

ростовым коэффициентом, плотностью, высотой и другими макроморфологическими параметрами следует использовать 8% среду.

Работа выполнена в рамках гранта БРФФИ Б24МП-032 «Оценка плодообразующей способности штаммов *Pleurotus pulmonarius*, культивируемых при повышенных температурах» на 2024-2026 гг.

Литература

1. Мамаева, О.О. Скрининг питательных сред для глубинного культивирования базидиальных грибов с получением посевного материала / О.О. Мамаева, М.В. Скاتков, Е.В. Исаева // Решетневские чтения: материалы XXV междунар. науч.-практ. конф., посвящ. памяти генерального конструктора ракетно-космических систем академика М.Ф. Решетнева, Красноярск, 10–12 нояб. 2021 г.: в 2 ч. / под общ. ред. Ю.Ю. Логинова. – Красноярск: СибГУ им. М.Ф. Решетнева, 2021. – Ч. 2. – С. 120–122.

2. Кульгавеня, А.Д. О культивировании вешенки обыкновенной / А.Д. Кульгавеня // Научный потенциал молодежи – будущему Беларуси: материалы XVI междунар. молодежной науч.-практ. конф., Пинск, 15 апр. 2022 г.: в 2-х ч. / М-во образования Республики Беларусь [и др.]; редкол.: В.И. Дунай [и др.]. – Пинск: ПолесГУ, 2022. – Ч. 2. – С. 240–242.

3. Коллекция штаммов грибов (FIB): каталог / Ин-т леса, Нац. акад. наук Беларуси; сост.: С.А. Коваленко, И.В. Маховик, И.В. Бордок. – Минск: Белорусская наука, 2023. – 71 с.

ИССЛЕДОВАНИЕ ОСОБЕННОСТЕЙ МЕЛАНИНОГЕНЕЗА «ЧЕРНЫХ ДРОЖЖЕЙ» АНТАРКТИДЫ

Е.А. Грибанова, В.Е. Мямин, В.П. Курченко
БГУ, г. Минск, Республика Беларусь, lika-den98@mail.ru

Меланины – темноокрашенные высокомолекулярные нерегулярные биополимеры, образующиеся в организмах при ферментативном окислении азотсодержащих и безазотистых полифенолов. Являясь ингибитором свободнорадикальных реакций, меланины способны подавлять рост злокачественных опухолей, оказывать защитное действие от летальных доз ионизирующего излучения, тормозить процессы перекисного окисления липидов, стимулировать рост растений. Меланины используются в медицине, фармакологии, сельском хозяйстве и в других областях [1].

В природе распространены меланины растительного, животного и микробиологического происхождения, отличающиеся широким разнообразием по химическому составу, физиологическим свойствам [2].

В последнее время выделена специфическая экологическая группа «черных дрожжей», характерная исключительно для экстремальных местообитаний и открытая совсем недавно. У «черных дрожжей» есть ряд специфических признаков, характерных только для этой группы. Они одновременно формируют как мицелий, так и дрожжеподобные клетки, имеют меристематический мицелий, часто не образуют ни бесполой (конидиеносные структуры), ни половых (аски) органов размножения, синтезируют много меланинов, олиготрофны, могут достаточно долго жить в среде, содержащей мало азота, за счет накопленных запасов, синтезируют широкий набор ферментов, чтобы потреблять трудно разлагаемые субстраты, накапливают высокий уровень трегалозы, многоатомных спиртов и сахаров, как осмопротекторов для переживания засушливых условий и выдерживают высокие и низкие температуры, а также резкие перепады температур, метаболизируя даже при –17 °С. Эта группа микромицетов в Антарктиде распространена в почвах сухих долин и горных породах, представлена родами

Aureobasidium, *Dioszegia*, *Exophiala*, *Friedmanniomyces*, *Hortaea* и др. Среди черных литобионтных грибов много психро- и термотолерантов. Предположительная экологическая роль «черных дрожжей» состоит в защите других членов эндолитных сообществ от негативных факторов – перепады температур, УФ, высыхание и др. Часто они являются основной составной частью эндолитных сообществ, формируя мутуалистические связи с бактериями и водорослями [3].

Таким образом, в настоящее время актуальны исследования микроорганизмов Антарктиды, в частности антарктических дрожжей, которые являются весьма перспективными в качестве источника меланиновых пигментов.

Целью данной работы являлся анализ зависимости синтеза пигмента от физических и химических факторов среды, а также оптимизация условий по экстрагированию меланина из клеток дрожжей.

Материал и методы. В качестве объекта исследования выступал представитель «черных дрожжей» *Dothiora cannabinae* БИМ У-383, который ранее был выделен из образца мелкозёма «чёрного ручья» у подножья горы Вечерней, Земли Эндерби, Восточная Антарктида, отобранного и привезенного из белорусской антарктической экспедиции в 2015 году.

Влияние температуры и времени культивирования на синтез пигмента. Культуру «черных дрожжей» предварительно выращивали до стационарной фазы роста при постоянной аэрации в среде Сабуро (ФБУН ГНЦ ПМБ «Бульон Сабуро сухой»). Проводили высев методом Дригальского на поверхность агаризованной среды Сабуро (ФБУН ГНЦ ПМБ «Питательная среда №2 ГРМ (САБУРО)») на следующие температуры: 10, 18, 22, 28, 32 и 37 °С. Учет проводили на 3, 6, 9, 12 и 16 сутки.

Влияние pH среды, присутствие тяжелых металлов и аминокислот на синтез пигмента клетками. Выращенную до стационарной фазы роста культуру дрожжей высевали методом Дригальского на поверхность агаризованной среды Сабуро с различными значениями pH (3, 5, 6, 7, 9), в качестве источников тяжелых металлов использовали соли в конечной концентрации 0,1% CuSO₄, FeCl₃, (CH₃COO)₂Pb, Cr(CH₃COO)₃, Co(CH₃COO)₂, MnSO₄, CoSO₄, KAl(SO₄)₂, FeSO₄, ZnSO₄, Co(NO₃)₂, KMnO₄. В качестве источников аминокислот использовали тирозин и аспарагин.

Экстракция меланинов. Методом щелочной экстракции проводили выделение меланинов из клеток дрожжей. В результате выпадал хлопьевидный осадок коричневого цвета (меланин). Экстрагированный пигмент промывали водой, растворяли в 0,1 н NaOH и сушили. На выходе получали пигмент в виде коричневого сыпучего порошка.

Физико-химических свойства меланинов. Способность растворяться в типичных для этих пигментов растворителях (щелочи, концентрированных H₂SO₄ и HNO₃), обесцвечиваться под воздействием окислителей (H₂O₂, Na₂S₂O₄, KMnO₄ и бромной воды), взаимодействовать с FeCl₃.

Результаты и их обсуждение. Отличительной особенностью пигмент образования *Dothiora cannabinae* БИМ У-383 является образование в первые сутки культивирования кремовых выпуклых колоний и по мере роста переход к формированию черно-коричневого пигмента, через желто-оранжевую фазу, которая в разной степени проявляется в зависимости от температуры культивирования.

В ходе анализа влияния времени и температуры культивирования на рост и пигментацию «черных дрожжей» *Dothiora cannabinae* БИМ У-383 было выявлено, что рост культуры возможен в диапазоне от 10 до 32 °С, с оптимумом 22–28 °С. Оптимальным для синтеза пигмента является также диапазон 22–28 °С. При увеличении времени синтеза от 3 до 9 суток интенсивность линейно растёт, а затем выходит на насыщение.

Добавление тяжелых металлов в питательную среду для культивирования «черных дрожжей» позволило выявить ряд закономерностей: соли Cu^{2+} , Co^{2+} и KMnO_4 полностью ингибируют рост и развитие дрожжей; добавление Fe^{2+} и Fe^{3+} стимулирует рост и активное пигмент образование; присутствие соединений Pb^{2+} , Cr^{3+} , Mn^{2+} , KAl^{2+} , Zn^{2+} либо частично, либо полностью ингибировало пигмент образование при сохранении умеренного роста дрожжей.

Уровень кислотности среды оказывал влияние как на рост дрожжей, так и на пигмент образование. При pH в среде равной 9 рост и пигмент образование угнетались; при pH=7 темпы роста и пигмент образования были снижены; при pH=5 наблюдалось усиление роста и пигмент образования по сравнению с контролем (pH=6); при pH=3 наблюдалось заметное нарушение пигментации, однако на рост это никак не повлияло. Диапазон значения pH от 5 до 6 определен как оптимальный для роста и синтеза меланиновых пигментов исследуемыми культурами психротолерантных дрожжей.

Добавление аминокислот, в качестве предшественников в путях синтеза меланиновых пигментов предположительно должно ускорять процесс синтеза пигмента. В исследованиях добавление аспарагина и тирозина при росте в диапазоне температур 18–28 °C стимулировало синтез меланинов. Следует отметить, что одновременное внесение аминокислот и ионов Fe^{2+} или Fe^{3+} в состав среды для культивирования дало разный эффект. Комплекс ионов Fe^{3+} и тирозина определен как наиболее оптимальный для меланиногенеза «черных дрожжей» *Dothiora cannabinae* БИМ Y-383. Следует отметить, что при увеличении концентрации ионов Fe^{3+} до 0,01 М в среде для культивирования позволяло получать как насыщенно чёрный внутриклеточный пигмент, окрашивающий клетки исследуемых дрожжей, так и внеклеточный чёрный пигмент, окрашивающий среду для культивирования.

Для спектрального анализа и проведения качественных реакций, подтверждающих принадлежность исследуемых пигментов к меланинам, проводили экстракцию щелочным методом. Оптимизировав параметры щелочной и температурной обработки, получали очищенный пигмент в виде сухого порошка. Спектральный профиль в виде нисходящей прямой и качественные реакции подтвердили принадлежность исследуемых пигментов к меланинам.

Заключение. Согласно результатам исследований психротолерантные «чёрные дрожжи» *Dothiora cannabinae* БИМ Y-383, выделенные из образцов мелкозёма Восточной Антарктиды, продуцируют внутриклеточный меланиновый пигмент. Полученные данные позволяют детальнее разобраться в физико-химических факторах, влияющих на синтез меланиновых пигментов дрожжевыми культурами. Дальнейшие исследования и оптимизация процессов экстракции пигмента позволят получить психротолерантного продуцента меланина, перспективного для применения в биотехнологических целях.

Литература

1. Агаджанян, А.Е. Микробиологическое получение водорастворимого меланина и изучение его физико-химических свойств // Прикладная биохимия и микробиология. – 2011. – Т. 47. – №. 5. – С. 551–557.
2. Прутенская, Е.А. Сравнительная характеристика структуры меланинов различного происхождения // Символ науки. – 2016. – №. 11–3. – С. 11–13.
3. Никитин Д.А. Экологические особенности грибов Антарктиды // Микология и фитопатология. – 2021. – Т. 55. – №. 2. – С. 79–104.