрастания субстрата, инокулированного разными дозами облученного и необлученного мицелия *P. ostreatus*, позволило установить, что при одинаковом внесении облученного и необлученного мицелия в субстрат полное обрастание в первом варианте происходит на

несколько дней раньше, чем при инокуляции необлученным мицелием (табл. 6.9).

Таблица 6.9

Характеристика роста *P. ostreatus* при разных дозах внесения активированного и неактивированного посевного мицелия

Количество посевного мицелия, % к массе готового субстрата	Степень обрастания субстрата, баллы		Количество субстратных блоков с примордиями, % к общему количеству	
	6 суток после инокуляции	13 суток после инокуляции	16 суток после инокуляции	20 суток после инокуляции
инокуляция неактивированным мицелием				
5	4	5	20	80
2,5	3	5	0	60
1,2	2	5	0	0
инокуляция активированным мицелием				
5	5	5	60	100
2,5	4	5	20	100
1,2	3	5	0	60

Примечание: 1 – начало колонизации субстрата; 2 – отдельные очаги обрастания; 3 – 40-60% обрастания субстрата; 4 – 70 – 90% обрастания субстрата; 5 – 100% обрастание субстрата

Уменьшение в 2-4 раза количества вносимого необлученного мицелия значительно снизило скорость колонизации субстрата грибом (на 7 - 14 суток). В то же время, сравнивая показатели роста активированного мицелия при дозе его внесения 2,5% и не активированного при 5% инокуляции, можно отметить, что характер роста мицелия и время полного обрастания субстратных блоков практически не различаются (табл. 6.9). Параметры роста мицелия на субстрате, инокулированном 1,2% облученного зернового мицелия, равнозначны ростовым показателям в варианте субстрата, который инокулирован 2,5% необлученного посевного мицелия. Образование же примордиев во всех вариантах использования облученного мицелия

происходит значительно раньше, чем в контроле. Кроме того, облучение посевного мицелия способствовало одновременному образованию большего количества примордиев.

В связи с выше изложенным максимум урожайности в опытных вариантах приходится на 1 волну, которая наблюдается на 1-ой неделе плодоношения. На блоках, инокулированных 2,5 и 1,2% необлученного мицелия, наибольшее количество грибов собирали во вторую и третью неделю плодоношения (табл. 6.10, рис. 6.10).

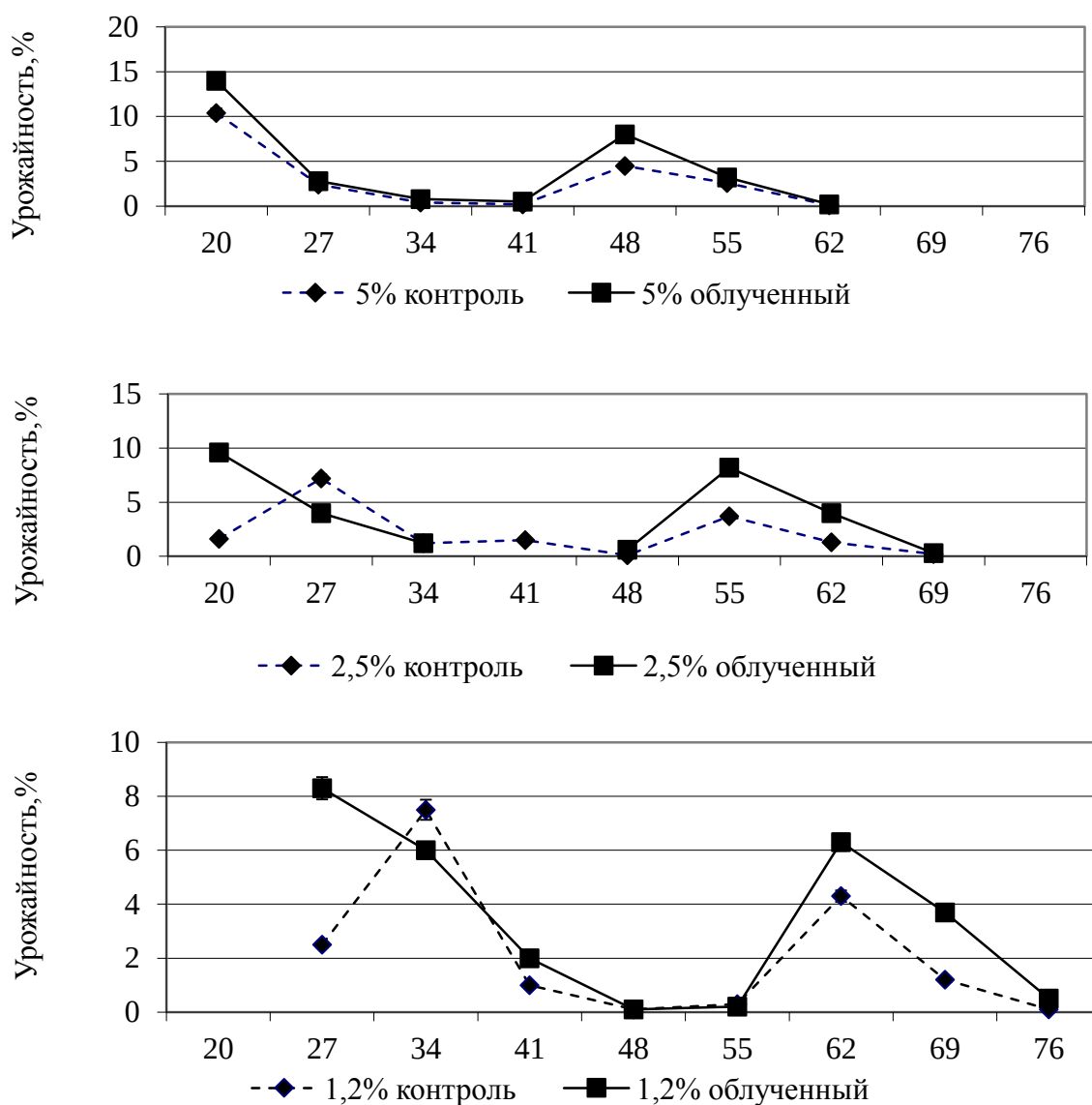


Рис. 6.10. Динамика плодоношения *P. ostreatus* при разных дозах внесения посевного мицелия

Сравнивая урожайность плодовых тел в разных вариантах опыта и в контроле, можно утверждать, что эффект облучения увеличивается при снижении дозы вносимого в субстрат мицелия. Урожайность увеличивается уже при минимальной дозе внесения облученного мицелия (1,2%) по сравнению с максимальной дозой внесения необлученного мицелия (5 %) и составляет 27,1 и 20,6% соответственно. Однако при 5%-ной инокуляции облученным мицелием урожайность увеличивается на 43% а при 1,2%-ной инокуляции облученным мицелием - на 60% по сравнению с теми же дозами необлученного мицелия.

Необходимо также отметить, что уменьшение дозы внесения активизированного мицелия не столь значительно влияет на снижение урожайности *P. ostreatus*, как снижение количества необлученного мицелия. Так, при работе с необлученным мицелием снижение дозы посевного материала с 5% до 1,2% приводило к снижению урожайности на 18%, а при работе с облученным мицелием - лишь на 8% (табл. 6.10).

Таблица 6.10

Плодоношение *P. ostreatus* при разных дозах внесения посевного мицелия

Количество посевного мицелия, % к массе готового субстрата	Урожайность, % свежих плодовых тел к сырому субстрату									Общая урожайность, %
	Сутки после инокуляции									
	20	27	34	41	48	55	62	69	76	
5	Инокуляция необлученным мицелием									20,6
	10,4	2,4	0,4	0,2	4,5	2,6	0,1	-	-	
2,5	1,6	7,2	1,2	1,5	0,1	3,7	1,3	0,2	-	18,4
1,2	-	2,5	7,5	1,0	0,1	0,3	4,3	1,2	0,1	16,9
5	Инокуляция облученным мицелием									29,5
	14,0	2,8	0,8	0,5	8,0	3,2	0,2	-	-	
2,5	9,6	4,0	1,2	0,1	0,6	8,3	4,0	0,3	-	27,9
1,2	-	8,3	6,0	2,0	0,1	0,2	6,3	3,7	0,5	27,1

Примечание: (-) – плодовые тела отсутствуют

Если в цикле развития изученных нами ранее макромикетов свет необходим для формирования плодовых тел, то *A. bisporus*, отличающийся своим отношением к этому важному в жизненном цикле многих грибов экологическому фактору, представляет особый интерес. Развитие *A. bisporus* на всех этапах культивирования происходит практически при полном отсутствии света. Кроме того, он является во многих странах мира наиболее широко культивируемым съедобным грибом. Наряду с высокими показателями питательной ценности и прекрасными органолептическими качествами шампиньон двуспоровый обладает также ценными лечебно-профилактическими свойствами. Было установлено, что так же, как и лекарственные дереворазрушающие грибы шампиньон при употреблении в пищу снижает уровень холестерина в крови, его плодовые тела оказывают гепатопротекторное действие, ингибируют развитие ряда опухолей [278; 564; 581; 627].

Многие факторы, такие как состав культивационного компоста и покровной почвы, микроклиматические условия, качество посевного мицелия и пр., влияющие на урожайность шампиньона при промышленном культивировании, хорошо изучены [24]. Известны различные способы повышения продуктивности при культивировании этого гриба: селекция, подбор оптимальных условий и использование в качестве стимуляторов роста различных добавок [25].

Нами впервые для активации прорастания спор, роста моноспоровых культур и вегетативного мицелия *A. bisporus*, шт. 5418, 5422, 5437 использован свет низкой интенсивности в видимом диапазоне длин волн [25; 107; 122; 134; 136; 137; 523]. Полученные нами данные свидетельствуют о перспективности применения метода фотоактивации посевного мицелия при промышленном культивировании шампиньона.

В работе использовали промышленно культивируемый штамм 5437 из Коллекции культур шляпочных грибов Института ботаники им. Н.Г. Холодного НАН Украины. Посевной мицелий гриба получали

общеизвестными способами [24], т.е. маточную культуру с агаризованной среды инокулировали на стерильное отваренное зерно пшеницы. Инкубировали в темноте при температуре 26⁰С до полного обрастания субстрата.

Зерновой посевной мицелий рассыпали тонким слоем на ровной поверхности и облучали красным непрерывным светом с длиной волны 625,0 нм в указанном ранее режиме. После этого его сразу вносили в компост в следующих дозах: 1 - необлученный мицелий (контроль) - стандартная доза (0,30% по весу); 2 - облученный мицелий (опыт 1) – стандартная доза (0,30% по весу) и 3 - облученный мицелий (опыт 2) – половина стандартной дозы (0,15% по весу). В каждом варианте использовалось по 1 т компоста (100 мешков по 10 кг). Культивирование *A. bisporus* проводилось по применяющейся на комбинате технологии [52]. В опытах использовали синтетический шампиньонный компост (в расчете на 1 т сухой соломы), состоящий из 900 кг сухого куриного помета, 100 кг нитрата аммония, 1 т сухой пшеничной соломы.

Грибы, собранные с каждого мешка в три волны плодоношения, взвешивали. Урожайность рассчитывали, как массу свежих грибов на 100 кг компоста в момент инокуляции. Отдельно взвешивали грибы с закрытым покрывалом, соответствующие требованиям, предъявляемым к грибам первого сорта (ТУ 01.1-31747649-003-2002).

Полученные нами данные показали, что кратковременное (8 минут) воздействие красного некогерентного света 230 мДж/см² на вегетативный мицелий шампиньона, выросший на зерне, приводит к его активизации. Это выражается как в увеличении урожайности плодовых тел, так и улучшении их качества. Прибавка урожайности после световой обработки инокулюма составляла 19% (рис. 6.11). Уменьшение дозы облученного мицелия при инокуляции компоста не вызывало замедления процессов обрастания субстрата и снижения плодоношения. Обрастание субстрата и выход плодовых тел были, практически, такими же, как и при внесении стандартной

дозы облученного мицелия. Таким образом, предпосевная обработка зернового мицелия шампиньона двуспорового светом позволяет не только (как минимум в 2 раза) снизить количество посевного мицелия, вносимого в субстрат, но при этом и увеличить урожайность плодовых тел на 19%. Максимально эффект светового воздействия проявляется во второй волне плодоношения. Прибавка урожайности во второй волне плодоношения была наибольшей – 14,7% (при внесении стандартной дозы облученного инокулюма) и 24,8% (при внесении половины стандартной дозы облученного инокулюма).

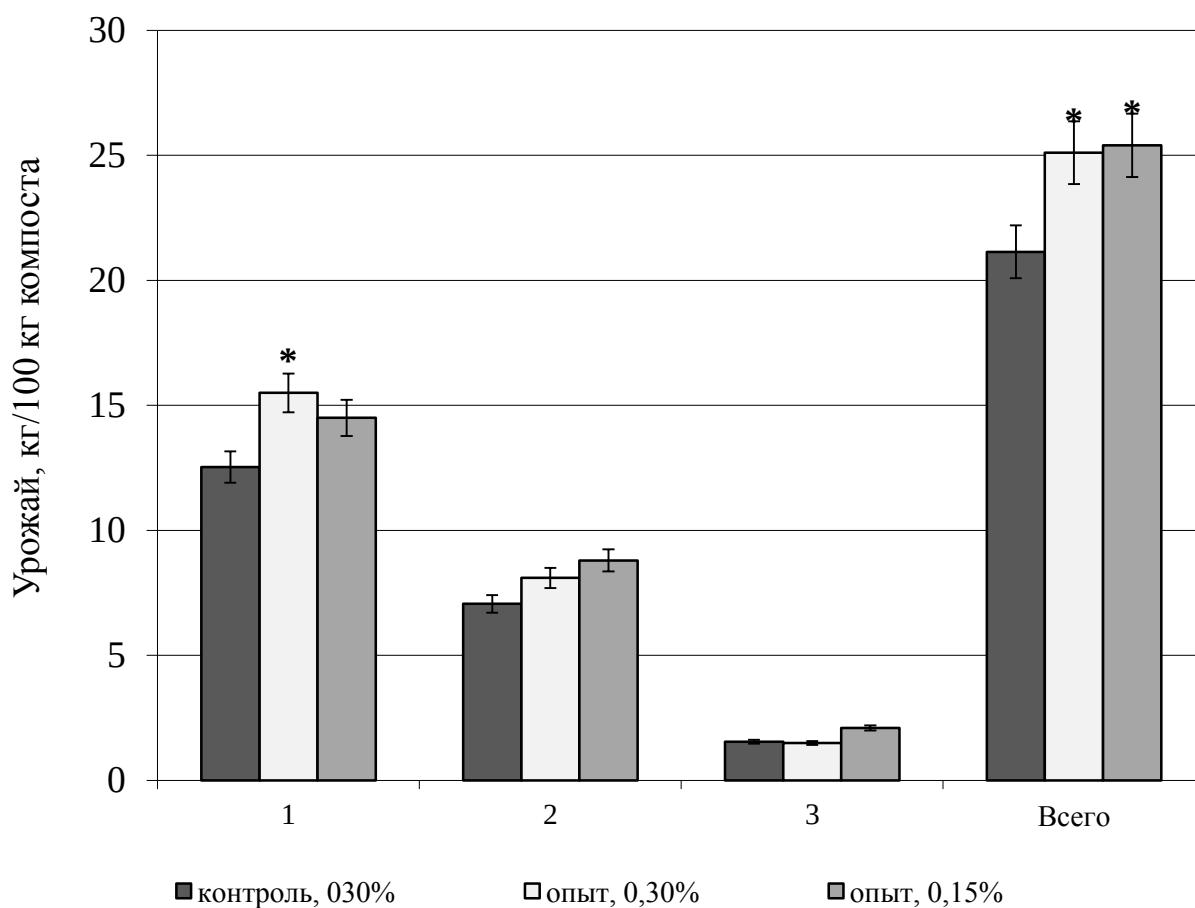


Рис. 6.11. Урожайность *A. bisporus* при использовании разного количества активированного посевного мицелия

Примечание: * - обозначено статистически достоверные различия по отношению к контролю, ($p \leq 0,05$) результаты представлены как $M \pm n$ $n = 10$

Мы отметили также возрастание количества плодовых тел гриба первого сорта - на 18,0% при инокуляции компоста стандартной дозой облученного мицелия и на 8,6% при инокуляции половиной стандартной дозы облученного мицелия (рис. 6.12). Положительное влияние предпосевной обработки мицелия светом на качество плодовых тел наиболее очевидно во время первой и второй волн плодоношения.

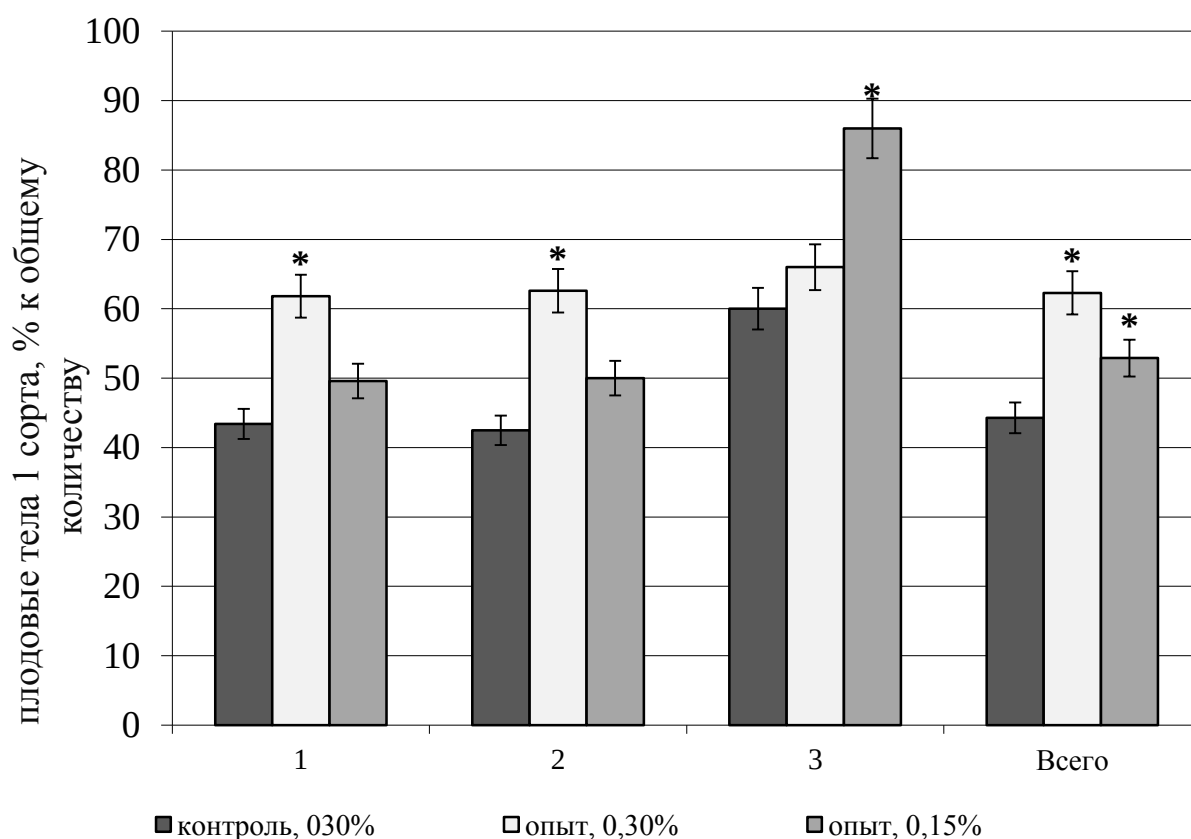


Рис. 6.12. Количество плодовых тел *A. bisporus* первого сорта при использовании активированного посевного мицелия.

Примечание: * - обозначено статистически достоверные различия по отношению к контролю, ($p \leq 0,05$) результаты представлены как $M \pm n$ $n = 100$

Полученные нами результаты свидетельствуют о целесообразности фотоактивации посевного мицелия шампиньона двуспорового, что позволит, в условиях промышленного культивирования снизить дозу вносимого в компост инокулюма, увеличить урожайность и улучшить качество плодовых

тел этого популярного в мире съедобного гриба с лекарственными свойствами.

Результаты по влиянию кратковременного облучения светом низкой интенсивности, с различными спектральными и поляризационными характеристиками, на развитие макромицетов продемонстрировали пролонгированность фотоиндуцированной стимуляции их ростовой активности, которая передавалась от спор к мицелию, вплоть до формирования плодовых тел, что доказывает целесообразность использования такого подхода для модификации существующих биотехнологий. Разработанные методы не менее эффективны и более экономичны, чем предлагаемые другими исследователями методы фотостимуляции биологической активности макромицетов путем продолжительного освещения на разных стадиях онтогенеза [193; 453; 484], поскольку не требуют оборудования помещения специальными системами освещения, дополнительных площадей для их размещения, энергозатрат и обслуживающего персонала.

Высокая эффективность внедрения разработанных нами методов и подходов фотоактивации посевного материала и его использования в технологиях культивирования макромицетов, кроме сказанного выше, достигается за счет следующих установленных нами фактов:

- перспективность использования энергоэффективных систем облучения на основе свет излучающих диодов, позволяющее получать показатели стимуляции роста и развития макромицетов, сопоставимые с используемыми для тех же целей более дорогостоящих и менее доступных источников лазерного света;
- сокращение сроков обрастания субстрата и длительности периода плодоношения (*F. velutipes* – на 6-12 суток, *H. erinaceus* – на 12-15 суток, *L. edodes* – на 30-40 суток и *P. ostreatus* – на 4-6 суток), что позволяет сократить затраты на поддержание микроклимата

помещения и уменьшить вероятность инфицирования субстратов посторонней микрофлорой;

- уменьшение количества облученного посевного мицелия при инокуляции сокращает количество зерна и трудозатраты для его приготовления;
- повышение урожайности плодовых тел *F. velutipes* - на 50-63%, *H. erinaceus* – на 47-57%, *L. edodes* – на 67-75%, *P. ostreatus* – на 40-56% и *A. bisporus* – 10-19%;
- улучшение качества и товарного вида плодовых тел (увеличение плодовых тел первого сорта у *A. bisporus* на 18%) увеличит их стоимость.

Таким образом, свет низкой интенсивности может выступать как стимулятор биологической активности не только у видов грибов, осуществляющим формирование плодовых тел в условиях чередования темноты и освещения, как например *A. bisporus*.

Результаты исследований представленные в разделе 6 освещены в следующих публикациях: 48-51; 107; 114; 116-118; 120-123; 132; 134; 135-137; 513; 514.

РАЗДЕЛ 7.

ПРАКТИЧЕСКОЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

В современных экологических условиях наибольшую актуальность приобретают прецизионные биотехнологии, основанные на строго дозированном использовании различных регуляторных факторов. Особое место среди факторов воздействия занимает излучение видимой области спектра. Свет играет чрезвычайно важную роль не только в жизни фотосинтезирующих но и организмов, управляя различными механизмами, вплоть до экспрессии генов. Фотобиологические процессы хорошо изучены и среди них наблюдают феномен фотостимуляции, имеющий важное практическое значение, который получил должное теоретическое обоснование и применение в растениеводстве. В то же время, несмотря на прогресс, который наблюдается в последние годы при изучении фоторецепции и фотоморфогенеза грибов, и значительный фактический материал [83; 84; 237; 257-260; 354; 365; 406; 594], практическое применение накопленных знаний в технологиях культивирования макромицетов весьма ограничено.

Изучение мирового опыта практического использования света в биологии, медицине и сельском хозяйстве, как регулятора жизнедеятельности различных организмов, дало нам основания предположить, что этот фактор может быть использован для повышения эффективности технологических процессов культивирования макромицетов.

Наши исследования, направленные на разработку способов стимуляции и регуляции биологической активности макромицетов, имеющих практическое значение, базировались на результатах анализа механизмов

фотоморфогенеза и фоторецепции не только грибов, но и других биологических объектов. Несмотря на огромное разнообразие фотобиологических реакций у различных организмов установлены и универсальные клеточные механизмы фотостимуляции. Их изучение привлекло внимание исследователей с середины шестидесятых годов прошлого столетия, сразу после появления первых серийных моделей лазеров. Уже в то время было показано, что кратковременное (от единиц секунд до десятков минут) воздействие когерентного света с интенсивностью, не превышающей естественный фон, способно существенно повысить функциональную активность животных и растительных клеток. Такой неэнергоемкий и экологически чистый регуляторный фактор представлял особый интерес.

На базе лазерных источников излучения созданы способы и технологические приемы, позволившие сократить применение гормональных препаратов и пестицидов, повысить продуктивность и экологическую устойчивость многих сельскохозяйственных культур и животных, улучшить качество получаемой продукции. В растениеводстве фотостимуляцию применяли для предпосевной обработки семян, досветки овощных культур в закрытом грунте, облучении вегетирующих растений. В настоящее время прогресс в развитии технологии синих, зеленых, красных светоизлучающих диодов сделал возможным использовать определенные участки оптического спектра с точным контролем интенсивности излучения для регуляции роста и биологической активности различных организмов. Однако, сфера их использования ограничена постоянным освещением на различных стадиях развития. Практический опыт показал, что использование света низкой интенсивности перспективно для сельского хозяйства, так как обеспечивает более полную реализацию генетического потенциала растений и животных. Рентабельность световой обработки экономически обоснована и подтверждается многолетними результатами применения в различных странах.

В то же время механизмы биорегуляторного действия света нельзя считать до конца исследованными и выбор оптимальных режимов обработки требует более глубокого обоснования. Определить оптимальные параметры светового воздействия, при которых можно было бы гарантировать полезный эффект биостимуляции реально только при учете всех факторов, определяющих ответные реакции живых организмов. Основные сложности при этом заключаются не только в разнообразии и индивидуальном различии морфологических структур, тканей и клеток живых организмов, но и в постоянном изменении их состояния, чувствительности к световому воздействию. И здесь возникает много вопросов, на которые пока нет однозначных ответов. Например, почему индуцированные низкоинтенсивным излучением эффекты наблюдаются в различных спектральных диапазонах? Из множества обнаруженных акцепторов исследователи никак не могут выбрать единственный, самый главный, и вынуждены заниматься бесконечным поиском акцептора для каждой длины волны, предлагают различные варианты механизмов фотобиологического действия [388; 389]. В настоящее время все больше исследователей склонны признавать, что пусковой механизм, индуцированных низкоинтенсивным светом биологических реакций является единым, универсальным и обусловлен, скорее всего, универсальностью механизмов поддержания гомеостаза [77]. Немногочисленные универсальные по своей природе первичные фотобиологические реакции вызывают разнообразные биохимические и физиологические ответы, которые представляют собой комплекс адаптационных и компенсационных реакций, направленных на восстановление и активизацию метаболизма клеток и повышение их функциональной активности [98; 99]. Это происходит вследствие кальцийзависимого повышения редокс-потенциала митохондрий, их функциональной активности и синтеза АТФ [77]

В настоящее время доказано, что когерентные свойства лазерного излучения не проявляются на молекулярном уровне при взаимодействии с

биотканью [602; 603]. При облучении клеточных монослоев когерентный и некогерентный свет одинаковой длины волны и дозы вызывают идентичный биологический отклик, что хорошо документировано в экспериментах с различными биообъектами [391]. Дополнительное (к основному механизму, связанному с поглощением света соответствующими хромофорами) действие излучения именно от лазерного источника может случиться только в более глубоких слоях из-за случайной интерференции световых волн.

Более полные спектры действия как по диапазону длин волн, так и по количеству отдельных длин волн, использованных для облучения, были получены для стимуляции синтеза ДНК и РНК в пролиферирующих и покоящихся клетках HeLa [77; 616]. Эти данные дали основания полагать, что в случае ускорения пролиферации клеток, первичные фотоакцепторы находятся в митохондриях и стимулирующие эффекты света связаны с интенсификацией окислительного метаболизма. Вызванные коротковременным облучением изменения соизмеримы с временем облучения и являются обратимыми. Генерированный таким образом фотосигнал «запоминается клеткой» в ходе каскада биохимических реакций, связанных с изменениями параметров гомеостаза. Известно, что в дрожжевых клетках, предшественники которых 6-7 поколений назад были облучены лазером, сохраняется повышенная активность дыхательных ферментов [390] и изменена структура митохондрий [19; 89]. Установленный факт свидетельствует о том, что многие биохимические реакции в клетках имеют место в течение часов и даже дней после сеанса облучения, которое длится, как правило, в пределах от нескольких секунд до нескольких минут [77]. Сигнальная индукция каскада биохимических изменений, регулирующих развитие, обнаружена и у грибов [258; 260; 424].

Основываясь на теории об универсальности процессов фотостимуляции и информации о том, что основные физические и химические изменения, вызванные светом в фотоакцепторных молекулах, сопровождаются каскадом биохимических реакций в клетке, которые не

требуют дальнейшей активизации светом (цепи передачи и усиления фотосигнала или клеточная сигнализация), мы выдвинули предположение, что кратковременное низкоинтенсивное облучение не только лазерным, но и некогерентным светом может быть стимулятором роста и биологической активности макромицетов.

Полученные нами результаты исследований впервые показали, что изученные процессы фоторецепции и фотоиндукции у разных видов и штаммов макромицетов, хотя и отличаются своими особенностями, тем не менее, имеют много общего с другими биологическими объектами и, в целом, вписываются в выдвинутую другими исследователями теорию универсальности процессов фотостимуляции. Реакции используемых в нашей работе макромицетов на световые воздействия не всегда давали однозначные ответы на дискуссионные вопросы, такие как, существует ли преимущество когерентного и импульсного света перед некогерентным и непрерывным при стимуляции их активности. Однако, проведённые нами исследования фоточувствительности макромицетов к свету низкой интенсивности разной когерентности в видимом диапазоне длин волн позволили установить общие закономерности и индивидуальные особенности их реакций на световые воздействия и определить эффективные режимы фоторегуляции роста, развития и биосинтетической активности. Проведённый анализ показателей биологической активности макромицетов после световых воздействий дал доказательство того, что свет низкой интенсивности может быть использован для интенсификации технологических этапов их культивирования и для разработки методов стимуляции их активности. Однако, параметры и режимы световой обработки следует корректировать в соответствии с индивидуальной видовой фоточувствительностью и целевыми биологически активными компонентами.

С учётом вышеуказанных факторов нами были разработаны методы фотоактивации посевного мицелия макромицетов с целью дальнейшего его

использования для повышения эффективности биотехнологических процессов получения биомассы, биологически активных компонентов, увеличения урожайности плодовых тел и их качества, сокращения длительности культивирования.

Наиболее эффективная доза облучения посевного материала - 230 мДж/см². Используются условия равных энергетических доз световых воздействий на споры и мицелий, так что для всех видов источников света плотность энергии на поверхности образца одинаковая. Облучение спор и мицелия в непрерывном и импульсном режиме следует проводить непосредственно перед посевом их на питательные среды при полном отсутствии других источников света. Световую обработку сухих спор, в виде споровых отпечатков, и мицелия, выросшего на поверхности агаризованных сред, проводят непосредственно в чашках Петри. Мицелий, выращенный на жидкой питательной среде, облучают в колбах, толщина слоя 1 см. Зерновой мицелий перед облучением распределяют тонким слоем на ровной поверхности.

Энергетическая доза облучения (световая энергия, падающая на единицу площади) определяется как произведение плотности мощности и времени облучения. Плотность мощности излучения измеряется с помощью цифрового оптического измерителя мощности и энергии PM-100D, Thorlabs Inc. со стандартным фотодиодным датчиком мощности S120C, рабочий диапазон 400-1100 нм. Экспозиция выбирается в соответствии с заданной дозой. Импульсный свет рекомендуется использовать с меандром с длительностью 1 мс и периодом повторения 2 мс. Дальнейшее культивирование осуществляется в соответствии с используемой технологией.

7.1. Методы фотоактивации прорастания базидиоспор и роста моноспоровых изолятов

Проведенные нами исследования установили, что кратковременное низкоинтенсивное облучение светом в красном и синем диапазоне длин волн в дозах от 45 до 230 мДж/см² обладает стимулирующим эффектом и позволяет значительно увеличить количество проросших спор у изученных видов макромицетов. Сравнительное изучение влияния света, полученного из разных источников, показало, что базидиоспоры большинства изученных видов более чувствительны к когерентному (лазерному) свету, чем к некогерентному (светодиоды). Для стимуляции прорастания спор и роста моноспоровых изолятов *A. bisporus*, *G. applanatum* и *P. ostreatus* оптимальным является кратковременное облучение, как когерентным, так и некогерентным красным светом, для *F. velutipes*, *G. lucidum* и *H. erinaceus* – красным и синим когерентным светом, и для *L. edodes* – эффективен красный и синий лазерный и LED свет.

В таблице 7.1 представлены рекомендуемые эффективные источники света и длины волн для стимуляции прорастания базидиоспор для разных видов макромицетов. Для стимуляции прорастания базидиоспор *F. velutipes*, *G. applanatum* и *H. erinaceus* предпочтительно использовать лазерные источники света, однако, использование светодиодных источников, излучающих свет в тех же диапазонах длин волн, также целесообразно в силу их доступности, хотя эффект стимуляции некогерентным светом несколько ниже.

Таблица 7.1

**Режимы фотоиндукции прорастания спор и стимуляции роста
моноклониальных изолятов**

Вид	Светодиоды		Лазеры	
	625,0 нм	463,0 нм	632,8 нм	488,0 нм
<i>A. bisporus</i>	 (13)	O	 (19)	O
<i>F. velutipes</i>	 (5.6)	 (6.3)	 (17)	 (18)
<i>G. applanatum</i>	 (12)	O	 (18,5)	O
<i>G. lucidum</i>	 (20)	 (22)	 (27)	 (26)
<i>H. erinaceus</i>	 (4.2)	 (4.4)	 (7)	 (6.4)
<i>L. edodes</i>	 (3.3)	 (3)	 (3.3)	 (2.9)
<i>P. ostreatus</i>	 (9.3)	O	 (9.4)	O

Примечание:  – максимальный эффект стимуляции;  – высокий эффект стимуляции; в скобках дано увеличение прорастания спор в количество раз по сравнению с контролем; **O** – стимулирующий эффект отсутствует или незначительный

Предложенные методы фотоиндукции прорастания спор могут быть использованы при интродукции новых штаммов этих макромицетов в чистую культуру и селекции высокопродуктивных штаммов с заданными характеристиками с помощью генетических методов. Кроме того, проросшие споры, в перспективе, могут быть использованы в качестве биодобавок для эффективной профилактики и лечения иммунологических нарушений, гипертонии, гиперхолестеринемии, сахарного диабета, неврастения, гепатопатии, язвенной болезни желудка, онкогенных заболеваний [361; 430].

В современных биотехнологиях культивирования макромицетов, как правило, применяются чистые культуры, которые используют при приготовления посевного материала различными способами. Нами установлено, что изменения, вызванные кратковременными воздействиями света низкой интенсивности на разных онтогенетических стадиях развития макромицетов, имеют пролонгированное действие и могут передаваться от спор к мицелию и на последующие фазы их развития. Поэтому, предлагаемые нами методы интенсификации технологических этапов их культивирования базируются на модификации существующих технологий, которая заключается в использовании в качестве посевного материала мицелия, активированного путем его кратковременного облучения светом низкой интенсивности.

7.2. Методы фотоактивации посевного мицелия для стимуляции роста макромицетов в технологиях глубинного культивирования

Наиболее эффективная доза облучения - 230 мДж/см^2 . Облучение посевного материала следует проводить непосредственно перед инокуляцией на питательные среды при полном отсутствии других источников света. Экспозиция выбирается в соответствии с заданной дозой, как указано выше.

Изучение фоточувствительности макромицетов на разных стадиях онтогенеза позволило определить те из них, на которых световые воздействия вызывают наибольший стимулирующий эффект, выразившийся в увеличении накопления биомассы мицелия, при использовании активированного посевного материала. В таблице 7.2 представлены рекомендуемые фазы развития макромицетов, на которых следует проводить облучение для получения высокоактивного жидкого инокулюма.

Таблица 7.2

Рекомендуемые для фотостимуляции стадии развития макромицетов

Вид	Стадия онтогенеза		
	Споры	Экспоненциальная фаза роста	Стационарная фаза роста
<i>F. velutipes</i>	О	▲	▲
<i>G. applanatum</i>	О	▲	▲
<i>G. lucidum</i>	О	О	▲
<i>H. erinaceus</i>	▲	▲	О
<i>L. edodes</i>	▲	▲	▲
<i>P. ostreatus</i>	О	▲	▲

Примечание: **▲** – значительный стимулирующий эффект; **О** – стимулирующий эффект отсутствует или незначительный

Облучение следует проводить только один раз на одной из рекомендуемых стадий развития. Мицелий, выращенный на жидкой питательной среде, следует облучать в стерильных ёмкостях, распределяя его по максимально плоской поверхности тонким слоем не более 1 см.

Активацию посевного мицелия *F. velutipes*, *G. applanatum* и *P. ostreatus* целесообразно проводить на экспоненциальной и стационарной фазах роста, а *G. lucidum* – в стационарной. Облучение спор *H. erinaceus* приводит к максимальной стимуляции ростовых процессов и накопление биомассы увеличивается почти в три раза по сравнению с контролем. При облучении мицелия в том же режиме на экспоненциальной фазе роста эффект стимуляции на 15-18% ниже, но тем не менее увеличение биомассы было более чем в 2 раза выше, чем в контроле. Фотостимуляция одинаково эффективна на всех изученных стадиях онтогенеза *L. edodes*.

В таблице 7.3. даны режимы активации посевного мицелия макромицетов для стимуляции их роста в глубинной культуре. Эффективность когерентного света низкой интенсивности на 5 – 40 % выше, по сравнению с некогерентным, для видов *C. militaris*, *F. velutipes*, *G. applanatum*, *H. erinaceus*, *I. obliquus*, *L. edodes*, *M. conica*, *M. esculenta* и *P. ostreatus*. Однако, использование светодиодных источников света также целесообразно, поскольку в указанных режимах позволяет получить значительную стимуляцию роста у всех изученных видов.

Таблица 7.3

**Режимы активации посевного мицелия макромицетов для стимуляции
ростовых процессов**

Вид	Светодиоды			Лазеры		
	625 нм	522 нм	463 нм	632.8 нм	514,5 нм	488 нм
<i>C. militaris</i>	▲ (12)	○	○	▲ (20)	○	▲ (26)
<i>F. velutipes</i>	○	○	▲ (44)	▲ (56)	○	▲ (78)
<i>G. applanatum</i>	○	○	▲ (38)	▲ (43)	○	▲ (56)
<i>G. lucidum</i>	▲ (42)	○	○	▲ (67)	○	▲ (75)
<i>H. erinaceus</i>	○	○	▲ (44)	▲ (52)	▲ (43)	▲ (69)
<i>I. obliquus</i>	○	○	▲ (24)	○	○	▲ (57)
<i>L. edodes</i>	▲ (93)	▲ (88)	▲ (104)	▲ (140)	▲ (117)	▲ (154)
<i>M. conica</i>	▲ (14)	○	○	▲ (20)	○	○
<i>M. esculenta</i>	▲ (12)	○	○	▲ (33)	○	○
<i>P. ostreatus</i>	▲ (45)	▲ (44)	○	▲ (57)	▲ (46)	○

Примечание: ▲ – значительный стимулирующий эффект; ○ – стимулирующий эффект отсутствует или незначительный; в скобках даны проценты увеличения биомассы по сравнению с контролем после облучения посевного мицелия в указанных режимах на стационарной фазе роста.

Активизация посевного мицелия в указанных режимах позволяет снижать количество его внесения в ферментационные среды как минимум в 2 раза без снижения продуктивности процесса культивирования всех выше перечисленных видов.

Использование импульсного света (меандр с длительностью 1 мс и периодом повторения 2 мс) позволяет получить дополнительный (от 10 до 30%) стимулирующий эффект по отношению к непрерывному в тех же диапазонах длин волн и энергетической плотности у *C. militaris*, *G. lucidum*, *H. erinaceus*, *L. edodes* и *P. ostreatus*.

7.3. Методы фотоактивации посевного мицелия для стимуляции синтеза полисахаридов макромицетами в технологиях глубинного культивирования

Изучение образования полисахаридов у *G. lucidum*, *L. edodes*, *M. conica* и *M. esculenta* во всех вариантах опыта продемонстрировало корреляцию накопления биомассы и полисахаридов. Наиболее эффективные режимы облучения, стимулирующие не только рост, но и синтез полисахаридов приведены в таблице 7.4.

Облучение импульсным светом увеличивает стимуляцию синтеза полисахаридов у *G. lucidum* на 20%, у *L. edodes* – на 12%, у *M. conica* – на 10% и у *M. esculenta* – на 6%. Облучение вызывает изменения соотношения углеводов в составе полисахаридов у *G. lucidum* и *L. edodes* – уменьшение глюкозы и галактозы и увеличение маннозы.

Таблица 7.4

**Режимы активации посевного мицелия макромицетов для стимуляции
роста и синтеза полисахаридов**

Вид	Светодиоды			Лазеры		
	625 нм	522 нм	463 нм	632.8 нм	514,5 нм	488 нм
<i>G. lucidum</i>	▲ (30/61)	○	○	▲ (48/62)	○	▲ (44/64)
<i>L. edodes</i>	▲ (31/27)	○	▲ (25/35)	▲ (41/33)	▲ (44/19)	▲ (50/39)
<i>M. conica</i>	▲ (16)	○	○	▲ (27)	○	○
<i>M. esculenta</i>	▲ (16)	○	○	▲ (56)	○	○

Примечание: ▲ – значительный стимулирующий эффект; ○ – стимулирующий эффект отсутствует или незначительный; в скобках дан % увеличения количества полисахаридов (экзо-/эндо-) и (экзо-) после облучения посевного мицелия в указанных режимах на стационарной фазе роста.

7.4. Методы фотоактивации посевного мицелия *I. obliquus* для стимуляции биосинтетической активности в технологиях глубинного культивирования

Известны методы стимуляции синтеза меланинов у *I. obliquus*, основанные на знаниях о том, что ферменты фенолоксидазного комплекса базидиальных грибов (о-дифенолоксидаза, лакказы), принимающие участие в синтезе предшественников меланина, являются медьзависимыми [88]. Дополнительное внесение в питательную среду 0,008% ионов меди приводило к увеличению продукции эндомеланина практически в 3 раза, экзомеланина – в 1,5 по сравнению с контрольной средой [23].

Дополнительное внесение в питательную среду возможных предшественников меланиновых пигментов является одним из факторов, регулирующих меланиногенез грибов [88; 91]. Ряд моноциклических фенольных соединений (пирокатехин, тирозин, бензойная и пара-оксибензойная кислоты) в концентрации 0,02% оказывали стимулирующее действие на синтез меланинов. При добавления тирозина и пирокатехина в среду образование пигмента у *I. obliquus* повышалось в 1,5 раза.

Нами впервые разработаны методы стимуляции роста и биосинтетической активности этого макромикета, базирующиеся на использовании экологически чистого фактора – света низкой интенсивности. Кратковременное облучение мицелия *I. obliquus* синим и красным светом при глубинном культивировании приводит к увеличению скорости роста культуры и накоплению биомассы гриба, а также позволяет значительно на 2-3 суток сократить длительность культивирования. Увеличение биомассы при использовании активированного мицелия коррелирует с увеличением синтеза меланина. Облучение посевного материала синим лазерным светом (488 нм) увеличивало количество синтезируемого грибом меланина при глубинном культивировании более чем в 2,5 раза, что сопоставимо с выше указанными результатами полученными другими авторами при использовании в качестве стимуляторов роста и биосинтетической активности ионов меди и предшественников меланиновых пигментов [23]. Синтез меланина достигает стационарной фазы параллельно с накоплением биомассы после облучения лазерным светом с длиной волны 488 нм на 9 сутки, т.е. на 3 дня раньше, чем при использовании неактивированного светом инокулюма. Увеличение меланина происходит за счет фотоиндукции в основном эндомеланина (250% при облучении синим когерентным светом и 180% - некогерентным). Фотоиндуцированное в изученных режимах увеличение синтеза экзомеланина незначительно и составляет не более 7%.

Использование импульсного света в тех же диапазонах длин волн и интенсивности позволяет получить дополнительное увеличение меланина на 30-60%, по отношению к непрерывному (табл. 7.5).

Таблица 7.5

Режимы активации посевного мицелия *I. obliquus* для стимуляции роста и синтеза меланинов

	Светодиоды		Лазеры	
	625 нм	463 нм	632,8 нм	488 нм
Непрерывный	О	▲ (181)	О	▲ (250)
Импульсный	О	▲ (243)	▲ (133)	▲ (276)

Примечание: **▲** – значительный стимулирующий эффект; **О** – стимулирующий эффект незначительный; в скобках даны проценты увеличения меланина по сравнению с контролем после облучения посевного мицелия в указанных режимах на стационарной фазе роста.

Поскольку нами установлена достоверная зависимость фотостимуляции синтеза меланина от концентрации источника азота в среде, то рекомендуемая нами доза азота в среде, при глубинном культивировании активированного мицелия, составляет 2 г/л. Снижение концентрации азота с 4 г/л до 2 г/л увеличивало стимулирующий эффект НИЛИ с длиной волны 488 нм более, чем в 2 раза.

Использование синего когерентного света в технологии глубинного культивирования *I. obliquus* высокоэффективно не только для повышения синтеза меланина, но и увеличения внеклеточной и внутриклеточной активностей тирозиназы и полифенолоксидазы, а также внеклеточной каталазы. Красный когерентный свет может эффективно использоваться как для стимуляции роста мицелия, так и для повышения внутриклеточной и внеклеточной активности полифенолоксидазы, внеклеточной каталазы и тирозиназы, внутриклеточной пероксидазы. Некогерентный свет в большинстве вариантов наших исследований оказывал меньший стимулирующий эффект на биосинтетическую активность *I. obliquus*.

Однако, его применение эффективно и экономически целесообразно при культивировании, направленном на получение меланина, полифенолоксидазы и внеклеточной тирозиназы даже при более низких показателях. Это обусловлено большей доступностью и энергоэффективностью светодиодов [525]. В таблице 7.6 представлены режимы облучения посевного мицелия *I. obliquus*, эффективные для повышения его ферментативной активности.

Таблица 7.6

Режимы активации посевного мицелия *I. obliquus* для стимуляции ферментативной активности

Ферменты		Светодиоды				Лазеры			
		625 нм		463 нм		632,8 нм		488 нм	
		2 г/л N	4 г/л N	2 г/л N	4 г/л N	2 г/л N	4 г/л N	2 г/л N	4 г/л N
Тирозиназа	внутри клеточная	✓	✓	✓	✓	✓	✓	▲	▲
	вне клеточная	○	✓	✓	✓	▲	✓	▲	✓
Полифенол оксидаза	внутри клеточная	✓	✓	✓	✓	✓	✓	○	▲
	вне клеточная	○	✓	○	○	▲	○	▲	▲
Пероксидаза	внутри клеточная	✓	✓	✓	✓	○	▲	▲	○
	вне клеточная	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Каталаза	внутри клеточная	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
	вне клеточная	✓	✓	✓	✓	▲	○	▲	○

Примечание: ▲ – максимальный стимулирующий эффект; ○ – стимулирующий эффект присутствует; ✓ – отсутствие стимулирующего эффекта или подавление ферментативной активности

Использование питательных сред с пониженным содержанием источника азота целесообразно для повышения фотоиндуцированного стимулирующего эффекта при получении меланина, каталазы, внеклеточной тирозиназы и полифенолоксидазы, внутриклеточной пероксидазы.

7.5. Методы фотоактивации посевного мицелия для стимуляции антимикробной активности макромицетов в технологиях глубинного культивирования

Глубинное культивирование – это одно из основных требований, предъявляемых к потенциальным продуцентам антибиотиков, поскольку это позволяет в дальнейшем, при обнаружении перспективного соединения, разработать технологию и стандартизировать его производство. Основные усилия исследователей при этом направлены на определение оптимальных параметров культивирования и факторов регуляции биологической активности продуцента. Исследования факторов, регулирующих антимикробную активность, ограничено подбором питательных сред и источников азота и углерода [497; 607]. Несмотря на большое количество исследований в этом направлении поиск новых экологически чистых регуляторов роста и биологической активности грибов остается актуальным. Нами впервые разработаны методы использования света низкой интенсивности для интенсификации технологических этапов культивирования грибов-продуцентов антимикробных компонентов и увеличения выхода конечного продукта.

Кратковременное облучение посевного материала светом низкой интенсивности в указанных ниже режимах позволило увеличить антимикробную активность *F. velutipes*, *P. ostreatus*, *G. lucidum* и *G. applanatum* практически ко всем 12 используемым в исследованиях тест-

культурам из Всероссийской коллекции микроорганизмов (ВКМ): грамположительные бактерии (*Bacillus subtilis* ATCC 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, клинический изолят), грамотрицательные бактерии (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Comamonas terrigena* ВКПМ В-7571 (=ATCC 8461), *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, грибы (*Aspergillus niger* ИНА 00760, *Saccharomyces cerevisiae* RIA 259 (табл. 7.7). Зеленый свет не оказывал достоверного влияния ни на длительность биосинтеза, ни на уровень активности антимикробных компонентов этих штаммов.

Таблица 7.7

Режимы активации посевного мицелия макромицетов для стимуляции антимикробной активности.

Вид	Светодиоды		Лазеры	
	625 нм	463 нм	632,8 нм	488 нм
<i>P. ostreatus</i>	▲	▲	▲	▲
<i>F. velutipes</i>	▲	▲	▲	▲
<i>G. applanatum</i>	▲	▲	▲	▲
<i>G. lucidum</i>	▲	▲	▲	▲

Импульсный свет более эффективен для повышения активности *P. ostreatus* практически по отношению ко всем используемым в работе тест-культурам кроме *B. mycoides* и *S. aureus* FDA 209P (MSSA), чем непрерывный, у *F. velutipes* – против *B. mycoides* 537, *S. aureus* FDA 209P (MSSA) и *E. coli* ATCC 25922 (25,5%, 33,0% и 24,9% соответственно), у *G. applanatum* - по отношению к *B. subtilis* ATCC 6633 и *S. aureus* FDA 209P

(MSSA) и у *G. lucidum* – против *B. subtilis* ATCC 6633, *S. aureus* FDA 209P (MSSA) и *S. aureus* ИНА 00761 (MRSA).

Кратковременное облучение посевного мицелия в красном и синем диапазонах длин волн способствует сокращению периода культивирования до появления антимикробной активности. Когерентный (лазерный) свет обладал большим стимулирующим эффектом, по сравнению с некогерентным (LED), и облучение им в заданных режимах увеличивало ингибирующую активность культуральной жидкости по отношению к разным тест-культурам для *F. velutipes* на 60-150%, *P. ostreatus* - 100-238%, *G. applanatum* – 30-87% и *G. lucidum* – 30-70%. Однако, использование светодиодных источников позволяет получить достаточно высокие показатели антимикробной активности у *P. ostreatus* (37-180%) и *F. velutipes* (20-100%).

7.6. Методы фотоактивации посевного мицелия для интенсификации технологических этапов твердофазного культивирования макромицетов

Опыт использования искусственного света для стимуляции биологических процессов в растениеводстве и грибоводстве ограничен методами, основанными на постоянном освещении культур на разных стадиях морфогенеза. Однако это требует установки специального освещения на больших площадях, дополнительных затрат энергии и обслуживания.

Нами на примере *P. ostreatus*, *L. edodes*, *F. velutipes*, *H. erinaceus* и *A. bisporus*, впервые разработаны новые методы фотоинтенсификации технологических этапов поверхностного культивирования на твердых субстратах [48-51; 107; 114; 116-118; 120-123; 132; 134; 135-137], которые имеют ряд преимуществ по сравнению с ранее известными. Они базируются

на использовании посевного материала, активизированного путем кратковременного облучения светом низкой интенсивности.

Активация может проводится двумя способами:

- путем облучения маточного мицелия, полученного в процессе глубинного культивирования, как это было описано выше. После этого им инокулируют предварительно подготовленное стерильное зерно пшеницы и инкубируют в темноте при 26⁰ С до полного обрастания;
- путем облучения в тех же режимах зернового мицелия непосредственно перед его внесением в субстрат.

Далее культивирование проводят по общепринятым технологиям.

Использование для этого двух вариантов зернового мицелия, активированного вышеописанными способами, одинаково эффективно. Эффективность выражается в увеличении урожайности, качестве плодовых тел и сокращении времени культивирования. Облучение зернового инокулюма *P. ostreatus*, *F. velutipes* и *L. edodes* в используемых режимах индуцирует формирование большего количества плодовых тел, немного увеличивается их масса, для *H. erinaceus* характерно уменьшение количества плодовых тел после световой обработки, но зато значительно увеличивается их размер и масса. Максимум плодоношения при использовании активированного мицелия у этих видов приходится на первую волну, сокращается длительность процесса культивирования и увеличивается урожайность. В таблице 7.8 приведены эффективные режимы активизации посевного мицелия.

Использование импульсного света в технологиях культивирования этих макромицетов не дает дополнительного значительного эффекта стимуляции роста и плодоношения, по сравнению с использованием непрерывного света в тех же диапазонах длин волн.

Таблица 7.8

Режимы активации посевного мицелия макромицетов для стимуляции роста и плодоношения.

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

Примечание: ▲ – значительный стимулирующий эффект; ○ – стимулирующий эффект незначительный или отсутствует; % увеличения урожайности/ сокращения длительности культивирования (сутки)

Предпосевная фотообработка зернового мицелия *A. bisporus* позволяет не только (как минимум в 2 раза) снизить количество посевного мицелия вносимого в субстрат, но при этом и увеличить урожайность плодовых тел на 19%. Максимально эффект светового воздействия проявляется на первой волне плодоношения.

Разработанная технология использования света низкой интенсивности в видимом диапазоне длин волн для стимуляции роста и регуляции биосинтетической активности съедобных и лекарственных макромицетов: *Agaricus bisporus*, *Lentinula edodes*, *Flammulina velutipes*, *Hericium erinaceus*, *Pleurotus ostreatus*, *Inonotus obliquus*, *Ganoderma applanatum*, *Ganoderma lucidum*, *Cordyceps militaris*, *Cordyceps sinensis*, *Morchella esculenta* и

Morchella conica может использоваться в практике биотехнологии и грибоводстве для сокращения продолжительности культивирования, уменьшения количества посевного материала, регуляции ферментативной активности, увеличения накопления биомассы и повышения урожайности плодовых тел, синтеза меланина, полисахаридов и жирных кислот, при размножении ценного посевного материала.

Разработанный метод фотоиндукции прорастания спор может применяться при экспериментальных исследованиях в области генетики и физиологии грибов, ускоренном выведении новых штаммов-продуцентов, восстановлении в культуре разных видов макромицетов и интродукции их в естественные места обитания для сохранения биоразнообразия.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящее время, несмотря на значительные успехи в создании синтетических лекарственных препаратов и различных пищевых добавок, наблюдается тенденция возвращения к использованию для лечения и поддержания здоровья биологически активных веществ природного происхождения, которые положительно зарекомендовали себя в течение многовековой истории. По прогнозам известных специалистов, в области культивирования грибов сейчас наступает «незеленая революция» вследствие бурного развития производства съедобных и лекарственных грибов и получения продуктов из них. В связи с ухудшением экологической ситуации, уменьшением площади лесов и возрастанием антропогенной нагрузки на них, запасы многих видов грибов, применяемых в традиционной народной, медицине практически исчерпаны. Возрастающий спрос на грибы привел к необходимости их искусственного разведения и расширению ассортимента культивируемых видов грибов. Поэтому актуальной стала интродукция их в чистую культуру и разработка экологически чистых интенсивных технологий их культивирования, что требует глубокого знания факторов регуляции жизнедеятельности и биологической активности грибного организма.

Анализ литературы показал, что мировая наука и практика разработала ряд способов использования искусственного света, как природного фактора, регулирующего жизнедеятельность почти всех организмов для интенсификации и регуляции роста сельскохозяйственных культур. Источники искусственного освещения с различными характеристиками используют для высших растений в оранжереях и тепличных комбинатах, предпосевной обработки семян, повышения устойчивости растений к неблагоприятным условиям [147; 148]. Данные об использовании искусственного света при культивировании грибов ограничены немногочисленными публикациями, связанными с поверхностным

культивированием с целью повышения урожайности плодовых тел [193; 453; 480; 481; 484], а возможность фоторегуляции с использованием источников искусственного света при их глубинном культивировании практически не рассматривалась. Известные нам методы фотостимуляции роста макромицетов ограничивались длительным их освещением (несколько суток) искусственным светом различного спектрального состава на различных стадиях онтогенеза.

Нами были разработаны методы исследования фоточувствительности макромицетов на разных стадиях онтогенеза к свету низкой интенсивности в видимом диапазоне длин волн с различными спектральными, энергетическими, поляризационными характеристиками, которая предусматривала использование света с максимально точно определенными параметрами и изучение возможности использования экономичных источников излучения на основе твердотельных светодиодов для практического применения найденных методов для интенсификации развития макромицетов путем световой стимуляции.

Разработанное нами новое направление использования света низкой интенсивности для стимуляции биологической активности съедобных и лекарственных грибов в биотехнологиях их культивирования базировалось на результатах исследований, проведенных впервые на макромицетах. Эти исследования показали, что основные изменения, вызванные кратковременным облучением светом низкой интенсивности на разных стадиях онтогенеза, имеют пролонгированное действие, и поэтому не требуют дальнейшей активизации светом [134; 140; 142; 523]. Это подтвердило выдвинутую нами ранее гипотезу, что пусковой механизм индуцированных низкоинтенсивным светом биологических реакций, описанный у различных биологических объектов [77, 260; 390; 392; 424; 594-598], присущ и макромицетам. Именно предположение, что первичные химические реакции сопровождаются появлением свободных радикалов, в небольшом количестве, которые в свою очередь запускают процессы

окисления биосубстратов, имеющих цепной характер, и переключающий (триггерный) механизм многократного усиления первичного эффекта низкоинтенсивного излучения легло в основу экологически чистых и энергетически экономичных методов активации посевного материала макромицетов путем кратковременной фотоиндукции,

Комплексное исследование чувствительности макромицетов к низкоинтенсивному свету с использованием лазеров видимого диапазона и твердотельных светодиодов, характерные особенности которых описаны в разделе 2, включало: определение специфики реакций грибов (27 штаммов 12 видов) из разных систематических групп на облучение непрерывным и импульсным светом разной когерентности и длин волн на разных этапах онтогенеза и определение эффективных параметров световой обработки, позволяющие получать наибольшую стимуляцию роста и биологической активности макромицетов. Это позволило выявить определенные закономерности, которые легли в основу их практического использования при модификации современных биотехнологий глубинного и твердофазного культивирования макромицетов.

Анализ значительного фактического материала по вопросам фотоморфогенеза у грибов, накопленного к настоящему времени, свидетельствует о том, что, в большинстве своем, регулирующее действие света в ходе онтогенеза грибов проявляется при переходе организма к новому очередному этапу индивидуального развития, при прорастании спор и при формировании спороносящих структур [235; 260; 472; 473; 475; 594]. На основании этого было выдвинуто предположение, что свет можно использовать как экологически чистый индуктор прорастания спор. Согласно своим биологическим функциям базидиоспоры обладают определенными морфологическими, физиологическими, биохимическими и генетическими особенностями: структура клеточных оболочек, гетероталлизм клеточных ядер, запасные питательные вещества, обезвоживание, минимальный уровень метаболизма, состояние покоя. Для того, чтобы преодолеть это состояние и

перейти в стадию активного метаболизма в базидиоспорах должна произойти активизация окислительных процессов, аэробного дыхания, синтеза белка и, наконец, образование и рост новой морфологической структуры [274]. Именно с интенсификацией окислительного метаболизма и ускорением переноса электронов в дыхательной цепи связывают стимулирующие эффекты света у различных организмов, включая микромицеты [74; 260].

Нами впервые было выявлено, что кратковременное облучение светом низкой интенсивности в синем и красном диапазоне длин волн в дозах от 45 до 230 мДж/см² обладает стимулирующим эффектом и позволяет значительно увеличить количество проросших спор у изученных видов макромицетов [47; 134; 135; 512; 523]. Впервые установлены различия в фоточувствительности базидиоспор не только разных видов, но и между штаммами одного и того же вида, что может быть связано с их географическим происхождением и эпигенетическими особенностями, которые были сформированы под действием различных экологических факторов.

Сравнительное изучение влияния света, полученного из разных источников, показало, что базидиоспоры большинства изученных видов более чувствительны к когерентному свету, чем к некогерентному [523]. Особенно ярко эти различия выражены у *F. velutipes*, *G. lucidum* и *H. erinaceus*. Такой эффект некоторые исследователи связывают с более глубоким проникновением лазерного света в клеточные структуры. В настоящее время возможные механизмы такой биостимуляции когерентного света являются предметом активных дискуссий [77; 357; 391; 392; 552; 653].

Полученные нами результаты, тем не менее, не позволяют однозначно говорить о преимуществах использования лазерных источников для индукции прорастания спор, поскольку для некоторых видов (*A. bisporus*, *G. applanatum*, *L. edodes*, *P. ostreatus*) достоверных различий при облучении спор светом разной когерентности выявлено не было и определяющую роль для индукции прорастания играл спектральный состав.

Основываясь на результатах исследователей, установивших более высокую чувствительность клеток к импульсному излучению [145; 229; 527], нами было высказано предположение, что использование импульсного света в тех же диапазонах длин волн и когерентности может дать дополнительный стимулирующий эффект и увеличить количество проросших спор. Однако, впервые проведенное нами на грибах сравнительное изучение эффективности облучения в непрерывном и импульсном режиме на прорастание спор не дало однозначного подтверждения этого предположения. Импульсный свет оказывает достоверно большее стимулирующее влияние на прорастание базидиоспор *A. bisporus*, *F. velutipes*, *G. applanatum*, чем непрерывный при той же дозе и длине волны. В то же время споры *H. erinaceus*, *G. lucidum*, *L. edodes* и *P. ostreatus* практически одинаково реагируют на оба режима облучения. В настоящее время нет единого мнения о возможных преимуществах импульсного или прерывистого света и его параметрах, способствующих биостимуляции [348].

В настоящее время всё больше исследователей склонны признавать, что пусковой механизм индуцированных низкоинтенсивным светом биологических реакций является единым, универсальным и обусловлен, скорее всего, универсальностью механизмов поддержания гомеостаза [392]. Анализ способности базидиоспор, облученных лазерным светом и LED, к формированию моноспоровых изолятов позволил впервые выявить у макромицетов пролонгированность вызванных облучением изменений и передачи стимулирующего эффекта от спор к формированию ростковой гифы. Это выражалось в увеличении скорости роста моноспоровых изолятов, полученных из облученных спор на 15 - 180% по сравнению с необлученными культурами. Таким образом, в результате проведенных нами впервые исследований трансдукции светового сигнала макромицетами найдено подтверждение теории о сигнальной индукции светом каскада биохимических и физических изменений, регулирующих биологическую

активность в клетке, которая ранее была описана для других организмов, в том числе и для некоторых микромицетов [260; 427].

Сравнительное изучение влияния света разной длины волны и когерентности на активность базидиоспор и последующий рост моноспоровых изолятов макромицетов является не только одним из важных этапов на пути понимания широко дискутируемых теорий о преимуществах когерентного лазерного света. Важное практическое и теоретическое значение имеет длительность сохранения фотоиндуцированной активности и возможность её трансформации от спор к дикариотическому мицелию, в процессе его роста, пересевах и переходе на другие стадии онтогенеза.

Наши исследования макромицетов и экспериментальные данные, полученные другими учеными показали, что грибы ведут себя неоднозначно по отношению к свету [40; 134; 137]. Влияние света на их развитие определяется не только видовой, но и штаммовой принадлежностью. Кроме того, некоторые грибы меняют свое отношение к свету в процессе онтогенеза. Поэтому разработка эффективных методов активизации посевного материала диктовала необходимость четкого определения фазы онтогенеза грибного организма на которой световое воздействие вызовет максимальную стимуляцию его биологической активности.

Разработанная нами схема проведения исследований, которая включала в себя облучение лазерным светом с точно определенными длинами волн (632,8 нм, 514,0 нм и 488,0 нм) на разных этапах получения посевного мицелия, начиная от спор и заканчивая стационарной фазой роста вегетативного мицелия, впервые позволила установить динамику изменения фоточувствительности у *G. applanatum*, *P. ostreatus*, *F. velutipes*, *G. lucidum*, *H. erinaceus* и *L. edodes*. [140]. Несмотря на различные реакции этих макромицетов на световые воздействия были установлены стадии онтогенеза для каждого штамма, на которых облучение позволяет получить максимальную стимуляцию роста вегетативного мицелия в глубинной культуре, что выражалось в значительном увеличении накопления биомассы

(на 64-158%). Полученные результаты позволили нам впервые доказать, что в вегетативном мицелии макромицетов, сформировавшемся из модифицированных под действием света спор, сохраняется способность к ускоренному росту и изменения, вызванные светом, имеют пролонгированное действие и могут передаваться на дальнейшую онтогенетическую стадию, от спор и монокариотического мицелия к мицелию дикариотическому. Такая способность, несомненно, является большим позитивным фактором, говорящем в пользу применения кратковременного облучения светом низкой интенсивности для активизации посевного мицелия в современных грибных биотехнологиях.

Нами впервые изучена чувствительность вегетативного мицелия базидиомицетов *F. velutipes*, *G. applanatum*, *G. lucidum*, *H. erinaceus*, *I. obliquus*, *L. edodes* и аскомицетов *C. militaris*, *M. conica* и *M. esculenta* к свету с различными спектральными и поляризационными характеристиками, что позволило установить режимы облучения, эффективные для активизации посевного мицелия [140]. Использование активированного мицелия для инокуляции субстратов при глубинном культивировании этих макромицетов позволило на 2-3 дня сократить сроки культивирования и увеличить выход биомассы. Нами установлено, что при облучении вегетативного мицелия эффективность когерентного света низкой интенсивности на 5 – 40 % выше. Сравнительное изучение роста макромицетов при глубинном культивировании при использовании посевного мицелия, облученного в непрерывном и импульсном режимах, показало, что импульсный свет вызывает большую активацию посевного мицелия, чем непрерывный. Такая активация выражалась в дополнительной достоверной стимуляции роста, что приводило к заметному увеличению накопления биомассы мицелия у макромицетов *C. militaris*, *G. lucidum*, *H. erinaceus*, *L. edodes* и *P. ostreatus*.

Если синий и красный свет разной когерентности вызывал стимуляцию роста на этой стадии онтогенеза у всех изученных базидиальных макромицетов и у аскомицета *C. militaris*, то по их чувствительности к

зеленому свету исследованные виды можно разделить на 2 группы. У *F. velutipes*, *G. applanatum*, *M. conica* и *M. esculenta* облучение в этом диапазоне не вызывает изменений ростовых процессов или даже незначительно угнетает, а у *G. lucidum*, *H. erinaceus*, *I. obliquus*, *L. edodes*, *P. ostreatus* и *C. militaris* - вызывает стимуляцию роста разной степени эффективности [140]. Эти различия могут свидетельствовать о некоторой специфике в строении их фоторецепторной системы. Существует достаточно много информации о спектральной чувствительности грибов в синем и красном диапазонах длин волн и механизмах фоторецепции такого света [260; 472; 473; 594]. Однако, совсем немного сведений о чувствительности грибов к зеленому свету и практическом его использовании в грибных биотехнологиях. Зеленый и дневной свет подавляли прорастание спор *Pleurotus sapidus* [461]. Показано, что свет с длиной волны 530 нм использовался для стимуляции роста и биосинтетической активности грибов из рода *Aspergillus* при глубинном культивировании [39]. Освещение зеленым светом вегетативного мицелия индуцировало образование плодоношения у *H. marmoreus* [484], в то же время освещение *L. edodes* в этом диапазоне в течение 30 дней после инокуляции субстратных блоков оказалось неэффективным [193].

Впервые нами получены данные по фоточувствительности грибов из рода *Morchella* [94; 109; 124; 134; 137] и установлено, что, в отличие от ранее изученных видов, синий свет не вызывал у них достоверных изменений скорости роста и накопления биомассы. В литературе отсутствуют какие-либо сведения о фоточувствительности этой систематической группы макромицетов, поэтому можно только предположить у них существование некоторых различий в строении фоторецепторной системы, причиной чего могут быть их как генетические так эпигенетические особенности.

Одним из показателей, которые определяют экономическую эффективность биотехнологического процесса, является количество инокулюма, который вносят в ферментационную среду. Разработанные нами, на основе изучения фоточувствительности макромицетов, методы активации

мицелия позволяют уменьшить количество его внесения в субстрат в 2-4 раза. Накопление биомассы *G. lucidum*, *H. erinaceus*, *L. edodes* и *P. ostreatus* при 1,2% инокуляции облученным мицелием было достоверно выше, чем при внесении 5% необлученного посевного материала. Нами выявлена зависимость фотостимулирующего эффекта от количества активизированного посевного мицелия, используемого для инокуляции. Уменьшение количества вносимого в субстрат активизированного инокулянта способствует увеличению стимулирующего эффекта. Это в целом согласуется с результатами других исследователей, которые считают, что фотостимулирующий эффект тем выше, чем ниже исходные показатели [77].

Большинство изменений клеточной активности, вызванных воздействием внешней среды, обратимы. Длительность их сохранения зависит от многих факторов, которые, как правило, взаимосвязаны. В литературе практически отсутствует информация о динамике фотоиндуцированной активности в клетках живых организмов во времени. Нами впервые получены данные, свидетельствующие о снижении фотоиндуцированной активности посевного мицелия у всех штаммов макромицетов до уровня контроля уже через 72 часа после облучения, что необходимо учитывать при использовании методов биоактивации при помощи света низкой интенсивности в биотехнологиях культивирования макромицетов. В данном случае мы, по-видимому, не можем говорить о процессах внутриклеточной репарации, поскольку кратковременное облучение светом низкой интенсивности не вызывает изменений в структуре ДНК, а только индуцирует работу генов, ответственных за рецепцию светового сигнала и запуск каскада последующих реакций [77; 260]. Восстановление клеточного гомеостаза обусловлено генетическими факторами сформировавшимися в процессе эволюции, как защита от стрессовых воздействий окружающей среды.

Нами была выдвинута гипотеза, что, в отличие от хранения активированного посевного материала на среде его культивирования, в которой отсутствуют условия для дальнейшего развития мицелия, запускаются механизмы восстановления исходного внутриклеточного гомеостаза. Перенос фотоактивированного посевного мицелия на новые среды с достаточными концентрациями питательных компонентов способствует реализации вызванных светом изменений. Нами впервые установлена динамика изменения фотоиндуцированной активности вегетативного мицелия при пересевах и масштабировании, что позволило установить соответствующие режимы работы с активированным мицелием.

Особого внимания заслуживает предположение, что характер среды, на которой выращиваются макромицеты, и способ культивирования определяют будет ли свет стимулировать или уменьшать темп роста грибов. Это предположение базируется на данных многих авторов, проводивших исследования на макромицетах [236; 252; 310; 311; 368; 558; 595-598]. Большое значение при рассмотрении вопросов фоторецепции и экспрессии ферментов и генов у грибов уделяется углеводному обмену. Известно, что свет может значительно ингибировать поглощение глюкозы *Aspergillus ornatus* [355] и *Aspergillus giganteus* [673], а глюкозоамилазная активность мицелия *Aspergillus niger*, подвергнувшегося воздействию голубого света, увеличивается более чем в 2,5-раза по сравнению с мицелием, выращенным в темноте [668]. Что касается фоточувствительности метаболизма азота, то у грибов она изучена довольно незначительно. Однако некоторые исследователи полагают, что связь между светом и азотным обменом может существовать [370; 544; 571]. Нами установлено несомненное влияние способа культивирования на процессы, определяющие реализацию фотоиндуцированных изменений. Наибольшая стимуляция роста мицелия отмечалась при глубинном культивировании активированного светом мицелия [134]. Свет низкой интенсивности вызывал изменение трофики макромицетов, что выражалось в увеличении эффективности потребления

источника углерода и дополнительной стимуляции роста на средах с пониженным содержанием глюкозы. Нами не установлено влияния концентрации азота в среде на фотоиндуцированную стимуляцию роста макромицетов, однако, было сделано предположение, что этот фактор может влиять на реализацию других фотоиндуцированных изменений биологической активности этих грибов, таких, например, как синтез различных биологически активных соединений и ферментов, что не всегда коррелирует с их ростовой активностью [617].

Исследования ученых, разрабатывавших технологии глубинного культивирования лекарственных макромицетов из родов *Ganoderma* и *Lentinus*, показали, что увеличение количества биомассы, как правило, сопровождается увеличением синтеза как экзо- так и эндополисахаридов, [211; 528; 588]. На основании этого было высказано предположение, что фотоиндуцированная стимуляция роста у базидиальных макромицетов может сопровождаться увеличением синтеза полисахаридов. Нами впервые было установлено, что облучение посевного мицелия *G. lucidum* и *L. edodes*, как когерентным, так и некогерентным светом низкой интенсивности во всех используемых диапазонах длин волн вызывало увеличение синтеза полисахаридов. Достоверное преимущество когерентного света перед некогерентным, отмеченное при анализе ростовых характеристик (накопление биомассы) у *G. lucidum* и *L. edodes*, как правило, не сопровождалось аналогичным дополнительным увеличением синтеза полисахаридов.

Особого внимания заслуживают полученные нами данные о влиянии облучения в используемых в исследованиях режимах на синтез полисахаридов представителями аскомицетов. В отличие от базидиомицетов *G. lucidum* и *L. edodes*, облучение светом низкой интенсивности разной когерентности в синем диапазоне длин волн *C. militaris* и *C. sinensis* индуцировало увеличение накопления биомассы, но не изменяло уровня синтеза эндополисахаридов и снижало количество экзомеланинов на 30-63%

при облучении светом всех длин волн. Аналогичную тенденцию обнаружили китайские ученые, которые изучали влияние дневного света и света, полученного от светодиодных источников в красном (620-630 нм) и синем диапазонах (440-450 нм) длин волн на рост и синтез кордиципина и аденозина при глубинном культивировании *C. militaris* [281]. Они также отмечали, что длина волны света оказывает значительное влияние на рост мицелия и метаболизм: красный свет в используемых режимах освещения был оптимальным для роста мицелия и накопления аденозина, тогда как синий свет был оптимальным для синтеза кордиципина. Обобщая полученные данные авторы рекомендуют выбирать режимы освещения в соответствии с целевым биоактивным компонентом. Специфическая реакция на кратковременное облучение светом низкой интенсивности обнаружена у аскомицетов *M. conica* и *M. esculenta*. Они проявляли чувствительность только к красному свету, который вызывал стимуляцию как роста, так и синтеза полисахаридов.

Установлена целесообразность использования импульсного света той же интенсивности, длин волн и когерентности не только для интенсификации роста, но и для увеличения синтеза экзополисахаридов, поскольку дополнительный эффект от его применения составлял 10-30%.

Нами показано, что кратковременное облучение посевного мицелия низкоинтенсивным светом значительно влияет на процентное соотношение углеводов как в экзо-, так и в эндополисахаридах у изученных нами представителей разных классов макромицетов (базидиомицетов *G. lucidum* и *L. edodes* и аскомицетов *C. sinensis* и *C. militaris*) [13; 16; 96; 123; 127; 134; 137; 566]. Зависимость этого показателя от способа культивирования подтверждает полученные нами ранее данные, что трансформация световой энергии, которая была поглощена грибными клетками, в значительной мере определяется последующими условиями выращивания гриба. Представленные виды, согласно характеру фотоиндуцированного изменения соотношения их основных мономеров в полисахаридах можно четко

разделить на две группы - *G. lucidum* и *L. edodes* (базидиомицеты) и *C. sinensis* и *C. militaris* (аскомицеты). Это ещё раз подтверждает наши предположения о существовании различий в их фоторецепторных системах.

У многих микроорганизмов, способных адаптироваться к действию определенных экологических факторов, в частности, различного режима освещения, высоких и низких температур, загрязнения почвы тяжелыми металлами, наблюдаются соответствующие изменения жирнокислотного состава клеточных липидов, что обусловлено изменениями в проницаемости их мембран, метаболизме жирных кислот и активности перекисных процессов [175; 463; 574; 631]. Получены данные о повышении степени ненасыщенности клеточных липидов у гифальных грибов при действии определенных абиотических факторов [73; 175; 176; 309; 494]; с другой стороны, есть сведения и о снижении этого параметра при росте грибов в условиях низких температур, то есть не всегда высокий уровень антропогенной нагрузки приводит к формированию адаптации в виде повышения степени ненасыщенности клеточных липидов [176]. Однако, практически отсутствуют аналогичные данные о влиянии различных экологических и антропогенных факторов на липидный обмен и жирнокислотный состав макромицетов. Нами было выдвинуто гипотезу, что одним из механизмов, который обеспечивает способность грибов к фоторецепции света разного типа, являются соответствующие изменения в их жирнокислотном профиле и в степени ненасыщенности клеточных липидов. Она базировалась на теории о том, что одним из важных компонентов окислительно-восстановительной системы клетки являются ненасыщенные жирные кислоты клетки, которые являются субстратом для дополнительного создания свободных радикалов в клетке под действием облучения. Для проверки этой гипотезы было проведено исследование влияния облучения на изменение жирнокислотного профиля *C. militaris*, *C. sinensis* и *G. lucidum*, как одних из перспективных объектов современной биотехнологии. Анализ полученных результатов позволил впервые для

макромицетов установить общую тенденцию снижения коэффициента ненасыщенности жирных кислот в мицелии при использовании фотоактивированного инокулюма. Тем не менее, содержание ненасыщенных жирных кислот остается выше насыщенных, что является важным при создании на основе этих грибов коммерческих препаратов [90].

Изучение влияния облучения на физиологически активные соединения *G. lucidum* и *C. militaris* не показало значительных изменений общего содержания углеводов. Воздействие красного света приводило к небольшому повышению содержания белка и липидов. По сравнению с контролем, в облученных образцах несколько снижались фосфолипиды, общие фенольные соединения и антиоксидантная активность.

Особое внимание в нашей работе было уделено изучению влияния света на синтез меланинов и ферментативную активность *I. obliquus*. В то время как влиянию света на синтез меланиновых пигментов микромицетами уделяется значительное внимание [5; 6; 7; 28; 61; 189], данные о влиянии низкоинтенсивного излучения на рост и синтез меланиновых пигментов макромицетами в литературе практически отсутствуют. Почти нет информации о ферментативной активности *I. obliquus*, включая антиоксидантные ферменты и ферменты, ответственные за синтез пигментов.

Нами установлено, что низкоинтенсивный свет в видимой части спектра может быть использован в биотехнологии глубинного культивирования *I. obliquus* не только как стимулятор роста, но и как стимулятор синтеза меланина, выявлена положительная корреляция между накоплением биомассы мицелия и синтезом меланина [131; 134; 138; 525]. Определены эффективные режимы фотостимуляции биологической активности посевного мицелия, позволяющие сократить время культивирования и увеличить выход целевых продуктов. Дополнительный стимулирующий эффект был получен при использовании импульсного света.

Изучение влияния кратковременного облучения мицелия светом с различными характеристиками на активность ферментов

продemonстрировало большое разнообразие реакций на такие воздействия. Один и тот же режим облучения, стимулировавший синтез одних ферментов, был индифферентен или подавлял синтез других. Отмечена положительная корреляция между активностью ферментов, регулирующих меланиногенез, и его синтезом.

Выявлена достоверная зависимость фотостимуляции синтеза меланина от концентрации источника азота в среде. Снижение концентрации азота увеличивало стимулирующий эффект облучения, который выражался в увеличении выхода меланина более, чем, а 2 раза. Установлена зависимость интенсивности проявления фотоиндуцированных изменений ферментативной зависимости *I. obliquus* от концентрации источника в питательной среде. Полученные нами данные подтвердили мнение некоторых исследователей о влиянии света на метаболизм азота у грибов [236; 252; 310; 311; 368; 558; 595-598]. Установлено, что использование питательных сред с пониженным содержанием источника азота целесообразно для повышения фотоиндуцированного стимулирующего эффекта при получении меланина, каталазы, внеклеточной тирозиназы и полифенолоксидазы, внутриклеточной пероксидазы.

Анализ фоточувствительности биосинтетической активности *I. obliquus* продемонстрировал необходимость коррекции параметров световой обработки посевного мицелия в соответствии целевыми биологически активными компонентами при использовании методов фотостимуляции в биотехнологии культивирования этого макромицета.

Впервые проведено изучение влияния света низкой интенсивности на антимикробную активность *F. velutipes*, *P. ostreatus*, *G. lucidum* и *G. applanatum* [524]. Определены высокоэффективные режимы световой обработки посевного мицелия и предложены методы регуляции и интенсификации технологических этапов культивирования грибов-продуцентов антимикробных компонентов и увеличения выхода целевого конечного продукта.

Впервые разработаны методы фотоинтенсификации технологических этапов твердофазного поверхностного культивирования макромицетов *P. ostreatus*, *L. edodes*, *F. velutipes*, *H. erinaceus* и *A. bisporus*. Они базировались на полученных нами ранее данных о чувствительности разных видов макромицетов к свету низкой интенсивности и активности посевного материала индуцированной в разных режимах фотообработки. Использование предложенных методов при культивировании вышеуказанных макромицетов на растительных субстратах позволило не только сократить сроки культивирования до начала плодоношения, но и увеличить урожайность и качество плодовых тел.

В таблице приведены основные наиболее высокие показатели активности изученных нами макромицетов, индуцированной кратковременным облучением светом низкой интенсивности. Представленные данные получены при облучении посевного материала в режимах, вызывающих наибольший стимулирующий эффект у конкретного штамма на определенный показатель активности, и демонстрируют перспективность проведения дальнейших исследований направленных на разработку режимов использования такого типа световых воздействий при культивировании и других представителей макромицетов.

Полученные результаты по влиянию кратковременного облучения светом низкой интенсивности, с различными спектральными и поляризационными характеристиками на развитие макромицетов продемонстрировали пролонгированность фотоиндуцированной стимуляции их активности, которая передавалась от спор к мицелию, вплоть до формирования плодовых тел. Это доказывает целесообразность использования такого подхода для модификации существующих биотехнологий. Разработанные методы не менее эффективны и более экономичны, чем предлагаемые другими исследователями методы фотостимуляции биологической активности макромицетов путем продолжительного освещения на разных стадиях онтогенеза.

Влияние кратковременного облучения светом низкой интенсивности на активность макромицетов

Вид макромицета	Показатели активности макромицетов, индуцируемые кратковременным облучением светом низкой интенсивности				
	Прорастание спор, разы по сравнению с контролем	Увеличение скорости роста мицелия и сокращение длительности культивирования, сутки глубинное/твёрдофазное	Увеличение выхода биомассы, % по сравнению с контролем	Увеличение синтеза биологически активных веществ, % по сравнению с контролем	Увеличение урожайности, % по сравнению с контролем
1	2	3	4	5	6
<i>Agaricus bisporus</i>	20	-/0	-	-	19
<i>Cordyceps militaris</i>	-	0/-	25,9±0,2*	полисахариды: экзо – 5,6%, эндо - минус 30,8%	-
<i>Cordyceps sinensis</i>	-	0/-	25,0±1,2*	полисахариды: экзо – 2,5%, эндо - минус 31,1%	-

Продолжение таблицы

1	2	3	4	5	6
<i>Flammulina velutipes</i>	18	3/12	78,1±1,1*	антимикробная активность – 60-150%	63
<i>Ganoderma applanatum</i>	19	4/-	55,7±1,8*	-	-
<i>Ganoderma lucidum</i>	31	4/-	75,3±0,6*	полисахариды: экзо – 43,7%, эндо – 64,0%	-
<i>Hericium erinaceus</i>	100	-/15	68,9±2,8*		55
<i>Inonotus obliquus</i>	-	3/-	56.9±2.0*	меланины – 276,0%	-
<i>Lentinus edodes</i>	3	2/40	153,9±3,0*	полисахариды: экзо – 50,0%, эндо – 38,5%	75
<i>Morchella conica</i>	-	0/-	19,6±0,2*	экзополисахариды – 27,0 %	-
<i>Morchella esculenta</i>	-	0/-	32,7±1,9*	экзополисахариды – 56,0 %	-
<i>Pleurotus ostreatus</i>	9	4/6	57.3±2,1*	антимикробная активность – 100-238%	56

Примечание: (-) – исследования не проводились; * - обозначено статистически достоверные различия по отношению к контролю, ($p \leq 0,05$) результаты представлены как $M \pm n$ $n = 5$

Полупроизводственные испытания фотостимуляции посевного мицелия на агрокомбинате «Пуща Водица» и частном грибоводческом хозяйстве убедительно показали эффективность предлагаемых методов и подходов как обеспечивающих стабильное повышение урожайности и улучшение качества продукции экологически безопасными способами. Следующим этапом должно стать внедрение этих методов в производственных масштабах грибоводческих хозяйств Украины.

ВЫВОДЫ

Разработано новое направление использования искусственного света низкой интенсивности в биотехнологии культивирования съедобных и лекарственных грибов. Установлено, что кратковременное низкоинтенсивное излучение в видимой части спектра вызывает стимуляцию ростовой и биосинтетической активности макромицетов, которая имеет пролонгированное действие, охватывающее последующие стадии онтогенеза от спор к мицелию. На основе этого предложены высокоэффективные методы целенаправленной регуляции биосинтетической активности макромицетов и биотехнологической интенсификации разных 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 и урожайность плодовых тел и их качество при твердофазном выращивании.

Основные результаты работы представлены в следующих выводах:

1. Разработаны научные основы исследования фоточувствительности макромицетов на разных стадиях онтогенеза к свету низкой интенсивности в видимом диапазоне длин волн с различными спектральными, энергетическими, поляризационными характеристиками, с максимально точно определенными параметрами. В процессе экспериментального изучения показаны возможности использования экономичных источников излучения на основе твердотельных светодиодов для стимуляции биологической активности макромицетов.
2. По результатам изучения фоточувствительности макромицетов к свету низкой интенсивности с различными характеристиками определена специфика реакций макромицетов отделов *Ascomycota* и *Basidiomycota* на облучение непрерывным и импульсным светом разной когерентности и длин

волн. Установлено, что синий и красный свет различной когерентности вызывает стимуляцию роста различной интенсивности у всех изученных базидиальных макромицетов и у аскомицета *Cordyceps militaris*. Экспериментальным путем установлены эффективные параметры световой обработки, позволяющие получать наибольший стимулирующий эффект на ростовую активность.

3. 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 (10-150%).

4. Установлена пролонгированность изменений ростовой активности спор и вегетативного мицелия макромицетов, вызванных кратковременным облучением светом низкой интенсивности, которые передаются на последующие фазы онтогенеза и не требуют дальнейшей активизации светом.

5. Выяснена динамика фотоиндуцированной активности посевного мицелия при хранении и последовательных пересевах. Скорость роста активированного мицелия снижается до уровня контроля уже через 72 часа его хранения после облучения и через 2 последовательных пересева у всех штаммов макромицетов.

6. Установлено, что реализация фотостимулирующего воздействия 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 на 25-46%.

7. Впервые для *Inonotus obliquus* экспериментально доказана целесообразность использования питательных сред с пониженным

содержанием азота для повышения фотоиндуцированного стимулирующего эффекта при получении меланина, полифенолоксидазы, внеклеточной каталазы и тирозиназы, внутриклеточной пероксидазы. Показано, что снижение в 2 раза концентрации азота в среде культивирования позволяет более чем в 2 раза увеличить выход меланина и в 10 раз активность внеклеточной каталазы по сравнению с контролем. Отмечена положительная корреляция между активностью ферментов, регулирующих меланиногенез, и синтезом меланина.

8. Выявлены изменения в жирнокислотном профиле мицелия макромицетов. Определена высокая эффективность использования лазерного света с длинами волн 488,0 и 632,8 нм для стимуляции синтеза *Cordyceps militaris* полиненасыщенной пальмитолеиновой кислоты (увеличение в 6-7 раз по сравнению с необлученным контролем) и *Cordyceps sinensis* - мононенасыщенной незаменимой олеиновой кислоты (увеличение на 64%), имеющих практическое значение в медицине и косметологии.

9. Установлено, что кратковременное облучение посевного мицелия низкоинтенсивным светом значительно влияет на процентное соотношение углеводов как в экзо-, так и эндополисахаридах у *Cordyceps militaris*, *C. sinensis*, *Ganoderma lucidum* и *Lentinus edodes*. Продемонстрированы ранее неизвестные тенденции изменений углеводного состава полисахаридов под действием кратковременных световых воздействий у макромицетов, относящихся к аско- и базидиомицетам, что позволяет высказать предположение о специфике фоторецепторных систем макромицетов этих таксонов.

10. Установлена перспективность использования света низкой интенсивности разной когерентности в красном и синем диапазоне длин волн для регуляции антимикробной активности *Flammulina velutipes*, *Pleurotus ostreatus*, *Ganoderma lucidum* и *G. applanatum*. Кратковременное облучение посевного мицелия в установленных режимах сокращает период культивирования до появления антимикробной активности (до 7 суток) и

увеличивает ингибирующую активность культуральной жидкости по отношению к различным тест-культур для *Flammulina velutipes* на 60-150%, *Pleurotus ostreatus* - 100-238%, *Ganoderma applanatum* - 30-87% и *G. lucidum* - 30-70%. Диаметры угнетения роста бактерий при использовании импульсного света увеличиваются до 72%, по сравнению с непрерывным.

11. Продемонстрирована перспективность фотоактивации посевного материала *Pleurotus ostreatus*, *Lentinus edodes*, *Flammulina velutipes*, *Hericium erinaceus* і *Agaricus bisporus* для интенсификации существующий биотехнологий получения плодовых тел. Разработаны методы, позволяющие повысить урожайность плодовых тел на 10-75% и улучшить их качество и товарный вид. 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*, у которого все этапы плодообразования проходят в отсутствии света.

12. Установлены эффективные режимы использования светодиодных источников для индукции прорастания спор *Agaricus bisporus*, *Flammulina velutipes*, *Ganoderma lucidum*, *Inonotus obliquus*, *Lentinus edodes* и *Pleurotus ostreatus*, стимуляции роста *Cordyceps militaris*, *Flammulina velutipes*, *Ganoderma applanatum*, *G. lucidum*, *Hericium erinaceus*, *Lentinus edodes*, *Morchella conica*, *M. esculenta* и *Pleurotus ostreatus*, антимикробной активности *Flammulina velutipes*, *Ganoderma applanatum*, *G. lucidum* и *P. ostreatus*, активности внеклеточной тирозиназы и полифенолоксидазы и синтеза меланинов у *Inonotus obliquus*, полисахаридов у *Ganoderma lucidum*, *Lentinus edodes*, *Morchella conica* и *M. esculenta*.

13. Разработаны научные основы использования света низкой интенсивности в современных микобиотехнологиях для повышения продуктивности процесса культивирования.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Авт. св. СССР №1205828. - МКИ А 01 G 1/04. Питательная среда для выращивания мицелия съедобных грибов / О. Н. Бубнова, Н. Б. Шалашова, Т. В. Ерофеева – № 3755314/30–15; заявл. 29.04.84, опубл. 23.01.86, Бюл. № 12.
2. Авт. св. СССР №1512520. - МКИ А 01 G 1/04. Питательная среда для выращивания посевного мицелия шампиньона / Л.А. Девочкин, А. П. Цаудер – № 4333141/30–15; заявл. 24.11.87, опубл. 17.10.89, Бюл. № 37.
3. Авт. св. СССР №762799. - МКИ А 01G 1/04. Питательная среда для выращивания мицелия съедобных грибов / Р. Г. Козлова, Л. С. Лосякова, Л. В. Гарибова, В. Г. Кожемякин, Л. Ф. Иванов - № 2640853; заявл. 21.06.1978, опубл. 15.09.1980, Бюл. № 34.
4. Бабицкая В. Г. Меланиновые пигменты макромицетов / В. Г. Бабицкая, В. В. Щерба, О. В. Осадчая // Весці Нац. Акад. навук Беларусі. Сер. біял. навук. – 1998. – № 3. – С. 83–88.
5. Бабицкая В. Г. Характеристика меланинового комплекса, образуемого грибом *Alternaria alternata* (Fries) Keissler / В. Г. Бабицкая, Т. В. Малама, Т. В. Филимонова // ПБиМ. – 1998. – Т. 34, № 4. – С. 426–429.
6. Бабицкая В. Г. Меланиновые пигменты грибов *Raecilomyces variotii* и *Aspergillus carbonarius* / В. Г. Бабицкая [и др.] // ПБиМ. – 2000. – Т. 36, № 2. – С. 153–159.
7. Бабицкая В. Г. Природа меланиновых пигментов некоторых микро- и макромицетов / В. Г. Бабицкая, В. В. Щерба // ПБиМ. – 2002. – Т. 38, № 3. – С. 286–291.
8. Бабицкая В. Г. Физиологически активные соединения и биологическое действие глубинного мицелия ксилотрофного базидиомицета

- Ganoderma lucidum* (Kurt.: Fr.) P. Karst. / В. Г. Бабицкая [и др.] // Биотехнология. – 2003. – № 4. – С. 35-44.
9. Бабицкая В.Г. *Cordyceps militaris* – объект современной биотехнологии / В.Г. Бабицкая, В.В. Щерба, Т.С. Гвоздкова [и др.] // Успехи медицинской микологии. – М.: Национальная Академия Микологии, 2007. – Т.9. – С. 212-214.
 10. Бабицкая В.Г. Физико-химические свойства полисахаридов, выделенных из мицелия местных штаммов *Ganoderma lucidum* / В.Г. Бабицкая, В.В. Щерба, Д.А. Смирнов [и др.] // Успехи медицинской микологии. – М.: Национальная Академия Микологии, 2007. – Т.9. – С. 139–141.
 11. 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.
 12. Бабицкая В.Г. *Phallus impudicus*, *Hericium erinaceus* и *Trametes versicolor* – перспективные объекты биотехнологии / В.Г. Бабицкая, В.В. Щерба, Т.В. Филимонова [и др.] // Успехи медицинской микологии. – М.: Национальная Академия Микологии, 2006. – Т.7. – С. 220–222.
 13. 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, Н. Л. Поединок [и др.] // Биотехнология. – 2007. – №6. – С. 34–42.
 14. Бабицька В. Г. Вплив умов глибинного культивування лікарського гриба *Ganoderma lucidum* (рейши) на біосинтез полісахаридів / В. Г. Бабицкая, Н. А. Бісько, Н. Л. Поєдинок [и др.] // Наукові вісті

- Національного технічного університету України. – 2007. – №2. – С. 92–100.
15. 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.
 16. Бабицкая В. Г. Физиологически активные соединения грибов рода *Cordyceps* / В. Г. Бабицкая, Н. А. Бисько, Н. Л. Поединок [и др.] // 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.
 17. Бабицкая В. Г. Липиды энтомопатогенного гриба *Cordyceps militaris* / В. Г. Бабицкая, Т. А. Пучкова, В. В. Щерба [и др.] // Иммунопатология, аллергология, инфектология. – 2009. – № 1. – С. 50–51.
 18. Бабицкая В. Г. Характеристика липидов ксилотрофных базидиомицетов: фракционный и жирнокислотный состав / В. Г. Бабицкая, В. В. Щерба, Т. В. Черноок [и др.] // Current problems in microbiology and biotechnology: The National Scientific Conference with International Participation, Chisinau, Republic of Moldova, 5–6 october 2009 y.: Acad. de Ştiinţe a Moldovei, Inst. de Microbiologie şi Biotehnologie; com. şt. intern. Duca Gheorghe (preş.), Furdui Teodor, Zveaghintev D.G. [et al.]; com. org. Rudic Valeriu, Cepoi Liliana, Usatai Agafia [et al.]. – Ch.: S.n., (Tipogr. „Elena-V.I.” SRL), 2009. – P. 128–129.
 19. Бакеева Л. Е. Необычное контактирование ограничивающих мембран в митохондриях дрожжевых клеток *Torulopsis sphaerica*, предшественники которых были облучены He-Ne-лазером / Л. Е.

- Бакеева, В. М. Мантейфель, Т. Й. Кару // Доклады академии наук. – 2001. – Т. 377, № 2. – С. 260–263.
20. Барштейн В. Ю. Макромицеты в онкологии. Результаты, проблемы, перспективы / В. Ю. Барштейн, Т. А. Круподёрова // [под ред. В. П. Волкова] – Успехи и проблемы современной онкологии – Новосибирск: «СибАК», 2014. – 108 с.
 21. Белова Н. В. Перспективы использования биологически активных соединений высших базидиомицетов в России / Н. В. Белова // Микол. и фитопатол. – Т. 38, вып. 2 – 2004. – С. 1–7.
 22. Беспалова Л. А. Особенности липогенеза базидиомицетов *Pleurotus ostreatus* и *Flammulina velutipes* при культивировании на различных средах / Л. А. Беспалова, О. Е. Макаров, Л. П. Антонюк, В. В. Игнатов // ПБиМ. – Т. 38, № 4. – 2002. – С. 405–412.
 23. Биологические особенности лекарственных макромицетов в культуре. Т. 2 / под ред. С. П. Вассера. – К.: Альтепрес, 2011. – 212 с.
 24. Бисько Н. А. Высшие съедобные базидиальные грибы в поверхностной и глубинной культуре / [Н. А. Бисько, А. С. Бухало, С. П. Вассер и др.]. – К.: Наук. думка, 1983. – 311 с.
 25. Бисько Н. А. Интенсификация технологических этапов промышленного культивирования шампиньона двуспорового / Н. А. Бисько, Н. Л. Поединок, Б. Ф. Петренко, А. М. Негрейко // Агро XXI. – 2005. – № 0709. – С. 24–36.
 26. Бісцько Н.А. Фактори регуляції біосинтетичної активності лікарських грибів / Н.А. Бісцько, Н.Л. Поединок, А.М. Негрійко [та інш.] // Приоритети наукової співпраці ДФФД і БФФД. – К.: ДІА, 2007. – С. 312–325.
 27. Бідзіля М. І. Вільні радикали в опромінених рослинах та насінні / М. І. Бідзіля – К.: Наук. думка, 1974. – 208 с.
 28. Борисюк Л. Г. Локализация и динамика накопления меланина в клетках *Cladosporium cladosporioides* (Fresen) de Vries / Л. Г. Борисюк,

- Е. Ф. Харатьян, Н. Н. Жданова // Мікробіол. журн. – 1991. – Т. 53, № 6. – С. 10–16.
29. Борщевская М. И. Развитие представлений о биохимии и фармакологии меланиновых пигментов / М. В. Борщевская, С. М. Васильева // Вопросы медицинской химии. – 1999. – Т. 45, № 1. – С. 13–23.
 30. Бухало А. С. Высшие съедобные базидиомицеты в чистой культуре / А. С. Бухало – К.: Наук. думка, 1988. – 144 с.
 31. Бухало А. С. Культивирование съедобных и лекарственных грибов. Практические рекомендации / А. С. Бухало, Н. А. Бисько, Э. Ф. Соломко [и др.] // [под ред. А. С. Бухало] – К.: Чернобыльинтеринфом, 2004. – 128 с.
 32. 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. – М.: Национальная Академия Микологии, 2007. – Т.9. – С. 228–230.
 33. Вассер С. П. Промышленное культивирование съедобных грибов / С. П. Вассер, Л. В. Гарибова, И. А. Дудка – К.: Наук. думка, 1978. – 24 с.
 34. Волошко Т. Е. Порівняльна характеристика базидіальних грибів - продуцентів каталази / Т. Е. Волошко, О. В. Федотов // Biotechnologia Acta. – 2013. – Т. 6, № 3, – С. 89–94.
 35. Гвоздкова Т. С. АОО липидов грибов различных таксономических групп / Т. С. Гвоздкова, Т. В. Черноок, А. Н. Капич // Весці НАН Беларусі. – 2000. – № 4. – С. 50–53.
 36. Гвоздкова Т. С. Липиды базидиальных грибов / Т. С. Гвоздкова, В. В. Щерба, Т. В. Черноок, [и др.] // [ред. Э.И. Коломиец и др.]. Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты: сб. науч. тр. / НАН Беларуси, Ин-т микробиологии; – Мн.: изд. И.П. Логвинов, 2007. – Т. 1. – С. 88-102.

37. Гесслер Н. Н. Активность супероксиддисмутазы и каталазы у каратиноидсинтезирующих грибов *Blakeslea trispora* и *Neurospora crassa* в условиях окислительного стресса / Н. Н. Гесслер, А. В. Соколов, В. Я. Быховский, Т. А. Белозерская // [ред. Э.И. Коломиец и др.]. Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты: сб. науч. тр. НАН Беларуси, Ин-т микробиологии; – Мн.: изд. И.П. Логвинов, 2002. – Т. 38, № 3. – С. 237–242.
38. Гончарова, И. А. Полисахариды клеточной стенки базидиомицета *Coriolus hirsutus* / И. А. Гончарова, В. В. Щерба, В. Г. Бабицкая // ПБиМ. – 1996. – Т. 32, № 4. – С. 434–437.
39. Горнова И. Б. Использование видимого света в биотехнологии / И. Б. Горнова // Современная микология России: первый съезда микологов России, 10–12 октября 2002г.: тез. докл. – Москва, 2002. – С. 294–295.
40. Горовой Л. Ф. Влияние света на морфогенез шляпочных грибов / Л. Ф. Горовой. – К.: Институт ботаники им. Н.Г. Холодного, 1989. – 44 с.
41. Горовой Л. Ф. Морфогенез пластинчатых грибов / Л. Ф. Горовой – К.: Наук. думка, 1990. – 166 с.
42. Горовой Л. Ф. Шляпочные грибы – перспективный источник лечебных препаратов и биологически активных добавок / Л. Ф. Горовой // Успехи медицинской микологии: II Всероссийский конгресс по медицинской микологии, 24-25 марта 2004 г.: материалы съезда. – М.: Национальная академия микологии, 2004. – Т. 3. – С. 212-215.
43. Гримблатов В. М. Современная аппаратура и проблемы низкоинтенсивной лазерной терапии / В.М. Гримблатов // Применение лазеров в биологии и медицине (сборник) — Киев, 1996. – С. 123 – 127.
44. Гриффитс Э. Методы практической биохимии / Э. Гриффитс [и др.] // [под ред. Б. Уильямс, К. Уилсон] – М.: Мир, 1978. – 384 с.

45. Громовых Т.И. Влияние когерентного света на показатели роста мицелия штаммов *Laetiporus sulphureus* (Bull.) Murill, *Fomitopsis officinalis* (Vill.: Fr.) Bond. et Sing., *Fomitopsis pinicola* (Sw.: Fr) P. Karst. и *Trametes versicolor* (L.: Fr.) Lloyd / Т.И. Громовых, Н.В. Жилинская, А.В. Иванов // Тезисы в материалах III Международного микологического форума «Современная микология в России». – Москва. – 2015. – Т. 5. – С. 186-188.
46. Грушенко М. М. Лигноуглеводные комплексы древесины / М. М. Грушенко, Т. С. Аникиенко, В. М. Резников // [под ред. В.Н.Сергеевой] – Рига: Зинатне, 1978. – 70 с.
47. Деклараційний патент № 36013 А Україна, 6 А01G1/04. Спосіб активації проростання спор вищого базидіального гриба *Hericium erinaceus* / Н.Л. Поєдинок, А.М. Негрійко, А.С. Бухало (Україна); 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.
48. Деклараційний патент № 53867 А Україна, 7 А01G1/64. 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.
49. Деклараційний патент № 53900 А Україна, 7 А01G1/04. 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.

50. Деклараційний патент № 53880 А Україна, 7 А01G1/64. . 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.
51. Деклараційний патент на корисну модель № 16930 Україна, 7 А01G1/04. 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.
52. Дудка И. А. Культивирование съедобных грибов / И. А. Дудка, Н. А. Бисько, В. Т. Билай – К.: Урожай. 1992. – 160 с.
53. 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, Н. Л. Поєдинок [и др.] // Микология и фитопатология. – 2010 – Т. 44, № 3. – С. 225–240.
54. Дьяков М. Ю. Описание морфологических и антимикробных свойств у представителей некоторых видов базидиомицетов, выделенных из природной среды / М. Ю. Дьяков, О. В. Камзолкина, Н. Л. Поєдинок [и др.] // Иммунопатология, аллергология, инфектология. – 2009. – № 1. – С. 248.
55. Елинов Н. П. Химия микробных полисахаридов / Н. П. Елинов. – М.: Высшая школа, Л.: Наука. – 1989. – 448 с.
56. Еремин А. Н. Кинетическая характеристика внеклеточных каталаз грибов *Penicillium piceum* F-648 и их вариантов, адаптированных к

- перексиду водорода / А. Н. Еремин // ПБиМ. – 2002. – Т. 38, № 4. – С. 374–380.
57. Ермаков А. И. Методы биохимического исследования растений / А. И. Ермаков – Л.: Агропромиздат, 1987. – 430 с.
 58. Ефременкова О. В. Антибиотики базидиальных грибов. Высшие базидиальные грибы: индивидуумы, популяции, сообщества / О. В. Ефременкова, О. В. Тихонова, Г. С. Катруха // Юбилейная конференция, посвященная 100-летию со дня рождения М.В. Горленко: материалы. – М.: ООО «Издательство Восток-Запад», 2008. – С. 164–166.
 59. Жарикова Г. Г. Изучение способа прорастания базидиоспор / Г. Г. Жарикова, С. Ф. Владимирова, М. В. Нефелова М.В. // Современные проблемы науки и образования. – 2008. – № 4. – С. 53–54.
 60. Жданова Н. Н. Экстремальная экология грибов в природе и эксперименте / Н. Н. Жданова, А. И. Василевская – К.: Наук. думка, 1982. – 168 с.
 61. Жданова Н. Н. Получение и характеристика меланина гриба *Cladosporium cladosporioides* (Fresen.) de Vries / Н. Н. Жданова [и др.] // Мікробіол. журн. – 1993. – Т. 55, № 1. – С. 79–84.
 62. Жилинская Н.В. Ускорение развития мицелия *Trametes versicolor* (L.) Lloyd под воздействием лазерного излучения 1,265 мкм / Н.В. Жилинская, Т.И. Громовых, В.Л. Евстигнеев, А.В. Иванов // Тезисы в материалах XXIII Международной научно-технической конференции «Лазеры в науке, технике, медицине». – Дивноморск. - 2012. – с. 96-97.
 63. Жилинская Н.В. Рост мицелия и плодоношение *Trametes versicolor* (L.) Lloyd в результате воздействия лазерного излучения 1,265 мкм / Н.В. Жилинская, Т.И. Громовых // Тезисы в материалах X Научно-практической конференции с международным участием «Живые системы». - 2012. – с. 10-12.

64. Жилинская Н.В. Действие лазерного излучения 1, 265 мкм на рост и развитие мицелия *Trametes versicolor* (L.) Lloyd / Н.В. Жилинская, Т.И. Громовых, В.Л. Евстигнеев, А.В. Иванов // Тезисы в материалах Международной научной конференции «Достижения и перспективы развития биотехнологии». – Саранск. - 2012. – с. 57.
65. Запрометов М. Н. Фенольные соединения растений: биосинтез, превращение, функции / М. Н. Запрометов // Новые направления в физиологии растений. – М.: Наука, 1985. – С. 143–162.
66. Зубкова С.М. О механизме биологического действия излучения гелий-неонового лазера / С.М. Зубкова // Биологические науки. – 1978.- № 7. – С. 30–37.
67. Иванов Б. В. Влияние лазерного облучения на семена гороха / Б. В. Иванов, А. В. Миляев, В. А. Миляев [и др.] // Аграрная наука. – 2001. – № 5. – С. 28–29.
68. Каневский В. А. Структура солнечного спектра. Механизмы фоторегуляции в биологии / В. А. Каневский, А. А. Сиваш – К.: Ин-т ботаники им. Н. Г. Холодного, 1988. – 29 с.
69. Капич А. Н. Содержание и жирнокислотный состав липидов дереворазрушающих базидиомицетов / А. Н. Капич, Е. С. Романовец, С. П. Войт // Микол. и фитопатол. – 1990. – Т. 24, № 1. – С. 51-56.
70. Капич А. Н. Фосфолипиды мицелия дереворазрушающих базидиомицетов / А. Н. Капич, Л. Н. Шишкина // Микол. и фитопатол. – 1993. – Т. 27, № 3. – С. 32–37.
71. Капич А. Н. Антиокислительная активность экстрактов мицелия ксилотрофных базидиомицетов / А. Н. Капич // Микол. и фитопатол. – 1995. – Т. 29, вып. 5–6. – С. 35– 40.
72. Капич А. Н. Перекисное окисление липидов и его регуляция в мицелии ксилотрофных базидиомицетов / А. Н. Капич, Л. Н. Шишкина // Микробиология. – 1995. – Т. 64, № 3. – С. 320–326.

73. Карпенко Ю. В. Вплив світла різного спектрального складу на жирнокислотні профілі мікроскопічних грибів, виділених з зони відчуження Чорнобильської АЕС / Ю. В. Карпенко // Доповіді НАНУ. – 2008. – № 10. – С. 190–197.
74. Кару Т. Й. Изменение ферментативной активности после облучения низкоинтенсивным лазерным светом / Т. Й. Кару, Г. Е. Федосеева, Т. С. Ляпунова // XI Всесоюзн. Конф. по когерентной и нелинейной оптике: 26-29 авг. 1985 г.: тез. докл., ч. 1. – М., 1985. – С. 181–182.
75. Кару Т. Й. О молекулярном механизме терапевтического действия низкоинтенсивного лазерного излучения / Т. Й. Кару // Докл. АН СССР. – 1986. – Т. 291, № 5. – С. 1245–1249.
76. Кару Т. Й. Различная чувствительность клеток организма – опухоленосителя к непрерывному и импульсному излучению He-Ne лазера / Т. Й. Кару [и др.] // II съезд биофизиков России, 23–27 авг. 1999 г.: тез. докл. раздел 9. – М., 1999. – С. 136–146.
77. Кару Т. Й. Универсальный клеточный механизм лазерной биостимуляции: фотоактивация фермента дыхательной цепи цитохромоксидазы [Электронный ресурс] / Т. Й. Кару // Голография: фундаментальные исследования, инновационные проекты и нанотехнологии. XXVI школа по когерентной оптике и голографии: материалы – Иркутск: «Папирус», 2008. – С. 156–175. – Режим доступа до журн.: <http://www.cohol.org/Downloads/school%2026.pdf>
78. Кейтс М. Техника липидологии / М. Кейтс. – М.: Мир, 1975. – 322 с.
79. Королюк М. А. Методы определения активности каталазы / М. А. Королюк, Л. И. Иванова, И. Г. Майорова [и др.] // Лабораторное дело. – 1988. – №1. – С.16–19.
80. Красновский А. А. Фосфоресцентный анализ синглетного молекулярного кислорода в фотобиологических системах / А. А. Красновский // Биологические мембраны. – 1998. – Т. 15, № 5. – С. 530–548.

81. Крицкий М. С. Некоторые биохимические аспекты фоторегуляции физиологических и морфологических процессов у грибов / М. С. Крицкий // [под ред. А. Л. Курсанова, Н. П. Воскресенской], Сб. статей. Фоторегуляция метаболизма и морфогенеза растений. – М.: Наука, 1976. – С. 97–111.
82. Крицкий М. С. Фоторегуляция метаболизма и онтогенеза у гетеротрофных микроорганизмов / М. С. Крицкий // Успехи микробиологии. – 1982. – № 17. – С. 41–62.
83. Крицкий М. С. Фоторецепторный аппарат *Neurospora crassa* / М. С. Крицкий, Т. А. Белозерская, В. Ю. Соколовский, С. Ю. Филиппович // Молекулярная биология. – 2005. – Т. 39, № 4. – С. 602–617.
84. Крицкий М. С. Фотовозбужденные молекулы флавиновых и птериновых коферментов в эволюции. Обзор / М. С. Крицкий, Т. А. Телегина [и др.] // Биохимия. – 2010. – Т. 75, № 10. – С. 1348–1366.
85. 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 [та ін.] // Укр. Ботан. Журн. – 2008. – Т. 6, № 4. – С. 590–594.
86. Курченко В. П. Биохимическая фармакология грибных меланинов / В. П. Курченко, Т.А. Кукулянская, Д.А. Новиков // Успехи медицинской микологии: второй всероссийский конгресс по медицинской микологии, 24–25 мар. 2004 г.: материалы; [ред. Ю. В. Сергеев и др.]. – М.: Национальная академия микологии, 2004. – Т. 3. – С. 156–158.
87. Лобко В. В. Существенная ли когерентность низкоинтенсивного лазерного света при его воздействии на биологические объекты

- / В. В. Лобко, Т. И. Кару, В. С. Летохов // Биофизика. – 1985. – Т. 30, вып. 2. – С. 366–371.
88. Лях С.П. Микробный меланиногенез и его функции / С. П. Лях – М.: Наука, 1981. – 273 с.
 89. Мантейфель В. М. Облучение He-Ne-лазером изменяет ультраструктуру митохондрий в последующих генерациях дрожжевых клеток / В. М. Мантейфель, Л. Е. Бакеева, Т. Й. Кару // Доклады академии наук. – 1999. – Т.366, № 5. – С. 702–704.
 90. Макаренко А. Н. Химический состав *Cordyceps sinensis* и особенности влияния отдельных его веществ на иммунную систему млекопитающих в условиях опухолевого роста / А. Н. Макаренко, М. П. Рудик, В. Н. Святецкая [и др.] / Біологія та фармація. Фітотерапія. Часопис. – 2012. – № 3 – С. 44–49.
 91. Макордей Ф. В. Алломеланины. Методы получения, физико-химические свойства, возможности практического использования / Ф. В. Макордей // Хим. и хим. технол. – 1994. – Т. 37. – С. 4–6.
 92. Методы исследования углеводов / [под ред. А. Я. Хорлина] – М.: Мир, 1975. – С. 9–13.
 93. Механизмы биостимуляции низкоинтенсивного лазерного излучения / [под ред. И. Г. Ляндреса] – Минск, 1998. – 207 с.
 94. 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. – 2009. – № 2. – С. 166–167.
 95. Михайлова О.Б. Ферментативная активность новых интродуцированных штаммов базидиомицетов / О.Б. Михайлова, Н.Л. Поединок, М.Ю. Дьяков, О.В. Камзолкина // Иммунопатология, аллергология, инфектология. – 2010. – № 1. – С.359-260.
 96. 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.
97. Михайлова О.Б. Научные основы создания перспективных биотехнологий культивирования лекарственных макромицетов *Piptoporus betulinus* (Bull.) P. Karst и *Flammulina velutipes* (Curtis) Singer / О.Б. Михайлова, Н.Л. Поединок // Успехи медицинской микологии. – М.: Национальная Академия Микологии, 2014. – Т.12. – С. 242-243.
 98. Москвин С.В. Основы лазерной терапии / С.В. Москвин, В.А. Буйлин – М.–Тверь: ООО «Издательство «Триада», 2006. – 256 с.
 99. Насонов Д. Н. Местная реакция протоплазмы и распространяющееся возбуждение / Д. Н. Насонов – М.-Л.: Изд-во АН СССР, 1992. – 426 с.
 100. Остерманн Л. А. Хроматография белков и нуклеиновых кислот / Л. А. Остерманн // [под ред. Г. П. Георгиев]. – М.: Наука, 1985. – 536 с.
 101. Пат. № 2249614 Российская Федерация, МКИ А 01 G 1/04. Способ получения посевного мицелия съедобных грибов / В. Е. Никитина; заявитель и патентообладатель Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов Российской Академии наук. – заявл. 21.03.03; опубл. 10.04.05.
 102. Пат. №2136141 Росийская Федерация, МКИ А 01 G 1/04. Способ стимулирования роста посевного мицелия шампиньона / Г. В. Денисов, А. И. Иванов, А. Ф. Блинохватов; заявитель и патентообладатель Пензенская государственная сельскохозяйственная академия – № 98110393/13; заявл. 01.06.98; опубл. 10.09.99.
 103. Пат. №2183056 Росийская Федерация , МКИ А 01 G 1/04. Способ Стимуляции Роста Культуры Вешенки Обыкновенной / О. А. Евдокимова, С. В. Польских и др.; заявитель и патентообладатель Воронежский государственный аграрный университет им. К.Д. Глинки – № 200010274/13; заявл. 03.02.00; опубл. 10.06.02.

104. Пат. RU 2263441 Российская Федерация, МКИ А 01 G 1/04. Способ стимуляции роста мицелия культивируемых съедобных грибов / А. Ф. Блинохватов, Ф. И. Иванов, П. А. Полубояринов, Л. В. Полубояринова, А. П. Стаценко; заявитель и патентообладатель Пензенская государственная сельскохозяйственная академия, А. П. Стаценко – заявл. 24.02.04; опубл. 20.11.05.
105. Пат. RU2188537 Российская Федерация, МКИ А 01 G 1/04. Способ проращивания базидиоспор высших грибов / В. И. Видяпин, Г. Г. Жарикова и др.; заявитель В. И. Видяпин, Г. Г. Жарикова и др.; заявитель и патентообладатель Российская экономическая академия им. Г.В. Плеханова – № 2001127257/13; заявл. 09.10.01; опубл. 10.09.02.
106. Патент на винахід № 76305 Україна, А01G 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.
107. Патент на корисну модель № 26074 Україна, А01G 1/04 А01Н 15/00 С12N 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.
108. Патент на винахід № 82960 Україна, С07K 5/00 А61K 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.
109. Патент на винахід № 102450 Україна, А01G 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.
110. Перт С. Дж. Основы культивирования микроорганизмов и клеток / С. Дж. Перт – М.: Мир, 1978. – 331с.
 111. Поєдинок Н. Л. Вплив низькоінтенсивного лазерного випромінювання на проростання базидіоспор і ріст монокаріонів *Hericium erinaceus* / Н. Л. Поєдинок, А. М. Негрійко [та ін.] // Укр. ботан. Журн. – 2001. – Т. 58, № 4. – С. 435–440.
 112. Поєдинок Н. Л. Использование низкоинтенсивного лазерного излучения для обработки посевного мицелия некоторых культивируемых высших базидиомицетов / Н. Л. Поєдинок, Ж. С. Потемкина // Современная микология в России: первый съезд микологов России, 11–13 апр. 2002 г.: материалы съезда. – Москва, 2002. – С. 284.
 113. Поєдинок Н. Л. Проростання базидіоспор їстівного гриба *Hericium erinaceus* (Bull. Fr.) Pers. (Aphyllphoromycetideae) за різних умов зберігання / Н. Л. Поєдинок // Укр. ботан. Журн. – 2002. – Т. 59, № 3. – С. 304–308.
 114. Поєдинок Н.Л. Использование лазерного излучения при культивировании некоторых видов съедобных базидиомицетов / Н.Л. Поєдинок, Ж. В. Потёмкина, А. С. Бухало [и др.] // Биотехнология. – 2003. – №2. – С. 59–64.
 115. Поєдинок Н.Л. Изучение влияния низкоинтенсивного лазерного света на антимикробную активность *Pleurotus ostreatus* (Jacq.:fr.) Kumm. / Н.Л. Поєдинок, О.В. Ефременкова, Ж.В. Потёмкина [и др.] // Успехи медицинской микологии. – М.: Национальная Академия Микологии, 2003. – Т.1. - С. 293-295.

116. Поединок Н.Л. Световой фактор в биотехнологии культивирования лекарственных грибов / Н.Л. Поединок // Успехи медицинской микологии. – М.: Национальная Академия Микологии, 2004. – Т.3. – С. 230-232.
117. 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.
118. Поединок Н.Л. Интенсификация технологических этапов культивирования съедобного гриба вешенки обыкновенной / Н.Л. Поединок, Н.А. Бисько, О.Б. Михайлова, Ж.В. Потёмкина [и др.] // Биотехнология. – 2004. - №5. – С. 64–67.
119. Поединок Н.Л. Лечебные свойства гериция шиповатого и перспективы его использования в биотехнологии и медицине / Н.Л. Поединок // Успехи медицинской микологии. – М.: Национальная Академия Микологии, 2005. – Т.5. – С. 276–278.
120. Поединок Н.Л. Способы интенсификации культивирования съедобных и лекарственных грибов / Н.Л. Поединок, Н.А. Бисько // Научно-практическая конференции «Грибоводство и смежные биотехнологии. Инновации для инвестиций», 7-12 октября 2005 г.: тез. док. – Москва, ВВЦ, Центр «Москва», 2005. - С.12-13
121. Поединок Н.Л. Световой фактор в биотехнологии культивирования ксилотрофных лекарственных грибов / Н. Л. Поединок, А. М. Негрейко // Проблемы лесоведения и лесоводства. Сб. науч. тр. - Гомель, 2005. – С.424 –426.
122. 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.

123. 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.
124. Поединок Н. Л. Световая регуляция роста грибов *Inonotus obliquus*, *Ganoderma lucidum* и видов рода *Morchella* / Н. Л. Поединок // 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.
125. Поединок Н. Л. Биосинтетическая активность некоторых высших лекарственных грибов после световых воздействий / Н. Л. Поединок, О. В. Ефременкова, А. М. Негрейко, О. Б. Михайлова // Успехи медицинской микологии. – М.: Национальная Академия Микологии, 2007. – Т.9. – С. 176–178.
126. Поединок Н.Л. Світлова регуляція росту та біосинтетичної активності *Ganoderma lucidum* у чистій культурі / Н.Л. Поединок, О.О. Сиваш, О.Б. Михайлова, А.С. Бухало, В.В. Щерба, Ж.В. Потьомкина, А.М. Негрійко // Укр. ботан. журн. – 2008. –Т.65, № 5. С. 711–286.
127. Поединок Н. Л. Влияние света на рост и биосинтетическую активность *Cordyceps militaris* и *Cordyceps sinensis* / Н. Л. Поединок, О. Б. Михайлова, Т. А. Пучкова [и др.] // Современное состояние и перспективы развития микробиологии и биотехнологии: VI международ. науч. конф., 2–6 июня 2008 г.: материалы. – Минск, 2008. – С.118–120.
128. Поединок Н.Л. Регуляция биосинтерической активности видов р.*Morchella*. / Н. Л.Поединок, О. Б. Михайлова, А. С. Бухало [и др.] // Актуальные проблемы микробиологии и биотехнологии: межд. конф., 5–6 октября 2009 г.: материалы. – Кишнев, 2009. – С.136-138.

129. Поединок Н. Л. Фоторегуляция биосинтетической активности макромицетов-продуцентов биологически активных веществ / Н. Л. Поединок, О. Б. Михайлова, О. П. Ефременкова // Иммунопатология, аллергология, инфектология. – 2009. – № 2. – С. 166.
130. Поединок Н.Л., Регуляция биосинтерической активности видов *p.Morchella* / Н.Л. Поединок, О.Б. Михайлова, А.С. Бухало [и др.] // Current problems in microbiology and biotechnology: The National Scientific Conference with International Participation, Chisinau, Republic of Moldova, oct. 5–6, 2009 y., Acad. de Științe a Moldovei, Inst. de Microbiologie și Biotehnologie; com. șt. intern. Duca Gheorghe (preș.), Furdui Teodor, Zveaghințev 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.
131. Поединок Н.Л. Регуляция биосинтеза меланина у *Inonotus obliquus* (Pers.) Pilát. / Н.Л. Поединок // Иммунопатология, аллергология, инфектология. – 2010. – № 1. – С. 29–30.
132. 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.
133. 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.
134. Поединок Н. Л. Влияние света на морфогенез и метаболизм макромицетов / Н. Л. Поединок, А. М. Негрейко // [под ред.

- С. П. Вассера] – Биологические особенности лекарственных макромицетов в культуре. Т. 1. – К.: Альтепрес, 2011. – С. 164–211.
135. Поединок Н.Л. Рост и плодоношение базидиального гриба *Hericium erinaceus* (Bull.: Fr.) на растительных субстратах / Н.Л. Поединок, В.В. Трухоновец, Н.А. Бисько [и др.] // Труды БГТУ. серия Лесное хозяйство. – Гомель, 2012. – С. 277-281
 136. Поединок 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
 137. Поединок Н. Л. Использование искусственного света в биотехнологиях культивирования грибов / Н. Л. Поединок // Biotechnologia Acta. – 2013. – V.6, N 6. – P. 58–70.
 138. 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.
 139. Поединок Н.Л. Перспективы использования искусственного света в биотехнологиях культивирования лекарственных макромицетов / Н.Л. Поединок, О.Б. Михайлова, А.М. Негрейко // Успехи медицинской микологии. – М.: Национальная Академия Микологии, 2014. – Т.12. – С. 257–258.
 140. 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 і біотехнологія – 2015. – Т. 29, № 1. – С. 77-86.
 141. Поединок Н. Л. Влияние света низкой интенсивности на антимикробную активности некоторых макромицетов / Н. Л. Поединок, О. Б. Михайлова, А.М. Негрійко, И.А. Дудка, Б.Ф. Васильева, О.В.

- Ефременкова // Тезисы в материалах III Международного микологического форума «Современная микология в России». – Москва. – 2015. – Т. 5. – С. 209-211.
142. Поединок Н. Л. Фотоактивация посевного материала культивируемых макромицетов / Н. Л. Поединок, О. Б. Михайлова, В.М. Ходаковский, И.А. Дудка // Тезисы в материалах III Международного микологического форума «Современная микология в России». – Москва. – 2015. – Т. 5. – С. 213-215.
 143. Покровский А. А. Метаболические аспекты фармакологии и токсикологии пищи / П. А. Покровский – М: Медицина, 1979. – 184с.
 144. Покровский А. А. Беседы о питании / А. А. Покровский – М.: Экономика, 1986. – 367 с.
 145. Посудин Ю. И. Лазерная фотобиология / Ю. И. Посудин – К.: Выща школа, 1989. – 245 с.
 146. Потёмкина Ж.В. Светодиодные источники света для интенсивной технологии выращивания съедобных и лекарственных грибов / Ж.В. Потёмкина, А.М. Негрейко, Н.Л. Поединок // XX International School_Seminar “Spectroscopy of molecules and crystals”, 20-27 September, 2011y.: abst. - Beregove, Crimea, Ukraine, 2011 – С. 51.
 147. Правильное освещение растений. [Электронный ресурс]. // – 2008. – Режим доступа: http://promtehnika.com.ua/index3_plants.html
 148. Приезжев А. В. Лазерная диагностика в биологии и медицине / А. В. Приезжев, В. В. Тучин, Л. П. Шубочкин – М.: Наука, 1989. – 240 с.
 149. Псурцева Н. В. Эколого-таксономические предпосылки получения плодовых тел в культуре у макромицетов, представляющих интерес для медицины / Н. В. Псурцева, А. А. Кияшко, Н. В. Шахова // Успехи медицинской микологии. — 2007. — Т. 9. – С. 254–258.
 150. Пучкова Т. А. Биохимический состав гриба *Cordyceps militaris* – нового объекта биотехнологии / Т. А. Пучкова, В. Г. Бабицкая, В. В. Щерба [и

- др.]// [ред. Э. И. Коломиец и др.] – Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты: сб. науч. тр. НАН Беларуси, Ин-т микробиологии. – Мн.: изд. И.П. Логвинов, 2007. – Т. 1. – С. 299–305.
151. Пучкова Т. А. Влияние условий культивирования на образование полисахаридов грибом *Cordyceps militaris* / Т. А. Пучкова, В. Г. Бабицкая, В. В. Щерба [и др.] // 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.
 152. Пучкова Т. А. Характеристика полисахаридов, образуемых грибом *Cordyceps militaris* при погруженном культивировании / Т. А. Пучкова, В. Г. Бабицкая, В. В. Щерба, Т. В. Черноок, [и др.] // Current problems in microbiology and biotechnology: The National Scientific Conference with International Participation, Chisinau, Republic of Moldova, oct. 5–6, 2009 y., Acad. de Științe a Moldovei, Inst. de Microbiologie și Biotehnologie; com. șt. intern. Duca Gheorghe (preș.), Furdui Teodor, Zveaghințev D.G. [et al.]; com. org. Rudic Valeriu, Cepoi Liliana, Usatai Agafia [et al.]. – Ch.: S.n. (Tipogr. „Elena-V.I.” SRL), 2009. – P. 110-111.
 153. Пучкова Т. А. Характеристика полисахаридов энтомопатогенного гриба *Cordyceps militaris* / Т. А. Пучкова, В. Г. Бабицкая, В. В. Щерба [и др.] // Иммунопатология, аллергология, инфектология. – 2009. – № 1. – С. 55–56.
 154. Пучкова Т.А. Сравнительная характеристика ферментативной активности макромицетов разных экологических и систематических групп // Т.А. Пучкова, Н.А. Бисько [и др.] // Иммунопатология, аллергология, инфектология. – 2010. – № 1. – С. 31.
 155. Пучкова Т. А. Влияние условий культивирования на образование биологически активных веществ грибами рода *Cordyceps* и их

- антиоксидантную активность / Т. А. Пучкова, А. Н. Капич, О. В. Осадчая [и др.] // Труды БГУ – 2013. – Т. 8, Часть 1. – С. 246–252.
156. Рассел Д. Гомеостаз / Д. Рассел – М.: "VSD", 2012. – 80 с.
157. Сидоренко С. В. Перспективы контроля распространения антибиотикорезистентности / С. В. Сидоренко // Антибиотики и химиотерапия – 1998. – № 7. – С. 3–6.
158. Сидоренко С. В. Результаты многоцентрового исследования чувствительности стафилококков к антибиотикам в Москве и Санкт-Петербурге / С. В. Сидоренко, С. П. Резван, С. А. Грудина [и др.] // Антибиотики и химиотерапия. – 1998. – №7. – С. 15–25.
159. Сидоренко С. В. Рациональная антибиотикотерапия и доказательная медицина / С. В. Сидоренко // Антибиотики и химиотерапия. – 2001. – № 9. – С. 12–18.
160. Смирнов Д. А. Полисахариды глубинного мицелия *Ganoderma lucidum* / Д. А. Смирнов, Т. А. Пучкова // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2006. – № 5. – С. 177–179.
161. Соколовский В. Ю. Действие стрессов на дифференциальную экспрессию генов в ходе развития *Neurospora crassa* / В. Ю. Соколовский, Т. А. Белозерская // Успехи биологической химии. – 2000. – Т. 40. – С. 85–152.
162. Соломко Э. Ф. Минеральный состав некоторых видов культивируемых и дикорастущих грибов класса *Basidiomycetes* / Э. Ф. Соломко, А. А. Гродзинская, Л. А. Пашенко, Р. К. Пчелинцева // Микол. и фитопатол. – 1986. – № 6. – С. 474–478.
163. Соломко Э. Ф. Макро- и микроэлементы в плодовых телах высших базидиомицетов / Э. Ф. Соломко, А. А. Гродзинская // Грибы и лишайники в экосистеме. – Рига: Латв. ГУ. – 1985. – С. 17–19.
164. Соломко Е. Ф. Ріст окремих видів лікарських макроміцетів на живильних середовищах різного складу / Е. Ф. Соломко, М. Л.

- Ломберг, Н. Ю. Митропольська // Укр. бот. журн. – 2000. – Т. 57, № 2. – С. 119–126.
165. Соломко Э. Ф. Грибы как физиологически функциональный пищевой продукт и источник фармакологически активных лекарственных веществ / Э. Ф. Соломко // Перспективы использования лекарственных грибов при решении медико-экологических проблем: междунар. конф., 10-11 сент. 2004 г.: материалы. – К. – 2004. – С. 70–80.
 166. Стручкова И. В. Амилазная и оксидоредуктазная активность микодеструктора *Aspergillus terreus* при его росте на новых полимерных материалах / И. В. Стручкова, Е. С. Лазарева, В. Ф. Смирнов // Вест. Нижегородск. ун-та им. Н. И. Лобачевского. – 2010. – Т. 2, № 2. – С. 591–595.
 167. Сухомлин М. М. Комплекс морфологічних ознак при схрещуванні сумісних та несумісних монокаріотів гриба *Coriolus versicolor* (L.: Fr.) Quel / М. М. Сухомлин // Укр. бот. Журн. – 1998. – Т. 55, № 1. – С. 75–82.
 168. Сухомлин М. Н. Изучение условий прорастания спорбазидиомицетов для получения моноспоровых культур / М. Н. Сухомлин // Мікроб. журнал. – 2000. – Т. 62, № 3. – С. 3–8.
 169. Сушинская Н. В. Применеие термического анализа в изучении меланинов / Н. В. Сушинская, В. П. Курченко, Л. М. Шестак // Биохимия биологически активных соединений: сб. науч. ст. международной научной конференции, посвященной 40-летию кафедры биохимии БГУ, 16-18 ноября 2005г. / [ред. В.В. Сенчук и др.]. – Мн.: РИВШ, 2005. – С. 111–115.
 170. Тихонова О. В. Базидиальные грибы как источник антибиотиков / О. В. Тихонова, И. Г. Сумарукова, Б. Ф. Васильева [и др.] // III съезд Общества биотехнологов России им Ю.А. Овчинникова, 25–27 октября 2005 г.: материалы съезда. – М.: Макс-Пресс. – 2005. – С. 86.

171. Тихонова О. В. Оценка базидиальных грибов в качестве продуцентов антибиотиков / О. В. Тихонова, О. В. Ефременкова, Г. С. Катруха // Современная микология в России: второй съезд микологов России: тез. док. – М.: Национальная Академия микологии. – 2008. – Т. 2. – С. 520.
172. Тренин А. С. Антимикробная и гиполипидемическая активность штаммов *Lentinus edodes* и *Ganoderma lucidum* / А. С. Тренин, Е. А. Цвигун, Н. Ю. Соболева [и др.] // Иммунопатология, аллергология, инфектология. – 2010. – № 1. – С. 270.
173. Трухоновец В. В. Рост и плодоношение базидиального гриба *Hericium erinaceus* (Bull.: Fr.) на растительных субстратах / В. В. Трухоновец, Н. А. Бисько, Н. Л. Поединок [и др.] // Труды БГТУ, серия Лесное хозяйство. – 2012. – С. 277–281.
174. Феофилова Е. П. Пигменты микроорганизмов / Е. П. Феофилова – М.: Наука. – 1974. – 218 с.
175. Феофилова Е. П. О зависимости жирнокислотного состава липидов грибов рода *Penicillium* от их природных условий обитания / Е. П. Феофилова, Е. Н. Бабьева, С. С. Абызов // Микробиология. – 1985. – Т. 54, № 5. – С. 763–769.
176. Феофилова Е. П. Влияние температурных воздействий на состав липидов *Cunninghamella japonica* / Е. П. Феофилова [и др.] // Микробиология. – 1986. – Т. 55, № 5. – С. 737–744.
177. Феофилова Е. П. Изменения в липидном и углеводном составе клеток грибов в процессе онтогенеза и использование этих данных в хемотаксономии / Е. П. Феофилова, М. В. Михайлова, Г. Г. Шумская [и др.] // Микол, и фитопатол. – 1991. – Т. 25, вып.4. – С. 348–359.
178. Феофилова Е. П. Полиаминосахариды мицелиальных грибов: новые биотехнологии и перспективы практического использования (обзор) / Е.П. Феофилова, Д. В. Немцев, В. М. Терешина [и др.] // ПБиМ ПБиМ. – 1996. – Т. 32, № 5. – С. 483–492.

179. Феофилова Е.П. Липидный состав плодовых тел и глубинного мицелия *Lentinus edodes* (Berk.) Sing и *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler / Е. П. Феофилова [и др.] // Микробиология. – 1998. – Т.67, № 5. – С. 655–659.
180. Феофилова Е. П. Изменения в составе углеводов цитозоля в процессе цитодифференцировки грибов порядка *Agaricales* / Е. П. Феофилова, В. М. Терешина, А. С. Меморская [и др.] // Микробиология. – 1999. – Т. 68, № 3. – С. 356–361.
181. Феофилова Е. П. Проращение базидиоспор *Agaricus bisporus* / Е. П. Феофилова, В. М. Терешина, Л. В. Гарибова [и др.] // ПБиМ. – 2004. – Т.40, № 2 – С. 220–226.
182. Фрайкин Г. Я. Действие видимого света на клетки дрожжей / Г. Я. Фрайкин, В. Н. Верхотуров, Л. Б. Рубин // Вести МГУ, серия «Биология, почвоведение» – 1973. – Т. 4. – С. 51–57.
183. Фрайкин Г. Я. Практическое использование метода фотостимуляции развития при культивировании промышленных штаммов микроорганизмов / Г. Я. Фрайкин, Л. Б. Рубин, О. В. Еремеева [и др.] // ПБиМ. – 1974. – Т. 10, № 1. – С. 971–974.
184. Цыганкова В. А. Генетический и эпигенетический контроль роста и развития растений. Гены фотоморфогенеза и регуляция их экспрессии светом / В. А. Цыганкова, Л. А. Галкина, Л. И. Мусатенко, К. М. Сытник // Біополімери і клітина. – 2004. – Т. 20. № 6. – С. 451–471.
185. Черноок Т. В. Влияние температуры культивирования на рост и образование липидов грибами / Т. В. Черноок, Т. С. Гвоздкова, В. В. Щерба [и др.] // Современное состояние и перспективы развития микробиологии и биотехнологии: VI Межд. науч. конф., 2-6 июня 2008 г.: материалы, [под ред. Э. И. Коломиец]. – Минск: изд. И.П. Логвинов, 2008. – Т. 2. – С. 191–193.

186. Шиврина А. Н. Биосинтетическая деятельность высших грибов / А. Н. Шиврина, О.П. Низковская, Н. Н. Фалина [и др.] – М., Л.: Наука, 1969. – 241с.
187. Шуваев В. А. Определение фосфолипидов в новых видах сухой жировой смеси для производства ЗМЦ / В. А. Шуваев, Ю. И. Филатов, П. А. Омелянчук // Вестник Сев. Кав. ГТУ, серия «Продовольствие». – 2004. – Т.7, № 1. – С. 85–89.
188. Щерба В. В. Внеклеточные полисахариды некоторых видов базидиомицетов / В. В. Щерба [и др.] // Вести АН Беларуси, Сер. биол. наук. – 1994. – №3. – С. 49–52.
189. Щерба, В. В. Меланиновые пигменты микромицетов / В. В. Щерба, Т. В. Филимонова, В. Г. Бабицкая // Проблемы микробиол. и биотехнол.: Межд. конф. Нац. акад. наук Респ. Беларусь: материалы. – Мн.: ин-т микробиол., 1998. – С. 142–143.
190. Щерба В. В. Меланиновые пигменты некоторых базидиомицетов / В. В. Щерба [и др.] // Весці Нац. акад.наук Беларусі. Сер. біял. навук. – 1999. – №. 2. – С. 49–53.
191. Щерба В. В. Полисахариды ксилотрофных базидиомицетов / В. В. Щерба, В. Г. Бабицкая // ПБиМ. – 2008. – Т. 44, № 1. – С. 90–95.
192. Щерба В. В. Биологически активные липиды базидиальных грибов / В. В. Щерба, В. Г. Бабицкая, Т. А. Пучкова [и др.] // Иммунопатология, аллергология, инфектология. – 2009. - № 2. – С. 223–224.
193. Abe M. Effect of the light emitting diode irradiation on mycelial growth and yield of Shiitake (*Lentinula edodes*) / M. Abe // JPN Soc. Mushr. Sci. Biotech. – 2007 – V. 15, N 2. – P. 103–108.
194. Adejoye O. D. Physicochemical Studies on *Schizophyllum commune* (Fries) a Nigerian Edible Fungus / O. D. Adejoye, B. C. Adebayo-Tayo, A. A. Ogunjobi, O. O. Afolabi // World Applied Sci. J. – 2007. – V. 2, N 1. – P. 73–76.

195. Ahn J. K. Submerged Culture Conditions for the Production of Exo- and Endopolysaccharides by *Ganoderma applanatum* / J. K. Ahn, Y. Lee, W. Y. Park, P. S. Young // Int. J. of Med. Mushr. – 2005. – V. 7, N 3. – P.213.
196. Al Zidan N. Ali. A review on antitumor actions of polysaccharide isolated from medicinal mushrooms / Ali N. Al Zidan, H. Alneameh // Int. J. Acad. Sci. Res. – 2014. – V. 2, N 1. – P. 14–20.
197. Al-Mughrabi Kh. I. The mating system of *Daedaliopsis confragosa* / Kh. I. Al-Mughrabi, T. Hsiang // Mycologia. – 1998. –T. 90, N 1. – P. 82–84.
198. Alvarez-Parrilla E. Total phenol and antioxidant activity of commercial and wild mushrooms from Chihuahua, Mexico / E. Alvarez-Parrilla, L. A. de la Rosa, N. R. Martinez Aguilar, G.A. Gonzalez // Cienc. Technol. Aliment.– 2007. – V. 5, N 5. – P. 329–334.
199. Alves M. J. Review on antimicrobial activity of mushroom (Basidiomycetes) extracts and isolated compounds / M. J. Alves, I. C. Ferreira, J. Dias, V. Teixeira, [et al.] / Planta Med. – 2012. – V. 78, N 16. – P. 1707–1718.
200. Alves M. J. Review on antifungal activity of mushroom (basidiomycetes) extracts and isolated compounds / M. J. Alves, I. C. Ferreira, J. Dias, V. Teixeira, [et al.] // Curr. Top. Med. Chem. – 2013. – V. 13, N 21. – P. 2648–2659.
201. Amorim A. M. The application of catalase for the elimination of hydrogen peroxide residues after bleaching of cotton fabrics / A. M. Amorim // Ann. Brasil. Acad. Sci. – 2002. – V. 74, N 3. – P. 433–436.
202. Aqueveque P. Antimicrobial activity of metabolites from mycelial cultures of chilian basidiomycetes / P. Aqueveque, J. Becerra, G. Palfner [et al.] // J. Chil. Chi. Soc. – 2006. – V. 51, N 4. – P. 1057-1060.
203. Arango C. S. Cultivo biotecnológico de macrohongos comestibles: una alternativa en la obtención de nutraceuticos / C. S. Arango, I. J. Nieto // Rev. Iberoamericana Micol. – 2013. – V. 30, N 1.– P. 1–8.

204. Arias C. A. Antibiotic-resistant bugs in the 21st Century — A Clinical Super-Challenge / C. A. Arias, B. E. Murray // *New Engl. J. Med.* – 2009. – V. 360, N 5. – P. 439–443.
205. Asatiani M. D. Antioxidant activity of submerged cultured mycelium extracts of higher basidiomycetes mushrooms / M. D. Asatiani, V. Elisashvili, S. P. Wasser [et al.] // *Int. J. Med. Mushr.* – 2007. – N 9. – P. 151–158.
206. Asatiani M. D. Free-radical scavenging activity of submerged mycelium extracts from higher basidiomycetes mushrooms / M. D. Asatiani, V. Elisashvili, S. P. Wasser [et al.] // *Biosci. Biotech. Biochem.* – 2007. – N 71. – P. 3090–3092.
207. Atri N. S. Effect of vitamins and growth regulators on the vegetative growth of *Lentinus connatus Berk* / N. S. Atri, D. Kumari, S. K. Sharma // *Indian J. Mushr.* – 2010. – V. 28, N 1–2. – P. 63–69.
208. Atri N. S. Effect of vitamins and growth regulators on the vegetative growth of *Lentinus squarrosulus* / N. S. Atri, B. Kumari, R. Singh, R. C. Upadhyay // *Mycosphere.* – 2013. – V. 4, N 6. – P. 1080–1090.
209. Avalos J. Fungal carotenoid production / J. Avalos, E. Cerda-Olmedo // [eds. D. K. Arora, P. D. Bridge, D. Bhatnagar] – *Handbook of fungal biotechnology.* – N. Y.: Marcel Dekker, 2004. – P. 367–378.
210. Avalos J. Photoinduction of carotenoid biosynthesis in *Gibberella fujikuroi* / J. Avalos, E. L. Schrott // *FEMS Microbiol. Lett.* – 1990. – V. 66, N 1–2. – P. 295–298.
211. Babitskaya V. G. Exopolysaccharides of some medicinal mushrooms: production and composition / V. G. Babitskaya, V. V. Scherba, N. Y. Mitropolskaya, N. A. Bisko // *Int. J. Med. Mushr.* – 2000. – V. 2, N 1. – P. 51–54.
212. Babitskaya V. G. Melanin complex from medicinal mushroom *Inonotus obliquus* (Pers.:Fr.) Pilat (Chaga) (Aphyllphoromycetideae)

- / V. G. Babitskaya, V. V. Scherba, N. V. Ikonnikova [et al.] // Int. J. Med. Mushr. – 2002. – N 4. – P. 139–146.
213. Babitskaya V. G. Some physiological aspects of the submerged cultivation of culinary-medicinal shiitake mushroom *Lentinus edodes* (Agaricomycetideae) / V. G. Babitskaya, N. A. Bisko [et al.] // Ibid. – 2004. – V. 6, N 4. – P. 345–349.
214. Babitskaya V. G. The influence of different factors on the polysaccharide accumulation of *Ganoderma lucidum* / V. G. Babitskaya, N. A. Bisko, N. L. Poyedinok [et al.] // Int. J. Med. Mushr. – 2007. – V. 9, N 3&4. – P. 274.
215. Badalyan S. M. Edible and medicinal higher basidiomycetes mushrooms as a source of natural antioxidants / S. M. Badalyan // Int. J. Med. Mushr. – 2003. – V. 5, N 1. – P. 153–162.
216. Balandykin M. E. Review on chaga medicinal mushroom, *Inonotus obliquus* (higher basidiomycetes): Realm on medicinal applications and approaches on estimating its resource potential / M. E. Balandykin, I. V. Zmitrovich // Int. J. Med. Mushr. – 2015. – V. 17, N 2. – P. 95–104.
217. Ballario P. White-collar proteins: PASSing the light signal in *Neurospora crassa* / P. Ballario, G. Macino // Trends Microbiol. – 1997. – V. 5, N. 11. – P. 458–462.
218. Ballario P. Roles in dimerization and blue light photoresponse of the PAS and LOV domains of *Neurospora crassa* white collar proteins / P. Ballario, C. Talora, D. Galli [et al.] // Mol. Microbiol. – 1998. – V. 29. – P. 719–729.
219. Bao X. Structural and immunological studies of major polysaccharide from spores of *Ganoderma lucidum* (Fr.) Karst / X. Bao, C. Liu, J. Fang, X. Li // Carbohydrate Res. – 2001. – V. 33, N 1. – P. 67–74.
220. Beelman R. B. L-Ergothioneine, a potent antioxidant in cultivated mushrooms: a review / R. B. Beelman, N. J. Dubost, V. Hausman // Int. J. Med. Mushr. – 2007. – V. 9, N 3–4. – P. 279–280.

221. Bejarano E. R. Photoinduced accumulation of carotene in *Phycomyces* / E. R. Bejarano, J. Avalos, E. D. Lipson, E. Cerda-Olmedo // *Planta*. – 1991. – V. 183, N 1. – P. 1–9.
222. Beltran-Garcia M. J. Volatile compounds secreted by the oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) and their antibacterial activities / M. J. Beltran-Garcia, M. Estarron-Espinosa, T. J. Ogura // *J. Agric. Food Chem.* – 1997. – V. 45, N 10. – P. 4049–4052.
223. Bennett J. W. Secondary metabolism and differentiation in fungi / J. W. Bennett // [eds. J.W. Bennett, A. Ciegler]. – N. Y., Basel: Marsel Decker Inc., 1983. – P. 1–32.
224. Berdy J. Bioactive microbial metabolites / J. Berdy // *J. Antibiot.* – 2005. – V. 58, N 1. – P. 1–26.
225. Blumenthal H. J. Reserve carbohydrates in fungi. In: *The filamentous fungi* / H. J. Blumenthal // [eds. J. E. Smith, D. R. Berry, J. Wiley] – N. Y., 1976. – P. 292–307.
226. Braaksma A. Protein analysis of the common mushroom *Agaricus bisporus*. *Postharv* / A. Braaksma, D. J. Schaap // *Posth. Biol. Tech.* – 1996. – N 7. – P. 119–127.
227. Breene W. M. Nutritional and medicinal value of speciality mushrooms. / W. M. Breene // *J. Food Protect.* – 1990. – V. 53, N. 10. – P. 883–894.
228. Briggs W. Phytochemicals: chemical and physical properties and mechanism of action / W. Briggs, V. Rice // *Annual Rev. Plant Physiol.* – 1972. – V. 23. – P. 293–334.
229. Brumer P. Molecular response in one-photon absorption via natural thermal light vs. pulsed laser excitation / P. Brumer, M. Shapiro // *P. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2012. – V. 10, N. 48. – P. 19575–19578.
230. Brunner M. Interlocked feedback loops of the circadian clock of *Neurospora crassa* // M. Brunner, K. Kaldi // *Mol. Microbiol.* – 2008. – V. 68, N 1. – P. 255–262.

231. Bulseco M. G. Morphogenesis of *Schizophyllum commune*, a wild edible mushroom of Mt. Nagpale, Abucay, Bataan, Philippines / M. G. Bulseco, E. Abella, R. G. Reyes // J. Nature Studies. – 2005. – V. 4, N 1. – P. 20–28.
232. Çağlarırnak N. The importance of essential nutrients in nutrition / N. Çağlarırnak // Proceedings of the Food Science and Technology Congress in 2000s', İzmir. – Turkey, 1999. – P. 24–28.
233. Çağlarırnak N. Determination of nutrients and volatile constituents of *Agaricus bisporus* (brown) at different stages / N. Çağlarırnak // J. Food Sci. Agr. – 2009. – N 89. – P. 634–638.
234. Çağlarırnak N. Physical properties, nutrients, and estimated volatiles of *Agaricus bisporus* (white) at two harvests / N. Çağlarırnak // Ital. J. Food Sci. – 2011. – V. 23, N 4. – P. 423.
235. Calpouzous L. Fungus spore germination inhibited by blue and far red radiation / L. Calpouzous, Ho-Shii Chang // Plant Physiology. – 1971. – V. 47, N 5. – P. 729–730.
236. Carlile M. J. The photobiology of fungi / M. J. Carlile // Annu. Rev. Plant. Physiol. – 1965. – V. 16. – P. 175–202.
237. Casas-Flores S. Cross talk between a fungal blue-light perception system and the cyclic AMP signaling pathway / S. Casas-Flores, M. Rios-Momberg, T. Rosales-Saavedra [et al.] // Eukaryot Cell. – 2006. – V. 5, N 3. – P. 499–506.
238. Cerda-Olmedo E. *Phycomyces* and the biology of light and color / E. Cerda-Olmedo // FEMS Microbiol. Rev. – 2001. – V. 25, N 5. – P. 503–512.
239. Chang S. T. *Volvariella volvaceae* and its life history / S. T. Chang, Ch. K. Yan // Am. J. Bot. – 1971. – V. 58, N 6. – P. 552–561.
240. Chang S. T. The biology and cultivation of edible mushroom / S. T. Chang, W. A. Hayes – N. Y.: Acad. Press, 1978. – 819 p.
241. Chang S. T. Edible mushrooms and their Cultivations / S. T. Chang, P. G. Miles – Boca Raton, Florida: CRC Press Inc., 1989. – 345 p.

242. Chang S. T. Global impact of edible and medicinal Mushrooms on human welfare in the 21-st century: nongreen revolution / S. T. Chang // Intern. J. Med. Mushr. – 1999. – V. 1, N 1. – P. 1–7.
243. Chang S. T. World production of cultivated edible and medicinal mushrooms in 1997 with emphasis on *Lentinus edodes* (Berk.) / S. T. Chang // Sing. in China. International J. of Med. Mushr. – 1999. – N. 1. – P. 291–300.
244. Chang S. T. Mushrooms. Cultivation, nutritional value, Medicinal effect and Environmental impact / S. T. Chang, Ph. G. Miles – London, N. Y., Washington: CRC Press, 2004. – 451 p.
245. Chang S.T. The role of culinary- medicinal mushrooms on human welfare with a pyramid model for human health / S. T. Chang, S. P. Wasser // Int. J. Med. Mushrooms. – 2012. – V.1, N 95. – P. 134.
246. Chen C. F. Aqueous extract of *Inonotus obliquus* (Fr.) Pilát (Hymenochaetaceae) significantly inhibits the growth of sarcoma 180 by inducing apoptosis / C. F. Chen, W. Zheng, X. Gao [et al.] // Am. J. Pharmacol. Toxicol. – 2007. – V. 2, N 1. – P. 10-27.
247. Chen C. H. Genome-wide analysis of light-inducible responses reveals hierarchical light signalling in *Neurospora* / C. H. Chen, C. S. Ringelberg, R. H. Gross [et al.] // EMBO J. – 2009. – V. 28, N 8. – P. 1029–1042.
248. Chen, Q. X. Inhibitory effects on mushroom tyrosinase by *p*-alkoxybenzoic acids / Q. X. Chen, K. K. Song, L. Qiu [et al.] // Food Chem. – 2005. – V. 91, N 2. – P. 269–274.
249. Chen W. Optimization for the production of exopolysaccharide from *Fomes fomentarius* in submerged culture and its antitumor effect in vitro / W. Chen, Z. Zhao, S-F. Chen, Y-Q. Li // Bioresour Technol. – 2008. – V. 99. – P. 3187–3194.
250. Cheng P. WHITE COLLAR-1, a multifunctional *Neurospora* protein involved in the circadian feedback loops, light sensing, and transcription

- repression of *wc-2* / P. Cheng, Y. Yang, L. Wang [et al.] // J. Biol. Chem. – 2003. – V. 278. – P. 3801–3808.
251. Chihara G. Fractionation and purification of polysaccharides with marked antitumor activity, especially lentinan, from *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. (an edible mushroom) / G. Chihara, J. Hamuro, Y. Y. Maeda [et al.] // Cancer Res. – 1970. – V. 30, № 11. – P. 2776–2781.
 252. Chovanec P. Vegetative growth, aging- and light-induced conidiation of *Trichoderma viride* cultivated on different carbon sources / P. Chovanec, D. Hudecova, L. Varecka // Folia Microbiol. – 2001. – V. 46. – P. 417–422.
 253. Clifford A. J. Bioavailability of food folates and evaluation of food matrix effects with a rat bioassay / A.J. Clifford, M. K. Heid, J. M. Peerson, N. D. Bills // J. Nutr. – 1991. – V. 121. – P. 445–453.
 254. Corner E. J. H. An evolutionary study in Agarics: *Collybia apalosarea* and the veils / E. J. H. Corner // Trans. Brit. Mycol. Soc. – 1934. – V. 19, N 1. – P. 39–88.
 255. Corner E. J. H. Hydrophorus with dimorphous basidiospores / E. J. H. Corner // Trans. Brit. Mycol. Soc. – 1936. – V. 20, N 2. – P. 157–184.
 256. Correa A. Multiple oscillators regulate circadian gene expression in *Neurospora* / A. Correa, Z. A. Lewis, A. V. Greene [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2003. – V. 100, N 23. – P. 13597–13602.
 257. Corrochano L. M. Photomorphogenesis and gravitropism in fungi / L. M. Corrochano, P. Galland // [eds. U. Kues, R. Fisher] – The Mycota. Growth, Differentiation and Sexuality, V. I – Berlin: Springer-Verlag, 2006. – P.233–259.
 258. Corrochano L. M. Fungal photoreceptors sensory molecules for fungal development and behaviour / L. M. Corrochano // Photochemical Photobiological Sci. – 2007. – V.6, N 7. – P. 725–736.
 259. Corrochano L. M. Light sensing. In: Cellular and Molecular Biology of Filamentous Fungi / L. M. Corrochano, J. Avalos // [eds. K. A.

- Borkovich, D. J. Ebbole] – Washington DC: American Society for Microbiology Press, 2010. – P. 417–441.
260. Corrochano L. M. Fungal photobiology: a synopsis / L. M. Corrochano // IMA Fungus. – 2011. – V. 2, N 1. – P. 25–28.
261. Coşkun Y. Acid and EDTA blanching effects on the essential element content of mushrooms (*Agaricus bisporus*) / Y. Coşkun, Y. Özdemir // J. Sci. Food Agric. – 2000. – V. 80, N. 14. – P. 2074–2076.
262. Couto S. R. Laccase production at reactor scale by filamentous fungi / S. R. Couto, J. L. Toca-Herrera // Biotechnol. Adv. – 2007. – V. 25. – P. 558–569.
263. Crisan E.V. Nutritional value / E. V. Crisan, A. Sands // [eds. S. T. Chang, W. A. Hayes.] – The biology and cultivation of edible mushrooms. – N. Y.: Acad. Press, 1978. – P. 137–168.
264. Crosson S. The LOV domain family: photoresponsive signaling modules coupled to diverse output domains / S. Crosson, S. Rajagopal, K. Moffat // Biochemistry. – 2003. – V. 42, N 1. – P. 2–10.
265. Cui J. Polysaccharopeptides of *Coriolus versicolor*: physiological activity, uses, and production / J. Cui, Y. Chisti // Biotech. Advances. – 2003. – V. 21, N 2. – P. 109–122.
266. Dai Yu-Ch. Species diversity and utilization of medicinal mushrooms and fungi in China (review) / Yu-Ch. Dai, Zh-L. Yang, B-K. Cui, Ch-J. Yu // Int. J. Med. Mushr. – 2009. – V. 11, N 3. – P. 287–302.
267. Daniel J. W. In «Cell synchrony – studies in biosynthetic regulation» / J. W. Daniel // [eds. I. L. Cameron, A. M. Padilla] - N.Y.: Acad. Press, 1966. – P. 117–152.
268. Daub M. E. Photoactivated perylenequinone toxins in fungal pathogenesis of plants / M. E. Daub, S. Herrero, K. R. Chung // FEMS Microbiol. Lett. – 2005. – V. 252, N 2. – P. 197–206.
269. Davis J. Inactivation of antibiotic and the dissemination of resistance genes / J. Davis // Science. – 1994. – V. 264. – P. 375–382.

270. Davitashvili E. Evaluation of higher Basidiomycetes mushroom lectin activity in submerged and solid-state fermentation of agro-industrial residues / E. Davitashvili, E. Kapanadze, E. Kachlishvili [et al.] // Int. J. Med. Mushr. – 2008. – N. 10. – P. 173–178.
271. Delbrück M. System analysis for the light growth reaction in *Phycomyces*. Cellular mechanisms in differentiation and growth / M. Delbrück, W. Reichardt // [ed. D. Rudnick]. – New Jersey: Princeton University Press, 1956. – 44p.
272. Demirbaş A. Concentrations of 21 metals in 18 species of mushrooms growing in the East Black Sea region / A. Demirbaş // Food Chem. – 2001. – V. 75. – P. 453–457.
273. Denault D. L. WC-2 mediates WC1-FRQ interaction within the PAS protein-linked circadian feedback loop of *Neurospora* / D. L. Denault // EMBO J. – 2001. – V. 20, N 1-2. P. 109–117.
274. D'Enfert C. Fungal spore germination: Insights from the molecular genetics of *Aspergillus nidulans* and *Neurospora crassa* / C. D'Enfert // Fungal Genet. Biology. – 1997. – V. 21, N 2. – P. 163–172.
275. Denisova N. P. Tromolytic activity of mushrooms proteinases: thrombolytic activity of proteinases from *Coprinus domesticus*, *C. cinereus* and *Cerrena unicolor* / N. P. Denisova, V. N. Mikhailov, N. N. Petrishcev // Int. J Med. Mushr. – 1999. – V. 1, N 2. – P. 187–190.
276. Deploey J. J. Some factors affecting the germination of *Thermoascus aurantiacus* ascospores / J. J. Deploey // Mycologia. – 1995. – V. 87, N 3. – P. 362–365.
277. Deploey J. J. The effects of temperature, nutrients, and spore concentration on germination of conidia from *Dactylomyces termophilus* / J. J. Deploey // Biodeterior Res. – 1990. – V. 3, N 3. – P. 617–626.
278. Didukh M. Y. Medicinal value of species of the family *Agaricaceae* Cohn (higher Basidiomycetes) current stage of knowledge and future perspectives

- / M. Y. Didukh, S. P. Wasser, E. Nevo // Int. J. Med. Mushr. – 2003. – V. 5. – P. 133-152.
279. Donadio S. Targets and assays for discovering novel antibacterial agents / S. Donadio, L. Carrano, L. Brandi [et al.] // J. Biotechnol. – 2002. – V. 99. – P. 175–185.
280. Dong, C. H. Nutritional requirements of mycelial growth of *Cordyceps sinensis* in submerged culture / C. H. Dong, Y. I. Yao // J. Appl. Microbiol. – 2005. – V. 99, N 3. – P. 483–492.
281. Dong J. Z. Effects of selenium and light wavelengths on growth and main active components of liquid cultured *Cordyceps militaris* / J. Z. Dong, M. R. Liu, C. Lei [et al.] // Appl. Biochem. Biotechnol. – 2012. – V. 166, N 8. – P. 2030–2036.
282. Dörfelt H. The carpophore development of *Xerula radicata* (Basidiomycetes/Agaricales) / H. Dörfelt // Flora. – 1982. – V. 172, N. 6. – P. 533–561.
283. Douglas G. E. The development of some exogenous species of Agarics / G. E. Douglas // Am. J. Bot. – 1918. – V. 5, N 1. – P. 36–54.
284. D'Souza C. A. Conserved cAMP signaling cascades regulate fungal development and virulence / C. A. D'Souza, J. Heitman // FEMS Microbiol. Rev. – 2001. – V. 25, N 3. – P. 349–364.
285. Dubois M. Colorimetric method for determination of sugars and related substances / M. Dubois, K. A. Gilles, J. K. Hamilton [et al.] // Anal. Chem. – 1956. – V. 28, № 3. – P. 350–356.
286. Dulay R. M. R. Optimal growth conditions for basidiospore germination and morphogenesis of Philippine wild strain of *Lentinus tigrinus* (Bull.) Fr. / R. M. R. Dulay, E. C. Cabrera, S. P. Kalaw, R. G. Reyes // Mycosphere Doi. – 2012. – V. 10, N. 8 – P. 5943.
287. Duncan J.G. Isolation of a Galactomannan that enhances macrophage activation from the edible fungus *M. esculenta* / J. G. Duncan, N. Pugh,

- D. S. Pasco, S. A. Ross // J. Agricult. Food Chem. – 2002. – V. 50, N 6. – P. 5683–5685.
288. Duncan J. G. Survery of Southeast North American and Growing Macromycetes (Higher Basidiomycetes and Ascomycetes) sporophores for Biological Activity / J. G. Duncan, W. Cibula, S. Ross // Int. J. Med. Mushr. – 2003. – N 5. – P. 169-178.
289. Dunlap J.C. A circadian clock in *Neurospora*: how genes and proteins cooperate to produce a sustained, entrainable, and compensated biological oscillator with a period of about a day / J. C. Dunlap, J. J. Loros, H. V. Colot [et al.] // Cold Spring Harb. Symp. Quant Biol. – 2007. – V. 72. – P. 57–68.
290. Durand R. Action spectra for fruiting of the mushroom *Coprinus congregates* / R. Durand, R. Jacques // Arch. Microbiol. –1982. – V. 132, N 2. – P. 131-134.
291. Durand R. M. Production of cyclopiazonic acid, aflatrem, and aflatoxin by *Aspergillus flavus* is regulated by veA, a gene necessary for sclerotial formation / R. M. Durand, J. W. Cary, A. M. Calvo // Ibid.– 2007. – V. 73, N 4. – P. 1158–1168.
292. Efremenkova O. V. Antimicrobial activity of medicinal mushrooms from the genus *Coprinus* (Fr.) S. F. Gray (Agaricomycetidae) / O. V. Efremenkova, E. Yu. Ershova, I. V. Tolstych [et al.] // Int. J. of Med. Mushr. – 2003. – V. 5. – P. 37–41.
293. Elisashvili V. Submerged Cultivation of Medicinal Mushrooms: Bioprocesses and Products (Review) / V. Elisashvili // Int. J. Med. Mushr. – 2012. – V. 14, N 3. – P. 211–239.
294. Elmastas M. I. Antioxidant activity of two wild edible mushrooms (*Morchella vulgaris* and *M. esculenta*) from North Turkey / M. I. Elmastas, L. O. Turkekul, O. Gulein // Com. Chem. High T. Scr. – 2006. – V. 9, N 6. – P. 443–448.

295. Elvin M. The PAS/LOV protein VIVID supports a rapidly dampened daytime oscillator that facilitates entrainment of the *Neurospora* circadian clock / M. Elvin, J. J. Loros, J. C. Dunlap, C. Heintzen // *Genes Dev.* – 2005. – V.19, N 20 – P. 2593–2605.
296. Essing F. M. The morphologie, development and economic aspects of *Schizophyllum commune* / F. M. Essing // *Un. Cal. Publ. in Bot.* – 1922. – V. 7, N 14. – P. 447–498.
297. Eyal J. Production of indigotin in submerged culture using *Morchella* nov. ES-1 / J.Eyal, M. A. Mabud, J. F. Walter // *Appl. Biochem. Biotechnol.* – 1991. – V. 30. – P. 303–312.
298. Falandysz J. ICP/MS and ICP/AES elemental analysis (38 elements) of edible wild mushrooms growing in Poland / J. Falandysz, K. Szymczyk, H. Ichihashi H. [et al.] // *Food Add. Cont.* – 2001. – V. 18, N 6. – P. 503–513.
299. Fang Q.H. Significance of inoculation density control in production of polysaccharide and ganoderic acid by submerged culture of *Ganoderma lucidum* / Q. H. Fang, Y. J. Tang, J. J. Zhong // *Process Biochemistry.* – 2002. – V. 37. – P. 375–1379.
300. Farkas V. Effect of light on the concentration of adenine nucleotides in *Trichoderma viride* / V. Farkas, Z. Sulova, J. Lehotsky // *J. Gen. Microbiol.* – 1985. – V. 131, N 2. – P. 317–320.
301. Fazenda M. Submerged culture fermentation of higher fungi: the macrofungi / M. Fazenda, R. Seviour, B. McNeil, L. Harvey // *Adv. Appl. Microbiol.* – 2008. – V. 63. – P. 33–92.
302. Fedotov O. V. Wood-destroying fungi as bio-sources of ferments for medicinal and nutritional purposes / *Plant and Microbial Enzymes: isolation, characterization and biotechnology applications* / O. V. Fedotov – Tbilisi: Myza, 2007. – P. 125–126.
303. Fedotov O. V. Producing of enzyme preparation and analysis of enzyme preparation of peroxidase and catalase of some species of Basidiomycetes

- / O. V. Fedotov, T. E. Voloshko // Bull. Bogdan Chmelnytsky Melitopol State Pedagogical University. – 2013. – N 1. – P. 113–127.
304. Feng Y. L. Statistical optimization of media for mycelial growth and exopolysaccharide production by *Lentinus edodes* and a kinetic model study of two growth morphologies / Y. L. Feng, W. Q. Li, X. Q. Wu [et al.] // Biochem. Engin. J. – 2010. – V. 49. – P. 104–112.
305. Ferreira I. C. F. R. Compounds from wild mushrooms with antitumor potential / I. C. F. R. Ferreira, J. A. Vaz, M. H. Vasconcelos, A. Martins // Anticancer Agents Med. Chem. – 2010. – V. 10, N 5. – P. 424–436.
306. Fiema J. Chitin synthesis during growth of *Aspergillus giganteus* mut. alba in light and darkness / J. Fiema, T. Golbiewska // Acta Biol. Crac. – 1981. – V. 23, N 1. – P. 1–6.
307. Fiema J. Some aspects of nitrogen metabolism in *Aspergillus giganteus* mut. alba. I. Chitin content in the cell walls / J. Fiema // Acta Physiol. Plant. – 1983. – V. 5, N 2. – P. 113–121.
308. Fiema J. Glucans in the mycelium of *Aspergillus giganteus* mut. alba: alkali-soluble glucans / J. Fiema, A. Zurzycka, M. Bruneteau // J. Basic. Microbiol. – 1991. – V. 31, N 1. – P. 37–42.
309. Frago M. E. Characterization of *Aspergillus* species based on fatty acid profiles / M. E. Frago [et al.] // Mem. Inst. Oswaldo Cruz. – 2008. – V. 103, N 6. – P. 540–544.
310. Friedl M. A. Carbon source dependence and photostimulation of conidiation in *Hypocrea atroviridis* / M. A. Friedl, C. P. Kubicek, I. S. Druzhinina // Appl Env. Microbiol. – 2008. – V. 74. – P. 245–250.
311. Friedl M. A. Photostimulation of *Hypocrea atroviridis* growth occurs due to a crosstalk of carbon metabolism, blue light receptors and response to oxidative stress / M. A. Friedl, M. Schmoll, C. P. Kubicek, I. S. Druzhinina // Microbiology. – 2008. – V. 154. – P. 1229–1241.
312. Fries N. Germination of *Laccaria laccata* spores in vitro / N. Fries // Mycologia – 1977. – V. 69, N 4. – P. 848–850.

313. Fries N. Basidiospore germination in species of *Boletaceae* / N. Fries // Mycotaxon. – 1983. – V. 18, N 2. – P. 345-354.
314. Fries N. Ecological and evolutionary aspects of spore germination in the higher basidiomycetes / N. Fries // Trans. Brit. Mycol. Soc. – 1987. – V. 88. – P. 1–7.
315. Fritz B. H. Blue light photoreception in *Neurospora* orcadian rhythm: evidence for involvement of the flavin triplet state / B. H. Fritz, S. Kasai, K. Matsui // Photochem. Photobiol. – 1990. – V. 51, N 5. – P. 607–610.
316. Folch I. A simple method for isolation and purification of total lipids from animal tissues / I. Folch, M. Lees, G. H. S. Sloan-Staulet // J. Biol. Chem. – 1957. – V. 226, N 1. – P. 491-509.
317. Gaetani G. F. Predominant role of catalase in the disposal of hydrogen peroxide within human erythrocytes / G. F. Gaetani, F. M. Ferraris, M. Rolfo [et al.] // Blood. – 1996. – V. 87, N 4. – P. 1595–1599.
318. Gagliardi S. A novel property of adenine nucleotides: sensitivity to helium-neon laser in mitochondrial reactions / S. Gagliardi, A. Atlante, S. Passarella // Biochem. Mol. Biol. Int. - 1997. – V. 41, N 3. – P. 449–460.
319. Galagan G. V. The genome sequence of the filamentous fungus *Neurospora crassa* / G. V. Galagan, S. E. Calvo [et al.] // Nature. – 2003. – V. 422. – P. 859–868.
320. Galland P. New trends in photobiology the role of flavins as photoreceptors / P. Galland, H. Senger // J. Photochem. Photobiol. – 1988. – V. 1, N 3. – P. 277–294.
321. Garce's R. Light-dependent decrease in alcohol dehydrogenase activity of *Phycomyces* / R. Garce's, J. R. Medina // Exp. Mycol. – 1985. – V. 9, N 2. – P. 94–98.
322. Garton G. A. Studies in carotenogenesis; general conditions governing beta-carotene synthesis by the fungus *Phycomyces blakesleeana* Burgeff / G. A. Garton, T. W. Goodwin, W. Lijinsky // Biochem. J. – 1951. – V. 38, N 2. – P. 154–163.

323. Ghosh J. Rapid induction of apoptosis in prostate cancer cells by selenium reversal by metabolites of arachidonate 5-lipoxygenase / J. Ghosh // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2004. – V. 315. – P. 624–635.
324. Ginns J. Comparative study of teleomorphs and anamorphs of *Pleurotus cystidiosus* and *Pleurotus smithii* / J. Ginns // Mycol. Res. – 1991. – V. 95. – P. 1264–1269.
325. Ginns J. Hericiun in North America: cultural characteristics and mating behavior / J. Ginns // Canad. J. Bot. – 1985. – V. 63. – P. 1551-1563.
326. Goldstein A. Light-stimulated polysaccharide and protein synthesis by synchronized, single generations of *Blastocladiella emersonii* / A. Goldstein, E. C. Cantino // J. Gen. Microbiol. – 1962. – V. 28, N 4. – P. 689–699.
327. Gottlieb D. The physiology of spore germination in fungi / D. Gottlieb // Bot. Rev. - 1950. – V. 16, N 5. – P. 229-256.
328. Graafmans W. D. J. Effect of blue light on metabolism in *Penicillium isariiforme* / W. D. J. Graafmans // J. Gen. Microbiol. – 1977. – V. 101, N 1. – P. 157–161.
329. Greco M. Helium-neon laser irradiation of rat liver mitochondria gives rise to a new subpopulation of mitochondria: isolation and first biochemical characterization / M. Greco, E. Perlino, D. Pastore [et al.] // J. Photochem. Photobiol. – 1999. – V. 10, N 1–2. – P. 71–78.
330. Greis H. Zur Entwicklungsgeschichte von *Lepiota acutesquamosa* Weinm / H. Greis // Jb. Wiss. Bot. – 1937. – V. 84, N 5. – P. 449–480.
331. Gresik M. Membrane potential, ATP, and cyclic AMP changes induced by light in *Trichoderma viride* / M. Gresik, N. Kolarova, V. Farkas // Exp. Mycol. – 1988. – V. 12, N 4. – P. 295–301.
332. Gressel J. Blue light photoreception / J. Gressel // Photochem. Photobiol. – 1979. – 30, N 6. – P. 749–754.

333. Gressel J. Photocontrol of Fungal development / J. Gressel, J. W. Rau // Encyclopedia of Plant Physiology, V.16B, Photomorphogenesis. – Berlin: Springer-varlag, 1983. – P. 603–639.
334. Grochowski W. Uboczna produkcja leśna [Side forest production] / W. Grochowski – Warszawa: PWN, 1990. – 544 p.
335. Grzybowski R. Właściwości odżywcze owocników i grzybni wegetatywnej grzybow wyższych [Nutrient properties of the fructification and vegetative mycelium of mushrooms] / R. Grzybowski // Przem. Spoż. – 1978. – V. 32, N 1. – P. 13–16.
336. Guo X. Optimization of a chemically defined medium for mycelial growth and polysaccharide production by medicinal mushroom *Phellinus igniarius* / X. Guo, X. Zou, M. Sun // World J. Microbiol. Biotechnol. – 2009. – V. 25, N 12. – P. 2187–2193.
337. Gutiérrez A. Structural characterization of extracellular polysaccharides produced by fungi from the genus *Pleurotus* / A. Gutiérrez, A. Prieto, A. T. Martínez // Carbohydrate Res. – 1996. – V. 281. – P. 143–154.
338. Haggblom P. Blue light inhibits mycotoxin production and increases total lipids and pigmentation in *Alternaria alternate* / P. Haggblom, T. Unestam // Appl. Environ. Microbiol. – 1979. – V. 38, N 6. – P. 1074–1077.
339. Haldimann M. Occurrence of arsenic, lead, cadmium, mercury and selenium in cultivated mushrooms / M. Haldimann, C. Bajo, T. Haller [et al.] // Mitt. Geb. Lebensmittelunters. Hyg. – 1995. – V. 86. – P. 463–484.
340. Hammond J. B. W. Carbohydrate metabolism in *Agaricus bisporus*: changes in nonstructural carbohydrates during periodic fruiting (flushing) / J. B. W. Hammond, R. Nichols // New Phytol. – 1979. – V. 83 – P. 723–730.
341. Han Y. H. Physiology and ecology of *Lentinus edodes* (Berk.) / Y. H. Han, W. T. Yeng, L. C. Cheng, S. Chang // Sing. Mushr. Sci. – 1981. – V. 11. – P. 623–658.

342. Hansberg W. Hyperoxidant states cause microbial cell differentiation by cell isolation from dioxygen / W. Hansberg, J. Aguirre // J. Theor. Biol. – 1990. – V. 142, N 2. – P. 201—221.
343. Harold F.M. To shape a cell: an enquiry into the causes of morphogenesis of microorganisms / F.M. Harold // Microbiol. Rev. – 1990. – V. 54, N 4. – P. 384–431.
344. Harold F. M. Biochemical topology – from vectorial metabolism to morphogenesis / F. M. Harold // Bioscience Rep. – 1991. – V. 11, N 6. – P. 347–385.
345. Harold F.M. Ionic and electrical dimensions of hyphal growth / F. M. Harold // [eds. J. G. H. Wessels, F. Meinhardt] – The Mycota Growth, Differentiation, Sexuality, V. 1, – Berlin: Springer Verlag, 1994. – P. 89– 109.
346. Harold F. M. From morphogens to morphogenesis / F. M. Harold // Microbiology. – 1995. – V. 141, N 11. – P. 2765–2778.
347. Harper S. M. Structural basis of a phototropin light switch / S. M. Harper, L.C. Neil, K. H. Gardner // Science. – 2003. – V. 301. – P. 1541–1544.
348. Hashmi T. Effect of pulsing in low-level light therapy // T. Hashmi, Y. Y. Huang, S. K. Sharma [et al.] // Laser. Surg. Med. – 2010. – V. 42, N 6. – P. 450–466.
349. Hawker H. E. Pysiology of fungi / H. E. Hawker – London: Univ. press, 1950. – 360 p.
350. Heim R. Les Lactario- Russulés á anneau: Ontogénie et Phylogénie / R. Heim // Rev. De mycol. – 1937. – V. 2, N 1. – P. 4–17.
351. Heim R. Les Lactario- Russulés á anneau: Ontogénie et Phylogénie / R. Heim // Rev. De mycol. – 1937. – V. 2, N 2. – P. 61–75.
352. Hein J. Studies on morphogenesis in *Agaricus (Psaliota) campestris* / J. Hein // Am. J. Bot. – 1930. – V. 17, N 9. – P. 882–915.

353. Herrera-Estrella L. Light response in *Phycomyces blakesleeanus*: evidence for roles of chitin biosynthesis and breakdown / L. Herrera-Estrella, J. Ruiz-Herrera // Exp. Mycol. – 1983. – V.7, N 4. – P. 362–369.
354. Herrera-Estrella A. Looking through the eyes of fungi: molecular genetics of photoreception / A. Herrera-Estrella, B. A. Horwitz // Mol. Microbiol. – 2007. – V. 64, N 1. – P.5–15.
355. Hill E. P. Effect of light on growth and sporulation of *Aspergillus ornatus* / E. P. Hill // Ibid. – 1976. – V. 95, N 1. – P. 39–44.
356. Hobbs C. Medicinal mushrooms: modern clinical uses overview / C. Hobbs // Int. J. of Med. Mushr. – 2001.– V. 3, N 2–3. – P. 86.
357. Hode L. The importance of the coherency / L. Hode // Photomedicine Laser Surgery. – 2005. – V. 23, N 4. – P. 431–434.
358. Hölker U. Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi / U. Hölker, M. Höfer, J. Lenz // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2004. – V. 64. – P. 175–86.
359. Holliday J. On the trail of the yak. Ancient *Cordyceps* in the modern world [Электронный ресурс] / J. Holliday, M. Cleaver // 2014 – Режим доступа до журн.: http://www.alohamedicinals.com/Cordy_Article.pdf
360. Hsieh C. Effect of plant oil and surfactant on the production of mycelial biomass and polysaccharides in submerged culture of *Grifola frondosa* / C. Hsieh, H. L. Wang, C. C. Chen [et al.] // Biochem. Eng. J. – 2008. – V. 38. – P. 198–205.
361. Hsu Pei-Yu. Extract of Sporoderm-Broken Germinating Spores of *Ganoderma lucidum* Activates Human Polymorphonuclear Neutrophils via the P38 Mitogen-activated Protein Kinase Pathway / Pei-Yu Hsu, Jiun-Liang Chen, Hsing-Yu Chen, Sien-Hung Yang // Chang Gung Med. J. – 2012. – V. 35, N 2. – P. 140–148.
362. Huang B-H. The sterol composition of *Volvariella volvaceae* and other edible mushrooms / B-H. Huang, K-H. Yung, S-T. Chang // Mycologia. – 1985. – V. 7, N 6. – P. 959-963.

363. Hyde K. D. Fungi an unusual source for cosmetics / K.D. Hyde, A. H. Bahkali, M. A. Moslem // *Fungal Divers.* – 2010. – V. 43. – P. 1–9.
364. Janardhanan K. K. Use of vegetable wastes for the production of fungal protein from *Morchella* species / K. K. Janardhanan, T. N. Kaul, A. Husan // *J. Food Sci. Technol.* – 1970. – V. 35, N 7. – P. 197-199.
365. Idnurm, A. Light controls growth and development via a conserved pathway in the fungal kingdom / A. Idnurm, J. Heitman // *PLOS Biol.* – 2005. – N 3. – P. 95.
366. Idnurm A. The *Phycomyces* *madA* gene encodes a blue-light photoreceptor for phototropism and other light responses / A. Idnurm, J. Rodríguez-Romero, L. M. Corrochano [et al.] // *PNAS.* – 2006. – V. 103, N 12. – P. 4546-4551.
367. Iigusa H. Oxygen and hydrogen peroxide enhance light-induced carotenoid synthesis in *Neurospora crassa* / H. Iigusa, Y. Yoshida, K. Hasunuma // *FEBS Lett.* – 2005. – V. 579. – P. 4012–4016.
368. Ilmen M. Regulation of cellulase gene expression in the filamentous fungus *Trichoderma reesei* / M. Ilmen, A. Saloheimo, M. L. Onnela, M. E. Penttilä // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1997. – V. 63, N 4. – P. 1298–1306.
369. Ikekava T. Beneficial effects on edible and medicinal mushrooms on health care / T. Ikekava // *Inter. J. Med. Mushr.* – 2001. – V. 3, N 4. – P.291–398.
370. Innocenti F. D. Photoinduction of protoperithecia in *Neurospora crassa* by blue light / F. D. Innocenti, U. Pohl, V. E. Russo // *Photochem. Photobiol.* – 1983. – V. 37, N 1. – P. 49–51.
371. Ishikawa N. K. Antimicrobial cuparene-type sesquiterpenes, enokipodins C and D, from a mycelial culture of *Flammulina velutipes* / N. K. Ishikawa, Y. Fukushi, K. Yamaji [et al.] // *J. Nat. Prod.* – 2001. – V. 64, N. 7. – P. 932–934.
372. Isobe K. Production of catalase by fungi growing at low pH and high temperature / K. Isobe, N. Inoue, Y. Takamatsu [et al.] // *J. Biosci. Bioeng.* – 2006. – V. 101, N 1. – P. 73–76.

373. Jayakumar T. Protective effect of an extract of the oyster mushroom, *Pleurotus ostreatus*, on antioxidants of major organs of aged rats / T. Jayakumar, P. A. Thomas, P. Geraldine // Exp. Gerontol. – 2007. – V. 42, N 3. – P. 183–191.
374. Jayakumar T. An extract of the *Pleurotus ostreatus* mushroom bolsters the glutathione redox system in various organs of aged rats / T. Jayakumar, P. A. Thomas, E. Ramesh, P. Geraldine // J. Med. Food. – 2010. – V. 13, N 4. – P. 771–778.
375. Ji C. F. Review on anti-tumor polysaccharides in mushroom / C. F. Ji, L. Yue // Chem. Ind. Forest Prod. – 2014. – V. 34, N 1. – P. 128–134.
376. Jose N. Antioxidant, anti-inflammatory, and antitumor activities of culinary-medicinal mushroom *Pleurotus pulmonarius* (Fr.) Quel (Agaricomycetidae) / N. Jose, T. A. Ajith, K. K. Jananrdhanan // Int. J. Med. Mush. – 2002. – V. 4. – P. 329–335.
377. Kalac P. A review of trace element concentrations in edible mushrooms / P. Kalac, L. Svoboda // Food Chem. – 2000. – V. 69. – P. 273–281.
378. Kalmis E. Variations in the isolates obtained from basidiospores of commercial mushroom *Lentinula edodes* (Shiitake) / E. Kalmis, F. Kalyoncu // Int. J. of Sci. Technology. – 2006. – V. 1, N 2. – P. 99–103.
379. Kamada T. Regulation of fruiting body photomorphogenesis in *Coprinopsis cinerea* / T. Kamada, H. Sano, T. Nakazawa, K. Nakahori // Fungal Genet. Biol. – 2010. – V. 47, N 11. – P. 917–921.
380. Kamra A. Evaluation of antimicrobial and antioxidant activity of *Ganoderma lucidum* extracts against human pathogenic bacteria / A. Kamra, A. B. Bhatt // Int. J. Pharm. Pharmaceutic. Sci. – 2012. – V. 4, N 2. – P. 359–362.
381. Kanda S. Photoregulated tyrosinase gene in *Polyporus arcularius* / S. Kanda, T. Aimi, S. Masumoto [et al.] // Mycoscience. – 2007. – V. 48, N 1. – P. 34–41.

382. Kao C. H. J. Anti-cancer activities of *Ganoderma lucidum*: active ingredients and pathways / C. H. J. Kao, A. C. Jesuthasan, K. S. Bishop [et al.] // *Funct. Foods Health Disease*. – 2013. – V. 3, N 2. – P. 48–65.
383. Kapich A. N. Prooxidant activity in cultures of wood-decaying fungi / A. N. Kapich [et al.] // *9th International Conference on Biotechnology in the Pulp and Paper Industry*. – Durban: South Africa, 2004. – P. 33–34.
384. Karadeniz E. Isolation and germination of *ganoderma lucidum* basidiospores and effect of H₂O₂ on the germination of spores / E. Karadeniz, F. E. Sarigullu, I. Untac // *JFAE* – 2013. – V. 11, N 1. – P. 745–747.
385. Karkocha I. Badania nad wartością odżywczą niektórych grzybow krajowych [Studies on nutritive value of some polish mushrooms] / I. Karkocha, H. Młodecki // *Rocz. PZH* – 1965. – V. 16, N 1. – P. 71–76.
386. Karu T. I. Effect of the He-Ne laser radiation on the reproduction rate and protein synthesis of the yeasts / T. I. Karu, O. A. Tiphlova, G. E. Fedoseyeva // *Laser Chem.* – 1984. – V. 5, N 1. – P. 19–25.
387. Karu T. I. *Photobiology of low-power laser therapy* / T. I. Karu. – London, Paris, N. Y.: Harwood Acad. Publishers, 1989. – 187 p.
388. Karu T. I. Photobiology of low-power laser effects / T. I. Karu // *Health Phys.* – 1989. – N 2. – P. 691–704.
389. Karu T. I. Two different mechanisms of low intensity laser photobiological effect on *Escherichia coli* / T. I. Karu, O. A. Tiphlova, R. Esenaliev [et al.] // *J. Photochem. Photobiol. Biol.* – 1994. – V.24. – P. 155-161.
390. Karu T. I. The use of a chemiluminescence test to evaluate the sensitivity of blast cells inpatients with hemoblastosestj antitumor agents and low-intensity laser radiation / T. I. Karu, T. R. Ryabykh, T. A. Sidorova, Ya. V. Dobrynin // *Laser Life Sci.* – 1996. – N 7. – P. 1-11.
391. Karu T. In. *Biomedical photonics handbook* / T. Karu // [ed. Tuan Vo-Dinh]. – Boca Raton: CRC Press, 2003. – 48 p.

392. Karu T.I. Light coherence. Is this property important for photomedicine? [Электронный ресурс] / Т. I. Karu // – 2011. – Режим доступа до журн.: <http://www.photobiology.info/Coherence.html>
393. Kato N. The expression of sterigmatocystin and penicillin genes in *Aspergillus nidulans* is controlled by veA, a gene required for sexual development / N. Kato, W. Brooks, A. M. Calvo // Eukaryot. Cell. – 2003. – V. 2, N 6. – P. 1178–1186.
394. Kaur M. J. Effect of nutrient elements, vitamins and growth regulators on the vegetative growth of *Lentinus edodes* / M. J. Kaur, T. N. Lakhanpal // Mushr. Research. – 1995. – N 4. – P. 11–14.
395. Kikuchi K. Flavonoids induce germination of basidiospores of the ectomycorrhizal fungus *Suillus bovinus* / K. Kikuchi, N. Matsushita, K. Suzuki, T. Hogetsu / Mycorrhiza. – 2007. – V. 17, N 7. – P. 563–570.
396. Kim S. W. Mycelial growth and exo-biopolymer production by submerged culture of various edible mushrooms under different media / S. W. Kim, H. J. Hwang, J. P. Park [et al.] // Lett. Appl. Microbiol. – 2002. – V. 34. – P.56–61.
397. Kim H. O. A comparative study on the production of exopolysaccharides between two entomopathogenic fungi *Cordyceps militaris* and *Cordyceps sinensis* in submerged mycelial cultures / H. O. Kim, J. W. Yun // J. Appl. Microbiol. – 2005. – V. 99, N 4. – P. 728–738.
398. Kim G. Y. Water extract of *Cordyceps militaris* enhances maturation of murine bone marrow-derived dendritic cells in vitro / G. Y. Kim, W. S. Ko, J. Y. Lee [et al.] // Biol. Pharm. Bull. – 2006. – V. 29, N 2. – P. 354–360.
399. Kim S. S. Process development for mycelial growth and polysaccharide production in *Tricholoma matsutake* liquid culture / S. S. Kim, J. S. Lee, J. Y. Cho [et al.] // J. Biosci. Bioeng. – 2010. – V. 109. – P. 351–55.
400. Klein K. K. Kinetics of asymmetric mycelial growth and control by dikariosis and light in *Schizophyllum commune* / K. K. Klein, J. Landry, T. Friesen, T. Larimer // Mycologia. – 1997. – V. 89, N 6. – P. 916–923.

401. Klemm E. Nitrate reductase – a key enzyme in blue light-promoted conidiation and absorbance change of *Neurospora* / E. Klemm, H. Ninnemann // Photochem. Photobiol. – 1979. – V. 29, N 3. – P. 629–632.
402. Kohl F. G. Untersuchungen über das Carotin und seine physiologische Bedeutung in der Pflanze / F. G. Kohl – Leipzig: Borntraeger, 1902. – 11 p.
403. Komon-Zelazowska M. Formation of atroviridin by *Hypocrea atroviridis* is conidiation associated and positively regulated by blue light and the G protein GNA3 // M. Komon-Zelazowska, T. Neuhof, R. Dieckmann [et al.] // Eukaryot. Cell. – 2007. – V. 6, N 6. – P. 2332–2342.
404. Kozak M. Growing Shiitake Mushrooms in a Continental Climate / M. Kozak, J. Krawczyk // Field and Forest Production. – Wisconsin: Peshtiga, 1999.
405. Kreisel H. Methoden des mycologischen Laboratoriums / H. Kreisel, F. Shcauer – Stuttgart, N. Y.: Cristav Fischer Verlag, 1987. – 366 p.
406. Kritskiy M.S. Photoexcited molecules of flavin and pterin coenzymes in evolution / M.S. Kritskiy, T.A. Telegina, Y.L. Vechtomova [et al.] // Overview. Biochemistry. – 2010. – V. 75, N 10. – P. 1348-1366.
407. Kropp B. R. Inheritance of ability for ectomycorrhizal colonization of *Pinus strobus* by *Laccaria bicolor* / B. R. Kropp // Mycologia. – 1997. – V. 89, N 4. – P. 578–585.
408. Kubicek C. P. Facts and challenges in the understanding of the biosynthesis of peptaibols by *Trichoderma* / C. P. Kubicek, M. Komon-Zelazowska, E. Sandor, I. S. Druzhinina // Chem. Biodivers. – 2007. – V. 4, N 6. – P. 1068–1082.
409. Kües U. Life history and development processes in the basidiomycete *Coprinus cinereus* / U. Kües // Microbiol. Mol. Biol. Rev. – 2000. – V. 64. – P. 316–353.
410. Kühner R. Etudes sur le genre *Marasmius* / R. Kühner // Le Botaniste. – 1933. – V. 25, N 1. – P. 57–64.

411. Kühner R. Le developpment de *Lentinus tigrinus* / R. Kühner // Bull. C. R. Acad. Sci. – 1925. – V. 180, N 2. – P. 137.
412. Kulkarni R. K. Manitol metabolism in *Lentinus edodes*, the edible Shiitake mushroom / R. K. Kulkarni, L. C. Morrison // Annu. Mest. Atlanta, Ga, 1-6 march, 1987 y.: abstr. – Washington, D.C. – 1987. – P. 203.
413. Kumagai T. Blue and Near Ultraviolet Reversible Photoreaction in Conidial Development of Certain Fungi. Blue Light Syndrom / T. Kumagai – Berlin: Springer, 1980. – 260 p.
414. Kuno M. Identification by large-scale screening of phytochrome regulated genes in etiolated seedlings of *Arabidopsis thaliana* using a fluorescent differential display technique /M. Kuno, T. Muramatsu, F. Hamazato, F. Furuya // Plant Physiol. – 2000. – V. 122. – P. 15-24.
415. Lakkireddy G. Comparative studies on the influence of higher basidiomycetes polysaccharide fractions on reactive oxidizing species production. / G. Lakkireddy, T. Keshavarz, C. Bucke // J. Med. Mush. – 2006. – V. 8. – P. 135–148.
416. Lam S. K. Hypsin, a novel thermostable ribosome inactivating protein with antifungal and antiproliferating activities from fruiting bodies of the edible mushroom *Hypsizygus marmoreus* / S. K. Lam, T. B. Ng // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2001. – V. 285. – P. 1071–1075.
417. Laringuet P. Plant Photoreceptors: Phylogenetic Overview / P. Laringuet C. Dunand // J. Mol. Evol. – 2005. – V. 61, N 4. – P. 559–569.
418. Larkin-Thomas P. L. Circadian Rhythms in *Neurospora crassa*: Biochemistry and Genetics / P. L. Larkin-Thomas, G. G. Cote, S. Brody // Crit. Rev. Microbiol. – 1990. – V. 17, N 5. – P. 365–416.
419. Lasota W. Skład chemiczny grzybyw uprawowych. Cz. II. Boczniak ostrygowaty (*Pleurotus ostreatus* (Fr.: ex Jacquin)) i jego odmiana florydzka (P. Florida (Eger.)) / W. Lasota, J. Sylwestrzak // Bromatol. Chem. Toksykol. – 1982. – V. 15, N 1–2. – P. 1–10.

420. Lauter F. R. Photoregulation of *cot-1*, a Kinase-Encoding Gene Involved in Hyphal Growth in *Neurospora crassa* / F. R. Lauter, U. Marchfelder, V. E. A. Russo [et al.] // Fungal Genet. Biol. – 1998. – V. 23, N 3. – P. 300–310.
421. Lee B. C. Biological activities of the polysaccharides produced from submerged culture of the edible Basidiomycete *Grifola frondosa* / B. C. Lee, J. T. Bae, H. B. Pyo // Enzyme Microbial. Technology. – 2003. – V. 32, N 5. – P. 574–581.
422. Lee W. Y. Factors influencing the production of endopolysaccharide and exopolysaccharide from *Ganoderma applanatum* / W. Y. Lee, Y. Park, J. K. Ahn [et al.] // Enzyme Microbial. Technology. – 2007. – V. 40, N 2. – P. 249–254.
423. Lemieszek M. Anticancer properties of polysaccharides isolated from fungi of the Basidiomycetes class / M. Lemieszek, W. Rzesk // Wspolczesna Onkol. – 2012. – V. 16, N 4. – P. 285–289.
424. Lengeler K. B. Signal transduction cascades regulating fungal development and virulence / K. B. Lengeler, R. C. Davidson, C. D'Souza [et al.] // Microbiol. Mol. Biol. Rev. – 2000. – V. 64. – P. 746–785.
425. Leung P. H. Mycelium cultivation, chemical composition and antitumour activity of a *Tolypocladium* sp. Fungus isolated from wild *Cordyceps sinensis* / P. H. Leung, Q. X. Zhang, J. Y. Wu // J. Appl. Microbiology. – 2006. – V. 101. – P. 275–283.
426. Lim J. M. Enhanced production of exopolysaccharides by supplementation of toluene in submerged culture of an edible mushroom *Collybia maculata* TG-1 / J. M. Lim, J. W. Yun // Proc. Biochem. – 2006. – V. 41. – P. 1620–1626.
427. Lindequist U. The pharmacological potential of mushrooms / U. Lindequist, T. H. J. Niedermeyer, W. D. Julich // Evidence-based Compl. Alt. Medicine. – 2008. – V. 2, N 3. – P. 285–299.

428. Linder H. White collar-2, a partner in blue-light signal transduction, controlling expression of light-regulated genes in *Neurospora crassa* / H. Linder, G. Machino // EMBO J. – 1997. – V. 16, N 1. – P. 98–109.
429. Liu Y. Photoreception in *Neurospora*: A tale of two White Collar proteins / Y. Liu, Q. He, P. Cheng // Cell. Mol. Life Sci. – 2003. – V. 60. – P. 2131–2138.
430. Liua X. Antitumor activity of the sporoderm-broken germinating spores of *Ganoderma lucidum* / X. Liua, J-P. Yuana, X-J. Chen // Cancer Lett. – 2002. – V. 182. – P. 155–161.
431. Litchfield J. H. Factors affecting the growth of *Morchella* mushroom mycelim in submerged culture / J.H. Litchfield, R.C. Overbeck, A. Davidson // J. Agricult. Food Chem. – 1963. – V. 11, N 2. – P. 158–162.
432. Lorenzen K. Basidiomycetes as a source for new bioactive natural products / K. Lorenzen, T. Anke // Current Org. Chem. – 1998. – V. 2. – P. 329–364.
433. Losel D. M. Microbial lipids / D. M. Losel // [eds. C. Ratledge, S. G. Wilkinson] – London: Academic Press., 1988. – V. 1. – 699 p.
434. Lu B. C. The role of light in the fructification on the basidiomycete *Cyathus stercoreus* / B. C. Lu // Am. J. Bot. – 1965. – V. 52, N 5. – P. 432–437.
435. Lukens R.J. Photo-inhibition of sporulation in *Alternaria solani* / R.J. Lukens // Am. J. Bot. – 1963. – V. 50, N 7. – P. 721–724.
436. Lung M. Y. Antioxidant property and production of exopolysaccharide from *Armillaria mellea* in submerged cultures: effect of culture aeration rate / M. Y. Lung, C. W. Hsieh // Eng. Life Sci. – 2011. – V. 11. – P. 482–490.
437. Luo J. Optimization of medium composition for the production of exopolysaccharides from *Phellinus baumii* Pil6t in submerged culture and the immuno-stimulating activity of exopolysaccharides / J. Luo, J. Liu, C. Ke [et al.] // Carbohyd. Polymers. – 2009. – V. 78, N 3. – P. 409–415.
438. Luo X. C. Biology of artificial log cultivation of *Auricularia* mushroom / X. C. Luo, S. T. Chang, J. A. Buswell, // [ed. Siu-wai Chiu] – Mushroom

- Biology and Mushroom Cultivation. – Hong Kong: Chinese University Press, 1993. – 370 p.
439. Ma L. J. Detection and characterisation of ancient fungi entrapped in glacial ice / L. J. Ma, S. O. Rogers, C. M. Catranis // *Mycologia*. – 2000. – V. 92. – P. 286–295.
 440. Macko V. Regulation of uredospore germination and germ tube development / V. Macko, R. C. Staples // *Bull. Torrey Bot. Club*. – 1973. – V. 100. – P. 223–229.
 441. Madelin M. F. The influence of light and temperature on fruiting of *Coprinus lagopus* in pure culture / M. F. Madelin // *Ann. Bot. (G.B.)*. – 1956. – V. 20, N 79. – P. 833–834.
 442. Madunagu B. E. Collection and studies on the cultivation of *Pleurotus squarrosulus* (Mont) Sing. 277 / B. E. Madunagu // *Nigerian J. Sci.* – 1988. – V. 22. – P. 51–55.
 443. Malinowska E. Biosynthesis of selenium-containing polysaccharides with antioxidant activity in liquid culture of *Herichium erinaceum* / E. Malinowska, W. Krzyczkowski, F. Herold [et al.] // *Enzyme Microb. Technol.* – 2009. – V. 44. – P. 334–343.
 444. Manachere G. Research on the fruiting rhythm of a basidiomycete mushroom *Coprinus congregatus* Bull. Ex Fr. / G. Manachere // *Interdisc. Cycle Res.* – 1971. – V. 2, N 2. – P. 199–209.
 445. Manachere G. Conditions essential for controlled fruiting of Macromycetes – a review / G. Manachere, Y. Bastoull-Descollonges // *Trans. Brit. Mycol. Soc.* – 1980. – V. 75, N 2. – P. 255–270.
 446. Manjunathan J. Studies on the growth requirements of *Lentinus tuberregium* (Fr.), An edible mushroom / J. Manjunathan, V. Kaviyarasan // *Middle-East J. Sci. Res.* – 2010. – V. 5, N 2. – P. 81–85.
 447. Manzi P. Mushrooms as a source of functional ingredients / P. Manzi, A. Aguzzi, V. Vivanti [et al.] // *Euro Food Chem. Functional foods. A new*

- challenge for the food chemist: 10 European Conference: materials con. – Budapest, 1999. – V. 1. – P. 89–93.
448. Manzi P. Beta-glucans in edible mushrooms / P. Manzi, L. Pizzoferrato // Food Chem. – 2000. – V. 68, N 3. – P. 315–318.
449. Manzi P. Nutritional value of mushrooms widely consumed in Italy / P. Manzi, A. Aguzzi, L. Pizzoferrato // Food Chem. – 2001. – V. 73, N 3. – P. 321–325.
450. Mao X. W. Immunotherapy with low-dose interleukin-2 and a polysaccharopeptide derived from *Coriolus versicolor* / X. W. Mao, J. O. Archambeau, D. S. Gridley // Cancer Biother Radiopharm. – 1996. – V. 11, N 6. – P. 393–403.
451. Markley K.S. Fatty Acids: Their Chemistry, Properties, Production, and Uses / K.S. Markley edited, (2nd Edition), Part 2. - Interscience Publishers, New York-London, 1961. - 782 pp.
452. Marshall E. Make money by growing mushrooms / E. Marshall, N. G. Nair // Infrastructure and Agro-Industries Division, Food and Agriculture Organization of the United Nations – Italy, 2009. – 62 p.
453. Masuno K. Development of technical utilization of LED in *Pholiota nameko* cultivation / K. Masuno – Tech. Rep. Nagano: Pref. Forest. Res., 2010. – 137 p.
454. Matsuzawa T. Studies on antioxidant effect of *Hypsizygus marmoreus*. I. Effects of *Hypsizygus marmoreus* for antioxidant activities of mice plasma / T. Matsuzawa, M. Sano, I. Tomita [et al.] // Yakugaku-zasshi. – 1997. – V. 117, N 9. – P. 623–628.
455. Matsuzawa T. Studies on antioxidant effect of *Hypsizygus marmoreus*. II. Effects of *Hypsizygus marmoreus* for antioxidant activities of tumor-bearing mice / T. Matsuzawa, M. Sano, I. Tomita // Yakugaku-zasshi. – 1998. – V. 118, N 10. – P. 476–481.

456. Mattar J. Electro-stimulation of *S. cerevisiae* wine yeasts by pulsed electric field and its effects on fermentation capacity / J. Mattar, M. Turk, M. Nonus [et al.] // J. Biol. Phys. – 2013. – V. 3. – P. 1–12.
457. Mattila P. H. Vitamin D contents in edible mushrooms / P. H. Mattila, V. I. Piironen, E. J. Uusi-Rauva, P. E. Koivistoinen // J. Agric. Food Chem. – 1994. – V. 42, N 11. – P. 2449–2453.
458. Mattila P. Functional properties of edible mushrooms / P. Mattila, K. Suonpdd, V. Piironen // Nutr. – 2000. – V. 16, N 7–8. – P. 694–696.
459. Mattila P. Contents of vitamins, mineral elements, and some phenolic compounds in cultivated mushrooms / P. Mattila, K. Könkö, M. Eurola [et al.] // J. Agric. Food Chem. – 2001. – V. 49, N 5. – P. 2343–2348.
460. Mau J. L. Antioxidant properties of methanolic extracts from *Grifola frondosa*, *Morchella esculenta* and *Termitomyces albuminosus* mycelia / J. L. Mau, C. N. Chang, S. J. Huang // Food Chem. – 2004. – V. 87. – P. 111–118.
461. McCracken F.I. Some factors affecting basidiospore germination of *Pleurotus sapidus* / I.F. McCracken // Can. J. of Botany. – 1982. – V. 60, N 9. – P. 1658–1661.
462. Meissner G. Carotenes and retinal in *Phycomyces* mutants / G. Meissner, M. Delbruck // Plant Physiol. – 1968. – V. 43, N 8. – P. 1279–1283.
463. Merja S. Effect of growth temperature on lipid fatty-acids of 4 fungi (*Aspergillus niger*, *Neurospora crassa*, *Penicillium chrysogenum* and *Trichoderma reesei*) / S. Merja // Arch. Mikrobiol. – 1995. – V. 164, N 3. – P. 212–216.
464. Miles P. Mushroom biology / P. Miles, S. T. Chang. – Singapore, Concise basics and current developments. – New Jersey, London, Hong Kong.: World Scientific, 1997. – 194 p.
465. Min B. S. Triterpenes from the spores of *Ganoderma lucidum* and their inhibitory activity against HIV-1 protease / B. S. Min, N. Nakamura,

- H. Miyashiro [et al.] // Chem. Pharm. Bull. – 1998. – V. 46, N 10. – P. 1607–1612.
466. Miyake T. Light effects on cell development and secondary metabolism in *Monascus* / T. Miyake, A. Mori, T. Kii [et al.] // J. Ind. Microbiol. Biotechnol. – 2005. – V. 32, N 3. – P. 103–108.
467. Miyazaki Y. Light-stimulative effects on the cultivation of edible mushrooms by using blue led / Y. Miyazaki, K. Masuno, M. Abe [et al.] // 7th International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products (ICMBMP7), 4–7 oct. 2011 y.: proceedings. – Arcachon, 2011. – P. 58–67.
468. Mizuno T. Food function and medicinal effect of mushroom fungi / T. Mizuno // Foods Food Ingredients J. of Jpn. - 1993. – N 158. – P. 55-70.
469. Mizuno T. A development antitumor polysaccharides from mushroom fungi / T. Mizuno // Foods Food Ingredients J. of Jpn. – 1996. – V. 167. – P. 69–85.
470. Mizuno T. The exctraction and development of antitumor-active polysaccharides from medical mushrooms in Japan (Review) / T. Mizuno // Int. J. Med. Mushr. – 1999. – V. 1, N 1. – P. 9–29.
471. Moor D. Morphogenesis of carpophore of *Coprinus cinereus* / D. Moor, M. M. Y. Elhiti, R. D. Butler // New Phytol. – 1979. – V. 83, N 3. – P. 695–722.
472. Moor D. Fungal morphogenesis / D. Moor – Cambridge University Press, 2002. – 469p.
473. Moore D. Fruit bodies: their production and development in relation to environment / D. Moore, A. C. Gange, E. G. Gange, L. Boddy // [eds. L. Boddy, J. C. Frankland, P. van West] – Ecology of Saprotrophic Basidiomycetes. – Amsterdam. – 2008. – P. 79–103.
474. Moore D., Meškauskas, A. Where are the sequences that control multicellular development in filamentous fungi? / D. Moore, A. Meškauskas

- // [eds. Y. Gherbawy, R. L. Mach, M. Rai] – Current Advances in Molecular Mycology. – N. Y.: Nova Science Publishers. – 2009. – P. 1–37.
475. Moore D. 21st Century Guidebook to Fungi / D. Moore, G. D. Robson, A. P. J. Trinci – Cambridge, UK: Cambridge University Press, 2011. – 236 p.
 476. Morimoto N. Effects of light on fruitbody formation in basidiomycete, *Coprinus macrorhizus* / N. Morimoto, Y. Oda // Plant Cell Physiol. – 1973. – V. 14, N 2. – P. 217–225.
 477. Morita Y. Purification, crystallization, and characterization of peroxidase from *Coprinus cinereus* / Y. Morita, H. Yamashita B. Mikami // J. Biochem. – 1988. – V. 103, N 4. – P. 693–699.
 478. Moss E. H. Developmental studies in the genus *Collibia* / E. H. Moss // Trans. R. Can. Inst. – 1923. – V. 14, N 2. – P. 321–332.
 479. Mulligen M. E. Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* / M. E. Mulligen, K. A. Murry-Leisure, B. S. Ribner // Am. J. Med. – 1993. – V. 94. – P. 313–328.
 480. Myoung-Jun J. Effect of LED light on primordium formation, morphological properties, ergosterol content and antioxidant activity of fruit body in *Pleurotus eryngii* / J. Myoung-Jun, L. Yun-hae, J. Young-Cheol // Korean J. Mycology. – 2011. – V. 39, N 8. – P. 175–179.
 481. Myoung-Jun J. Effect of color of led (light emitting diode) on development of fruit body in *Hypsizygus marmoreus* / J. Myoung-Jun, L. Yun-hae, J. Young-Cheol // 7th International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products (ICMBMP7), 4–7 oct. 2011 y.: proceedings. – Arcachon, 2011. – P. 8–71.
 482. Myung K. FvVE1 regulates biosynthesis of the mycotoxins fumonisins and fusarins in *Fusarium verticillioides* / K. Myung, S. Li, R. A. Butchko [et al.] // J. Agric. Food Chem. – 2009. – V. 57, N 11. – P. 5089–5094.
 483. Nagaraj K. Phytochemical analysis and in vitro antimicrobial potential of *Ganoderma applanatum* (Pers.) / K. Nagaraj, N. Mallikarjun, R. Naika [et

- al.] // Pat. Shivamogga District-Karnataka, India. Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res. – 2013. – V. 23, N 2. – P. 36–41
484. Namba K. Effects of LED lights on fruiting-body production in *Hypsizygus marmoreus* / K.Namba, S. Lnatomi, K. Mori [et al.] // Jpn. Soc. Mush. Sci. Biotechnol. – 2002. – V. 10, N 3. – P. 141–146.
485. Nasr N. The Effect of differ ent Growth Regulator sand Media on the Mycelium Growth of two Mushroom Species: *Agaricus bisporus* and *Pleurotus florida* / N. Nasr, F. Mahdipour // IJACS. – 2013. – V. 6, N 8. – P. 478–484.
486. Neff M. M. Light: an indicator of time and place /M.M. Neff, C. Fankhauser, J. Chory // Genes and Dev. – 2000. – V.14. – P. 257–271.
487. 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 // International Conference on Laser Applications in Life Sciences, 11-14 June 2007 y.: abst. - Moscow, Russia, 2007. - P. 38
488. Nemčovič M. Cell-wall composition and polysaccharide synthase activity changes following photoinduction in *Trichoderma viride* / M. Nemčovič, V. Farkaš // Acta Biol. Hung. – 2001. – V. 52, N 2–3. – P. 281–288.
489. Ng T.B. Pharmacological actions of *Cordyceps*, a prized folk medicine / T. B. Ng, H. X. Wang // J. Pharm. Pharmacol. – 2005. – V. 57, N 12. – P. 1509–1519.
490. Ng T.B. Fungal proteins with antiproliferative and anticancer activities / T. B. Ng, J. H. Wong // Protein Pept. Lett. – 2013. – V. 20, N 4. – P. 433–438.
491. Nour el Dein M. S. Biosynthesis of fat in submerged culture of *Polyporus sulphureus* / M. S. Nour el Dein, N. M. Abdallah // Z. Allgem Mikrobiol. – 1967. – V. 7, N 1. – P. 29–32.
492. Ohga S. Utilization of pulsed power to stimulate fructification of edible mushroom / S. Ohga, N. S. Cho, T. Li [et al.] // Mushroom Sci. – 2004. – V. 16. – P. 343–352.

493. Ohshiro T. Low Level Laser Therapy: A Practical Introduction / T. Ohshiro, R.G. Calderhead // [ed. John Willy and Sons] – Chichester-New York, 1988. – 156 p.
494. Olishevskaya S. V. Influence of copper ions on the fatty acid profiles of soil filamentous fungi / S. V. Olishevskaya, Yu. V. Karpenko, N. M. Zhdanova, A. M. Ostapchuk // Мікробіол. журн. – 2008. – Т. 70, № 6. – С. 60–67.
495. Ooi V. E. Review of Pharmacological Activities Of Mushroom Polysaccharides / V. E. Ooi, F. A. Liu // Int. J. Med. Mushr. – 1999. – V. 1, N 2. – P. 196–206.
496. Ooi V. E. C. Immunomodulation and anti-cancer activity of polysaccharide-protein complexes / V. E. C. Ooi, F. Liu // Curr. Med. Chem. – 2000. – V. 7, N 7. – P. 715–729.
497. Oyetayo V. O. Antimicrobial and Antioxidant Properties of *Pleurotus ostreatus* (Jacq: Fries) Cultivated on Different Tropical Woody Substrates / V. O. Oyetayo, O. O. Ariyo // JWCBB. – 2013. – V. 1, N 2. – P. 28–32.
498. Özcan M. M. Effect of some plant oils on mycelial growth of *Agaricus bisporus* (Lange) Sing / M. M. Özcan, K. Giyasettin, G. Öztürk // Pakistan J. of Botany. – 2013. – V. 45, N 3. – P. 1091–1097.
499. Paietta J. Isolation and characterization of light-insensitive mutants of *Neurospora crassa* / J. Paietta, M. L. Sargent // Genetics – 1983. – V. 104, N 1. – P. 11–21.
500. Pandey A. New developments in solid-state fermentation / A. Pandey, C. R. Soccol, D. Mitchell // I. Processes Products. Process. Biochem. – 2000. – V. 35. – P. 1153–1169.
501. Park C. Growth inhibition of U937 leukemia cells by aqueous extract of *Cordyceps militaris* through induction of apoptosis / C. Park, S. H. Hong, J. Y. Lee [et al.] // Oncol. Rep. – 2005. – V. 13, N 6. – P. 1211–1216.
502. Park J. P. Stimulatory effect of plant oils and fatty acids on the exobiopolymer production in *Cordyceps militaris* / J. P. Park, S. W. Kim,

- H. J. Hwang [et al.] // *Enzym Microb. Technol.* – 2002. – V. 31. – P. 250–255.
503. Pastore D. Stimulation of ATP synthesis via oxidative phosphorylation in wheat mitochondria irradiated with helium-neon laser / D. Pastore, C. Di Martino, G. Bosco, S. Passarella // *Biochem. Mol. Biol. Int.* – 1996. – V. 39, N 1. – P. 149–157.
504. Patel S. Recent developments in mushrooms as anti-cancer therapeutics: a review / S. Patel, A. Goyal // *3 Biotech.* – 2012. – V. 2. – P. 1–15.
505. Perkins J. H. Morphogenesis in *Schizophillum commune*. 1. Effects of white light / J. H. Perkins // *Plant Physiol.* – 1969. – V. 44, N 12. – P.1706-1711.
506. Peterson B. N. Contributions of mating studies to mushroom systematics / B. N. Peterson // *Canad. J. Bot.* – 1995. – V. 73. – P. 831–842.
507. Petrova R. D. Fungal metabolites modulating NF-kB activity: an approach to cancer therapy and chemoprevention (review) / R. D. Petrova, A. Z. Reznick, S. P. Wasser [et al.] // *Oncol. Rep.* – 2008. – V. 19. – P. 299–308.
508. Pizzoferrato L. Solid-state ¹³C CP MAS NMR spectroscopy of mushrooms gives directly the ratio between proteins and polysaccharides / L. Pizzoferrato, P. Manzi, F. Bertocchi [et al.] // *J. Agric. Food. Chem.* – 2000. – V. 48, N 11. – P. 5484–5488.
509. Pokorny R. Developmental changes in *Trichoderma viride* enzymes abundant in conidia and the light-induced conidiation signalling pathway / R. Pokorny, P. Vargovic, U. Holker [et al.] // *J. Basic. Microbiol.* – 2005. – V. 45, N 3. – P. 219–229.
510. Porras-Arboleda S. M. Mycelial submerged culture of new medicinal mushroom, *Humphreya coffeata* (Berk.) Stey. (Aphyllphoromycetideae) for the production of valuable bioactive metabolites with cytotoxicity, genotoxicity, and antioxidant activity / S. M. Porras-Arboleda, N. A. Valdez-Cruz, B. Rojano [et al.] // *Int. J. Med. Mushr.* – 2009. – V. 11. – P. 335–350.

511. Potemkina J. V. Spectral properties of LEDs based light source for application in mushroom cultivation / J. V. Potemkina, N. L. Poyedinok // IV Международная конференция «Функциональная база нанoeлектроники», 30 сентября – 3 октября 2011: сб. науч. тр. – Харьков-Кацивели, Украина, 2011. С. 113.
512. Poyedinok N.L. Stimulation with low-intensity laser light of basidiospore germination and growth of monocaryotic isolates in Medicinal Mushroom *Hericium erinaecus* (Bull.: Fr.) Pers.(Aphyllorphomycetidae) / N. L. Poyedinok, J. V. Potemkina, A. S. Buchalo [et al.] // Int. J. Med. Mushr. – 2000. – V. 2, N 4. – P. 339–342.
513. Poyedinok N. L. Influence of low-intensity laser radiation on the growth and development of *Hericiuum 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.
514. 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 // International Congress of Mycology, 27th July -1st August 2002 y.: abst. - Paris, 2002. - P.373.
515. 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. / A.S. Buchalo, A.M. Negriyko, J.V. Potemkina [et al.] // Int. J. Med. Mushr. – 2003. - V.5. - P. 293–299.
516. 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 // XVI International School Seminar “Spectroscopy of molecules and crystals”, 25 May - 01 June 2003 y.: abst. – Beregove, Crimea, Ukraine, 2003. – P. 307.
517. Poyedinok N.L. Prospects for application of low intensity laser light in cultivation of edible mushrooms / N. L. Poyedinok, A. Negrijko, J.

- Potemkina // XIV Congress of European Mycologists, 22-27 September 2003 y.: abst. – Katsiveli, Yalta, Crimea, Ukraine, 2003. - P.109-110.
518. Poyedinok N. L. The effect of low-intensity laser radiation on antibiotic activity of *Pleurotus ostreatus* (Jacq.: fr) Kumm. in submerged culture / N. L. Poyedinok, O. V. Efremenkova, A. S. Buchalo [et al.] // Fifth International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products, 8-12 april. 2005 y.: abst. – China, 2005. – P. 141–142.
519. 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.
520. 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.
521. Poyedinok N. L. Light regulation of growth and biosynthetic activity of ling zhi or reishi medicinal mushroom, *Ganoderma lucidum* (W. Curt: Fr.) P. Karst. (Aphyllorphomycetideae), 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.
522. 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 [et al.] // The 5 International medicinal mushroom conference, 5–8 sept. 2009 y.: abstr. – China Nantong. – 2009. – P. 261.
523. 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.
524. Poyedinok N. L. Induction of antimicrobial activity of some macromycetes by low-intensity light / N. L. Poyedinok, O. B. Mykchaylova, A. M. Negriyko [et al.] // Biotechnologia Acta – 2015. - V. 8, N 1. – P. 63-70.

525. 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 [et al.] // Appl. Biochem. Biotechnol. – 2015. – V. 176, N 2. – P. 333-343.
526. Prasad P. *Morchella esculenta* (Guchhi): need for scientific intervention for its cultivation in Central Himalaya / P. Prasad, K. Chauhan, L. Kandari // Curr. Sci. – 2002. – V. 82, N 9–10. – P. 1098-1100.
527. Prokhorenko V. I. Coherent Control of Retinal Isomerization in Bacteriorhodopsin / V. I. Prokhorenko, A. M. Nagy, S. A. Waschuk // Science. – 2006. – V. 313, N 5791. – P. 1257–1261.
528. Puchkova T. A. Physiology and properties of *Lentinus edodes* (Berk.) Sing in submerged culture / T. A. Puchkova, V. G. Babitskaya, Z. A. Rozkova // Int. J. Med. Mushr. – 2001. – V. 3, N 2–3. – P. 206.
529. 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 [et al.] // Int. J. Med. Mushr. – 2010. – V. 12, N 4. – P. 419–425.
530. Przybylowicz P. Nutritional and health aspects of shiitake / P. Przybylowicz, J. Dubuque // In Shiitake Growers Handbook, Kendall: Hunt Publishing Co: Donoghue IA, 1988. – P. 183–188.
531. Przbylowicz P. Shiitake growing handbook: The art and science of mushroom cultivation / P. Przbylowicz, J. Donoghue – Iowa: Kendal Hunt, Dubuque, 1989. - 232 p.
532. Purschwitz J. Seeing the rainbow: light sensing in fungi / J. Purschwitz, S. Muller, C. Kastner, R. Fischer // Curr. Opin. Microbiol. – 2006. – V. 9, N 6. – P. 566–571.
533. Purschwitz J. Mapping the interaction sites of *Aspergillus nidulans* phytochrome FphA with the global regulator VeA and the White Collar protein LreB / J. Purschwitz, S. Muller, R. Fischer // Mol. Genet. Genomics. – 2009. – V. 281, N 1. – P. 35–42

534. Quereshi, S., Pandey A. K., Sandhu S.S. Evaluation of antibacterial activity of different *Ganoderma lucidum* extracts / S. Quereshi, A. K. Pandey, S. S. Sandhu // People's J. Sci. Res. – 2010. – V. 3, N 1. – P. 10–13.
535. Raich P. C. Selenium in cancer prevention: clinical issues and implications / P. C. Raich, J. Lu, H. J. Thompson, G. F. J. Combs // Cancer Invest. – 2001. – V. 19. – P. 540–553.
536. Ramesh Ch. Antimicrobial properties, antioxidant activity and bioactive compounds from six wild edible mushrooms of western ghats of Karnataka, India / C. Ramesh, M. G. Pattar // Pharmacognosy Res. – 2010. – V. 2, N 2. – P. 107–112.
537. Ramkumar L. Antioxidant and radical scavenging activity of nine edible mushrooms extract / L. Ramkumar, T. Ramanathan, P. Thirunavukkarasu, N. Arivuselvan // Int. J. Pharmacol. – 2010. – V. 6. – P. 950–953.
538. Ranadive K. R. Glimpses of antimicrobial activity of fungi from World / K. R. Ranadive, M. H. Belsare, S. S. Deokule [et al.] // J. New Biolog. Reports. – 2013. – V. 2, N 2. – P. 142–162.
539. Rattray J. B. Microbial lipids / J. B. Rattray // [eds. C. Ratledge, S. G. Wilkinson]. – London: Academic Press. – 1988. – V. 1. – 555 p.
540. Rau U. Enhanced glucan formation of filamentous fungi by effective mixing. / U. Rau, E. Gura, E. Olszewski, F. Wangner // Ind. Microbiol. – 1992. – V. 9. – P. 12–26.
541. Reijnders A.F.M. Les problèmes du développement des carpophores des Agaricales et de quelques groupes voisins / A. F. M. Reijnders – Haag: Junk, 1963. – 412 p.
542. Ren L. Antitumor activity of mushroom polysaccharides: a review / L. Ren, C. Perera Y. Hemar // Food Funct. – 2012. – N 11. – P. 1118–1130.
543. Reshetnikov S. V. Higher *Basidiomycetes* as a source of antitumour and immunostimulating polysaccharides (Review) / S. V. Reshetnikov, S. P. Wasser, K. R. Tan // Int. J. of Med. Mushr. – 2001. – V. 3, N 4. – P. 361–394.

544. Ricci M. Nitrogen and carbon starvation regulate conidia and protoperithecia formation of *Neurospora crassa* grown on solid media / M. Ricci, D. Krappmann, V. E. A. Russo // Fungal. Genet. Newsl. – 1991. – V. 38, N 1. – P. 87–88.
545. Robbins W. J. Light and the development of *Poria ambigua* / W. J. Robbins, A. Hervey // Mycologia. – 1960. – V.52, N 2. – P. 231–247.
546. Robinson C. H. Cold adaptation in Arctic and Antarctic fungi / C. H. Robinson // New Phytol. – 2001. – V. 151. – P. 341–353.
547. Rodriguez-Aparicio L. B. Lightinduced effects of several enzymes of carbohydrate metabolism in *Phycomyces blakesleeanus* / L. B. Rodriguez-Aparicio, J. Rua, D. De Arriaga, J. Soler // Int. J. Biochem. – 1987. – V. 19, N 12. – P. 1211–1215.
548. Rodriguez-Romero J. The gene for the heat-shock protein HSP100 is induced by blue light and heat-shock in the fungus *Phycomyces blakesleeanus* / J. Rodriguez-Romero, L. M. Corrochano // Curr. Genet. – 2004. – V. 46, N 5. – P. 295–303.
549. Rotzoll N. Activity-guided identification of (S)-molic acid 1-0-D glucopyranoside (morelid) and gamma-aminobutyric acid as contributors to umami taste and mouth-drying oral sensation of morel mushrooms / N. Rotzoll, A. Dunkel, T. Hofmann // J. Agricult. Food Chem. – 2005. – V. 53, N10. – P. 4149–4156.
550. Royse, D. J. Shiitake mushrooms – consumption, production and cultivation / D. J. Royse, K. C. Schizler, D. A. Dichle // Interdisciplinary Sci. Review. – 1985. – N 10. – P. 329–340.
551. Rua J. Effect of light on several metabolites of carbohydrate metabolism in *Phycomyces blakesleeanus* / J. Rua, L. B. Rodriguez-Aparicio, F. Busto, J. Soler // J. Bacteriol. – 1987. – V. 169, N 2. – P. 904–907.
552. Rubinov A. N. Nonresonance mechanisms of biological effects of coherent and incoherent light / A. N. Rubinov, A. A. Afanas'ev // Optics Spectroscopy. – 2005. – V. 98, N 6. – P. 943–948.

553. Ruis H. Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defence / H. Ruis, F. Koller // Cold Spring Harbor. – N. Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1997. – P. 309–342.
554. Ryter S. W. Singlet Molecular Oxygen ($^1\text{O}_2$): A Possible effector of eukaryotic gene expression / S. W. Ryter, R. M. Tyrrell // Free Rad. Biol. Med. – 1998. – V. 24, N 9. – P. 1520–1534.
555. Saar M. Fungi in Khanty folk medicine / M. Saar // J. Ethnopharmacology. – 1991. – V. 31, N 2. – P. 175–179.
556. Scandalios J. G. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses / J. G. Scandalios // Brazilian J. Med. Biol. Res. – 2005. – V. 38. – P. 995–1014.
557. Schrott E. L. Fluence response relationship of carotenogenesis in *Neurospora crassa* / E. L. Schrott // Planta. – 1980. – V. 150, N 2. – P. 174–179.
558. Schuster A. Impact of light on *Hypocrea jecorina* and the multiple cellular roles of ENVOY in this process / A. Schuster, C. P. Kubicek, M. A. Friedl [et al.] // BMC Genomics. – 2007. – V. 8. – P. 449.
559. Schwerdtfeger C. Blue light adaptation and desensitization of light signal transduction in *Neurospora crassa* / C. Schwerdtfeger, H. Linden // Mol. Microbiol. – 2001. – V. 39, N 4. – P. 1080–1087.
560. Schwerdtfeger C. VIVID is a flavoprotein and serves as a fungal blue light photoreceptor for photoadaptation / C. Schwerdtfeger, H. Linden // EMBO J. – 2003. – V. 22, N 18. – P. 4846–4855.
561. Selvi S. Comparison of Non-Enzymic Antioxidant Status of fresh and Dried Form of *Pleurotus florida* and *Calocybe indica* / S. Selvi, P. Uma Devi, S. Suja [et al.] // Pac. J. Nutr. – 2007. – V. 6, N 5. – P. 468–471.
562. Semerdžieva M. Lecive houby drive a nyňi / M. Semerdžieva, J. Veselsky – Praha: Academia, 1986. – 180 p.

563. Shah H. Nutritional composition and protein quality of *Pleurotus* mushroom / H. Shah, A. Iqtidar, J. Shagufta // Sarhad J. Agric. – 1997. – V. 13, N 6. – P. 621-626.
564. Shi Y. Mushroom biology and mushroom products / Y. Shi, A. E. James, I. F. F. Benzie, J. A. Buswell. – Mexico, 2002. – 380 p.
565. Sladky Z. Stimulation of the formation of fruiting bodies of the fungus *Lentinus tigrinus* (Bull.) Fr. by growth regulators / Z. Sladky, V. Tichy // Biologia Plantarum (Prague). – 1974. – V. 16, N 6. – P. 436–443.
566. 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 [et al.] // Int. J. Med. Mushrooms, 2009. – V. 11, N1. – P. 69-76.
567. Smoleński T. Bardzo dobre wyniki w eksporcie pieczarek w 2003 roku – ostatnim poza Unią Europejską [Very good results in mushrooms export in 2003 – last year outside European Union] / T. Smoleński // Biul. Pieczarki. – 2004. – V. 3 – P. 51–57.
568. Soccol C. R. Overview of applied solid-state fermentation in Brazil / C. R. Soccol, L. P. S. Vandenberghe // Biochem Engin J. – 2003. – V. 13. – P. 205–218.
569. Soderhall K. Light inhibits the production of alternariol and alternariol monomethyl ether in *Alternaria alternate* / K. Soderhall, E. Svensson, T. Unestam // Ibid. – 1978. – V. 36, N 5. – P. 655–657.
570. Solano, F. Hypopigmenting agents: An updated review on biological, chemical and clinical aspects / F. Solano, S. Briganti, M. Picardo, G. Ghanem // Pigment Cell Research. – 2006. – V. 19, N 6. – P. 550–571.
571. Sommer T. Role of nitrogen in the photoinduction of protoperithecia and carotenoids in *Neurospora crassa* /T. Sommer, F. Degli-Innocenti, V. E. A. Russo // Planta. – 1987. – V. 170, N 2. – P. 205–208.

572. Song F. Q. Progress on understanding the anticancer mechanisms of medicinal mushroom: *Inonotus obliquus* / F. Q. Song, Y. Liu, X. S. Kong [et al.] // Asian. Pacific. J. Cancer Prev. – 2013. – V. 14, N 3. – P. 1571–1578.
573. Stachowiak B. Health-promoting potential of edible macromycetes under special consideration of polysaccharides: a review / B. Stachowiak, J. Reguia // Eur. Food Res. Technol. – 2012. – V. 234, N 3. – P. 369–380.
574. Stahl P. D. Characterization and differentiation of filamentous fungi based on fatty acid composition / P. D. Stahl, M. J. Klug // Appl. Environ. Microbiol. – 1996. – V. 62, N 11. – P. 4136–4146.
575. Stahl W. Bioactivity and protective effects of natural carotenoids / W. Stahl, H. Sies // Biochem. Biophys. Acta. – 2005. – V. 1740. – P. 101–107.
576. Stajic M. Effect of different carbon and nitrogen sources on laccase and peroxidases production by selected *Pleurotus* species / M. Stajic, L. Persky, D. Friesem [et al.] // Enzyme Microb. Tech. – 2006. – V. 38. – P. 65–73.
577. Stamets P. The mushroom cultivator / P. Stamets, J. S. Chilton – Washington: Agarikon Press, Olympia, 1984. – 415 p.
578. Standish L. J. *Trametes versicolor* mushroom immune therapy in breast cancer / L. J. Standish, C. A. Wenner, E. S. Sweet [et al.] // J. Soc. Integr. Oncol. – 2008. – V. 6, N 3. – P. 122–128.
579. Strigacova J. Glutamate decarboxylase activity in *Trichoderma viride* conidia and developing mycelia / J. Strigacova, P. Chovanec, T. Liptaj [et al.] // Arch. Microbiol. – 2001. – V. 175, N 1–2. – P. 32–40.
580. Sugimoto K. Syntheses of α -arbutin- α -glycosides and their inhibitory effects on human tyrosinase / K. Sugimoto, K. Nomura, T. Nishimura [et al.] // J. Biosci. Bioeng. – 2005. – V. 99, N. 3. – P. 272–276.
581. Suhadolnik R. I. Nucleosides as biological probes / R. I. Suhadolnik. – N. Y., 1979. – 360 p.
582. Suikowska-Ziaja K. Chemical composition and cytotoxic activity of the polysaccharide fractions in *Sarcodon imbricatus* (Basidiomycota) [Электронный ресурс] / K. Suikowska-Ziaja, B. Muszycka, H. Ekiert //

- Acta. Mycol. – 2012. – V. 47, N 1. – P. 49–56. – Режим доступа к журн.: <http://msafungi.org>
583. Sung J. M. *Cordyceps* diversity and its preservation in Korea / J. M. Sung // Inoculum. – 2004. – V. 55, N 4. – P. 1–3.
584. Takaki K. Improvement of Edible Mushroom Yield by Electric Stimulations / K. Kakaki, T. Yamazaki, S. Mukaigawa [et al.] // J. Plasma Fusion Res. Series. – 2009. – V. 8. – P. 556–559.
585. Takaki K. Effect of Electrical Stimulation on Fruit Body Formation in Cultivating Mushrooms / K. Takaki, K. Yoshida, Saito [et al.] // Microorganisms – 2014. – V. 2. – P. 58–72.
586. Takamura K. Determination of vitamin D2 in shiitake mushroom by high-performance liquid chromatography / K. Takamura, H. Hostio, T. Sugahara, H. Amano // J. Chromatogr. – 1991. – V. 545. – P. 201–204.
587. Tamalaitis G. High-power light emitting diode based facility for plant cultivation / G. Tamalaitis, P. Duchovskis, Z. Bliznikas [et al.] // J. Physics D: Appl. Phys. – 2005. – V. 38. – P. 3182–3187.
588. Tang Y. J. Fed-batch fermentation of *Ganoderma lucidum* for hyperproduction of polysaccharide and ganoderic acid / Y. J. Tang, J. J. Zhong // Enzyme Microb. Technol. – 2002. – V. 31. – P. 20–28.
589. Tang Y. J. Role of oxygen supply in submerged fermentation of *Ganoderma lucidum* for production of *Ganoderma* polysaccharide and ganoderic acid / Y. J. Tang, J. J. Zhong // Enzyme Microb. Technol. – V. 2003. – V. 32. – P. 478–484.
590. Tang Y. J. Improvement of ganoderic acid and *Ganoderma* polysaccharide biosynthesis by *Ganoderma lucidum* fermentation under the inducement of Cu^{2+} . / Y. J. Tang, L. W. Zhu // Biotech. Prog. – 2010. – V. 26, N 2. – P. 417–423.
591. Tang Y. J. Scale-up study on the fed-batch fermentation of *Ganoderma lucidum* for the hyperproduction of ganoderic acid

- and *Ganoderma* polysaccharides / Y. J. Tang, W. Zhang, R-S. Liu [et al.] // Process Biochemistry. – 2011. – V. 46, N 1. – P. 404–408.
592. Thiyagarajan A. Optimizatón of extracellular peroxidase production from *Coprinus sp.* / A. Thiyagarajan, K. Saravanakumar, V. Kaviyarasan // Int. J. Sci. Tech. – 2008. – Vol. 1, N 7. – P. 1–5.
593. Thongchul N. Controlling Űlamentous fungal morphology by immobilization on a rotating Űbrous matrix to enhance oxygen transfer and l(+)-lactic acid production by *Rhizopus oryzae* / N. Thongchul, S. T. Yang // Ferment Biotechnol. ACS Sym. Ser. – 2003. – V. 862. – P. 36–51.
594. Tisch D. Light regulation of metabolic pathways in fungi / D. Tisch, M. Schmoll // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2010. – V. 85, N 5. – P.1259–1277.
595. Tisch D. New insights into the mechanism of light modulated signaling by heterotrimeric G-proteins: ENVOY acts on *gna1* and *gna3* and adjusts cAMP levels in *Trichoderma reesei* (*Hypocrea jecorina*) / D. Tisch, C. P. Kubicek, M. Schmoll // Fungal Genet. Biol. – 2011. – V. 48, N 6. – P. 631–640.
596. Tisch D. The phosducin-like protein PhLP1 impacts regulation of glycoside hydrolases and light response in *Trichoderma reesei* / D. Tisch, C. P. Kubicek, M. Schmoll // BMC Genomics. – 2011. – V. 12. – P. 613.
597. Tisch D. Targets of light signalling in *Trichoderma reesei* / D. Tisch, M. Schmoll // BMC Genomics. – 2013. – V. 14, N 1. – P. 657.
598. Tisch D. Crossroads between light response and nutrient signalling: ENV1 and PhLP1 act as mutual regulatory pair in *Trichoderma reesei*. / D. Tisch, C. P. Kubicek, M. Schmoll // BMC Genomics. – 2014. – V. 15. – P. 425–438.
599. Trewavas A. Understanding the control of plant development and the role of growth substances / A. Trewavas // Australian J. Plant. Physiology. – 1986. – V. 13, N 4. – P. 447–157.

600. Tseng Y. H. Contents of sugars, free amino acids and free 5r-nucleotides in mushrooms, *Agaricus bisporus*, during post-harvest storage / Y. H. Tseng, J. L. Mau // J. Sci. Food Agric. – 1999. – V. 79, N 11. – P. 1519–1523.
601. Tsukamoto S. Development of an automatic electrical stimulator for mushroom sawdust bottle / S. Tsukamoto, H. Kudoh, S. Ohga [et al.] // 15 IEEE International Pulsed Power Conference, 13–17 june 2005 y.: proceedings. – USA: CA Monterey, 2005. – P. 1437–1440.
602. Tunér J. Laser therapy, clinical practice and scientific background / J. Tunér, L. Hode. – Sweden: Prima Books, 2002. – 570 p.
603. Tunér J. The new laser therapy handbook. / J. Tunér, L. Hode. – Sweden: Prima Books, 2010. – 71 p.
604. Turian G. Conidiation in *Neurospora* / G. Turian, D. E. Branchi // Bot. Rev. – 1972. – V. 38, N 1. – P. 119–154.
605. Turkoglu A. Antioxidant and antimicrobial activities of *Morchella conica* Pers / A. Turkoglu, I. Kivrak, N. Mercan // Afr. J. Biotechnol. – 2006. – V. 5, N 11. – P. 1146–1150.
606. Vacca R. F. Increase in cytosolic and mitochondrial protein synthesis in rat hepatocytes irradiated in vitro by He-Ne laser / R. F. Vacca, E. Marra, S. Passarella [et al.] // J. Photochem. Photobiol. – 1996. – V. 34, N 2–3. – P. 197–202.
607. Vamanu E. Studies on the antioxidant and antimicrobial activities of *Pleurotus ostreatus* PSI101109 mycelium / E. Vamanu // Pakistan J. Botany. – 2013. – V. 45, N 1. – P. 311–317.
608. Vannucci L. Saieh M. Immunostimulatory properties and antitumor activities of glucans (Review) / L. Vannucci, J. Krizan, P. Sima [et al.] // Int. J. Oncol. – 2013. – V. 43, N 2. – P. 357–364.
609. Velayos A. Blue-light regulation of phytoene dehydrogenase (*carB*) gene expression in *Mucor circinelloides* / A. Velayos, J. L. Blasco, M. I. Alvarez [et al.] // Planta. – 2000. – V. 210, N 6. – P.938–946.

610. Vetter J. New data on the chemical composition of our cultivated mushroom species / J. Vetter // 2-nd Internat. Conf. on Mushroom Cultivation, 22–23 may 2000 y.: proc. – Hungary, Budapest, 2000. – P. 51–54.
611. Vetter J. Chemical composition of fresh and conserved mushroom / J. Vetter // Eur. Food. Res. Technol. – 2003. – V. 217, N 1. – P. 10–12.
612. Volz P. A. Dicariotic fruiting in *Schizophyllum commune* F. Morphology of developing basidiocarp / P. A. Volz, D. J. Niederpruem // Arch. Microbiol. – 1969. – V. 68, N 3. – P. 246–258.
613. Wang H. X. A new lectin with highly potent antihepatoma and anisarcoma activities from the oyster mushroom *Pleurotus ostreatus* / H. X. Wang, J. Gao, T. B. Ng // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2000. – V. 275. – P. 810–816.
614. Wang H. X. Isolation and characterization of velutin, a novel low-molecular-weight ribosome-inactivating protein from winter mushroom (*Flammulina velutipes*) fruiting bodies / H. X. Wang, T. B. Ng // Life Sci. – 2001. – V. 68. – P. 2151–2158.
615. Wang S. Y. Pharmacological functions of Chinese medicinal fungus *Cordyceps sinensis* and related species / S. Y. Wang, M. S. Shiao // J. Food Drug Anal. – 2000. – V. 8, N 4. – P. 248–257.
616. Wang T. The role of NF- κ B in the regulation of cell stress responses / T. Wang, X. Zhang, J. J. Li // Int. Immunopharmacol. – V. 2, N 11. – 2002. – P. 1509–1520.
617. Wang Z. H. Submerged fermentation of *Inonotus obliquus* / Z. H. Wang, Y. F. Huo, B. Wang, J. W. Shen // Mycosystema. – 2006. – V. 25, N 3. – P. 461–467.
618. Wannet W. J. B. HPLC detection of soluble carbohydrates involved in mannitol and trehalose metabolism in the edible mushroom *Agaricus bisporus* / W. J. B. Wannet, J. H. M. Hermans, C. van der Drift, H. J. M. Op den Camp // J. Agric. Food Chem. – 2000. – V. 48, N 2. – P. 287–291.

619. Wasser, S. P. Therapeutic effects of substances occurring in Higher Basidiomycetes mushrooms: a modern perspective / S. P. Wasser, A. L. Weis // *Critical Rev. Immunol.* – 1999. – V. 1. – P. 65–96.
620. Wasser S. P. Medicinal properties of substances occurring in Higher Basidiomycetes mushrooms: Current Perspectives (Review) / S. P. Wasser, F. L. Weis // *Int. J. Med. Mushr.* – 1999. – V.1, N 1. – P. 31–62.
621. Wasser S. P. Therapeutic effects of substances occurring in Higher Basidiomycetes mushrooms: a modern perspective / S. P. Wasser, A. L. Weis // *Crit. Rev. Immunol.* – 1999. – V.1. – P. 65–96.
622. Wasser S. P. Dietary supplements from medicinal mushrooms: diversity of types and variety of regulations / S. P. Wasser, D. Sokolov, S. V. Reshetnikov, M. Timor-Tismenetsky // *Int. J. Med. Mushr.* – 2000. – V. 2, N 1. – P. 1–19.
623. Wasser S. P. Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides / S. P. Wasser // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2002. – V. 60. – P. 258–274.
624. Wasser S. P. Medicinal mushrooms: past, present and future / S. P. Wasser, K. M. Sytnik, A. S. Buchalo, E. F. Solomko // *Укр. ботан. журн.* – 2002. – Т. 59, №5. – С. 499–524.
625. Wasser S. P. The importance of culinary-medicinal mushrooms from ancient times to the present / S. P. Wasser // *Int. J. of Med. Mushr.* – 2005. – V. 7, N 3. – P. 263–264.
626. Wasser S. P. Medicinal mushroom science: history, current status, future trends, and unsolved problems / S. P. Wasser // *Int. J. Med. Mushr.* – 2010. – V. 12, N 1. – P. 1–16.
627. Wasser S. P. Medicinal mushroom science: current perspectives, advances, evidences, and challenges / S. P. Wasser // *Biomed. J.* – 2014. – V. 37, N 6. – P. 345–356.
628. Watanabe T. Effects of ozone exposure during cultivation of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) on chemical components of the fruit bodies

- / T. Watanabe, N. Tsuchihashi, Y. Takai // J. Jpn. Soc. Food Sci. Technol. – 1994. – V. 41, N 10. – P. 705–708.
629. Watling R. Studies in fruit-body development in the Blbitiaceae and the implication of such work / R. Watling // *Nova Hedwigia*. – 1975. – V. 51. – P. 319–356.
630. Weaver J. C. Comparative protein studies (Kjeldahl, dye binding, amino acid analysis) of nine strains of *Agaricus bisporus* (Lange) Imbach mushrooms / J. C. Weaver, M. Kroger, L. R. Kneebone // *J. Food Sci.* – 1977. – V. 42, N 2. – P. 364–366.
631. Weete J. D. Mycelial lipid as an aid in identifying rust fungi in culture *Cronartium fusiforme* / J. D. Weete, W. D. Kelley, C. A. Hollis // *Can. J. Microbiol.* — 1979. – V. 25, № 12. – P. 1481–1483.
632. Weet J. D. Lipid biochemistry of fungi and other organisms / J. D. Weet – N. Y.: Plenum Press, 1980. – 388 p.
633. Werner A. R. Growing high-selenium edible and medicinal button mushrooms (*Agaricus bisporus* (J.Lge) Imbach) as ingredients for functional foods or dietary supplements / A. R. Werner, R. B. Beelman // *Int. J. Med. Mushr.* – 2002. – V. 4, N 2. – P. 167–171.
634. Wu Y. Structural analysis of a neutral (1→3), (1→4)-beta-D-glucan from the mycelia of *Cordyceps sinensis* / Y. Wu, C. Sun, Y. Pan // *J. Nat. Prod.* – 2005. – V. 68, N 5. – P. 812–814.
635. Wuyep P.A., Khan A.U. Nok A.J. Production and regulation of lignin degrading enzymes from *Lentinus squarrosulus* (mont.) Singer and *Psathyrella atroumbonata* Pegler / P.A. Wuyep, A.U. Khan, A.J. Nok // *African J. Biotechnology*. – 2003. V. 2, N 11. – P. 444–447.
636. Xing L. Low-fluence red light increases the transport and biosynthesis of auxin / L. Xing, J. D. Cohen, G. Gardner // *Plant Physiology*. – 2011. – V. 157, N 2. – P. 891–904.
637. Xu X. Comparative antioxidative characteristics of polysaccharide-enriched extracts from natural sclerotia and cultured mycelia in submerged

- fermentation of *Inonotus obliquus* / X. Xu, Y. Wu, H. Chen // Food Chem. – 2011. – V. 127. – P. 74–79.
638. Xu X. H. Bioactive proteins from mushrooms / X. H. Xu, H. Yan, J. Chen, X. Zhang // Biotechnol. Adv. – 2011. – V. 29, N 6. – P. 667–674.
639. Yang F. C. The influence of environmental conditions on polysaccharide formation by *Ganoderma lucidum* in submerged cultures / F. C. Yang, C. B. Liao // Process Biochem. – 1999. – V. 33. – P. 547–553.
640. Yang F. C. Effect of fatty acids on the mycelial growth and polysaccharide formation by *Ganoderma lucidum* in shake flask cultures / F. C. Yang, Y. F. Ke, S. S. Kuo // Enzyme Microb. Technol. – 2000. – V. 27, N 3-5. – P. 295–301.
641. Yang J. H. Non-volatile taste components of several commercial mushrooms / J. H. Yang, H. C. Lin, J. L. Mau // Food Chem. – 2001. – V. 72. – P. 465–471.
642. Yang J. H. Antioxidant properties of commercial mushrooms / J. H. Yang, H. C. Lin, J. L. Mau // Food Chem. – 2002. – V. 77. – P. 229–235.
643. Yang Q. Y. Medicinal mushrooms in China / Q. Y. Yang, S. C. Jong // Mushr. Sci. – 1989. – N 12. – P. 644.
644. Yang, T. Photo morphogenesis and photo response of the blue-light receptor gene Cmwc-1 in different strains of *Cordyceps militaris* [Электронный ресурс] / T. Yang, C. Dong // FEMS Microb. Letters. – 2014. – V. 352, N 2. – P. 190–197. – Режим доступа к журн.: <http://dx.doi.org/10.1111/1574-6968.12393>.
645. Yeh K.C. Eukaryotic phytochromes: lightregulated serine/threonine protein kinases with histidine kinase ancestry / K.C. Yeh, J.C. Lagarias // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. – 1998. – V.95. – P. 13976– 13981.
646. Ying J. H. Icones of medicinal fungi from China / J. H. Ying, X. Mao, Q. Ma // Trans. by X. Yuehan. – Beijing: Sci. Press, 1987. – 575 p.

647. Yoko N. Identification of blue-light photoresponse genes in mushroom mycelia / N. Yoko, F. Niroshi, K. Masanobu // Biosci. Biotechnol. Biochem. – 2010. – V.74, N 10. – P.2160–2165.
648. Yokokawa H. Fatty acid and sterol composition in mushrooms of ten species of *Polyporaceae* / H. Yokokawa // Phytochemistry. – 1980. – V. 19, N 12. – P. 2615-2618.
649. Yu R. Isolation and biological properties of polysaccharide CPS-1 from cultured *Cordyceps militaris* / R. Yu, L. Song, Y. Zhao [et al.] // Fitoterapia. – 2004. – V. 75, N 5. – P. 465–472.
650. Yu R. Structural characterization and antioxidant activity of a polysaccharide from the fruiting bodies of cultured *Cordyceps militaris* / R. Yu, W. Yang, L. Song [et al.] // Carbohydr. Polym. – 2007. – V. 70, N 4. – P. 430–436.
651. Yuko O. The nonheterothallic life cycle of Japanese *Armillaria mellea* / O. Yuko // Mycologia. – 1998. – V. 90, N 3. – P. 396–405.
652. Zaidman B. Z. Medicinal mushroom modulators of molecular targets as cancer therapeutics / D. Z. Zaidman, M. Yassin, J. Mahajna, S. P. Wasser // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2005. – V. 67. – P. 453–468.
653. Zalevsky, Z. Coherence and speckle in photomedicine and photobiology / Z. Zalevsky, M. Belkin / Photomedicine and Laser Surgery. – 2011. – V. 29, N 10. – P. 655–656.
654. Zervakis G. J. Mating competence and biological species within the subgenus *Coremiopleurotus* / G. J. Zervakis // Ibid. – 1998. – V. 90, N 6. – P. 1063–1074.
655. Zhang B. B. A mechanistic study of the enhancing effect of Tween 80 on the mycelial growth and exopolysaccharide production by *Pleurotus tuber-regium* / B. B. Zhang, P. C. K. Cheung // Bioresour Technol. – 2011. – V. 102. – P. 8323–8326.

656. Zhang H. Flammulin purified from the fruit bodies of *Flammulina velutipes* (Curt. Fr) P. Karst / H. Zhang, F. Gong, Y. Feng, C. Zhang // Int. J. Med. Mushr. – 1999. – V 1. – P. 89–92.
657. Zhang W. Immunomodulatory and antitumour effects of exopolysaccharide fraction from cultivated *Cordyceps sinensis* (Chinese caterpillar fungus) on tumour-bearing mice / W. Zhang, J. Yang, J. Chen [et al.] // Biotechnol. Appl. Biochem. – 2005. – V. 42, N 1. – P. 9–15.
658. Zhang W. A novel three-stage light irradiation strategy in the submerged fermentation of medicinal mushroom *Ganoderma lucidum* for the efficient production of ganoderic acid and Ganoderma polysaccharides / W. Zhang, Y. J. Tang // Biotechnol. Prod. – 2008. – V. 24. – P. 1249–1261.
659. Zhang Y. cDNA Microarray Analysis of Gene Expression Profiles in Human Fibroblast Cells Irradiated with Red Light *FREE* / Y. Zhang, S. Song, C. C. Fong, C. H. Tsang [et al.] // J. Invest. Dermatol. – 2003. – V. 120, N 5. – P. 849–857.
660. Zhdanova N. N. Fungi from Chernobyl : mycobiota of the inner regions of the containment structures of the damaged nuclear reactor / N. N. Zhdanova, V. A. Zakharchenko, V. V. Vember [et al.] // Mycol. Res. – 2000. – V. 104. – P. 1421–1426.
661. Zheng W. F. Aminophenols and mold-water-extracts affect the accumulation of flavonoids and their antioxidant activity in cultured mycelia of *Inonotus obliquus* / W. F. Zheng, Q. Gu, C. F. Chen [et al.] // Mycosystema. – 2007. – V. 26, N 3. – P. 414–426.
662. Zheng W. F. Sterol composition in field-grown and cultured mycelia of *Inonotus obliquus* / W. F. Zheng, T. Liu, X. Xiao, G. Qi // Acta Pharm. Sinic. – 2007. – V. 42. – P. 750–756.
663. Zheng W. F. Accumulation of antioxidant phenolic constituents in submerged cultures of *Inonotus obliquus* / W. F. Zheng, M. Zhang, Y. Zhao [et al.] // Bioresource Technol. – 2009. – V. 100, N 3. – P. 1327–1335.

664. Zheng W. NMR-based metabonomic analysis on effect of light on production of antioxidant phenolic compounds in submerged cultures of *Inonotus obliquus* / W. Zheng, M. Zhang, Y. Zhao [et al.] // *Bioresource Technol.* – 2009. – V. 100, N 19. – P. 4481–4487.
665. Zheng W. Chemical diversity of biologically active metabolites in the sclerotia of *Inonotus obliquus* and submerged culture strategies for up-regulating their production / W. Zheng, K. Miao, Y. Liu [et al.] // *Appl. Microbiol. Biotech.* – 2010. – V. 87, N 4. – P. 1237-1254.
666. Zheng W. Production of antioxidant and antitumor metabolites by submerged cultures of *Inonotus obliquus* cocultured with *Phellinus punctatus* / W. Zheng, Y. Zhao, X. Zheng [et al.] // *Appl. Microbiol. Biotech.* – 2011. – V. 89, N 1. – P. 157–167.
667. Zheng-Fei Y. Inhibitory and Acceleratory Effects of *Inonotus obliquus* on Tyrosinase Activity and Melanin Formation in B16 Melanoma Cells / Y. Zheng-Fei, Y. Yang, T. Feng-Hua [et al.] // *eCAM* – 2014. – V. 2014. – 11 p. – Article ID 259836.
668. Zhu J. C. Effect of blue light on conidiation development and glucoamylase enhancement in *Aspergillus niger* / J. C. Zhu, X. J. Wang // *Wei Sheng Wu Xue Bao.* – 2005. – V. 45. – P. 275–278.
669. Zhu, H. S. Effects of extracts from sporoderm-broken spores of *Ganoderma lucidum* on HeLa cells / H. S. Zhu, X. L. Yang, L. B. Wang [et al.] // *Cell. Biol. Toxicol.* – 2000. – V. 16, N 3. – P. 201–206.
670. Zjawiony J. Biologically active compounds from Aphyllophorales (Polypore) fungi / J. Zjawiony // *J. Nat. Prod.* – 2004. – V. 67. – P. 300–310.
671. Zong A. Anticancer polysaccharides from natural resources: A review of recent research / A. Zong, H. Cao, F. Wang // *Carbohydr. Polym.* – 2012. – V. 90, N 4. – P. 1395–1410.
672. Zu L. W. Multi-fed batch culture integrated with three-stage light irradiation and multiple additions of copper ions for the hyperproduction of ganoderic acid and *Ganoderma* polysaccharides by the medicinal mushroom

Ganoderma lucidum / L. W. Zu, J. J. Zhong, Y. J. Tang / Process Biochemistry. – 2010. – V. 45, N 12. – P. 1904–1911.

673. Zurzycka A. The effect of light intensity and glucose concentration on the development of *Aspergillus giganteus* mutant alba / A. Zurzycka // Mycol. Res. – 1991. – V. 95, N 10. – P. 1197–1200.