

СОДЕРЖАНИЕ МЕЛАНИНОВЫХ ПИГМЕНТОВ В МИЦЕЛИИ И ПЛОДОВЫХ ТЕЛАХ ГРИБА *GANODERMA LUCIDUM* (CURT.: FR.) P. KARST В ЗАВИСИМОСТИ ОТ СПОСОБА КУЛЬТИВИРОВАНИЯ

Пучкова Т.А.¹, Трухоновец В.В.², Иконникова Н.В.³

¹Белорусский государственный университет, Минск,
tatiashi@mail.ru

²Гомельский государственный университет им. Франциска Скорины, Гомель,
trukhanavets@tut.by

³Международный экологический институт имени А.Д. Сахарова
Белорусского государственного университета, Минск

Дереворазрушающий гриб трутовик лакированный (*Ganoderma lucidum* (Curt.: Fr.) P. Karst.) в течение столетий применялся в народной медицине стран Юго-Восточной Азии. Гриб содержит комплекс биологически активных веществ, наиболее изученными из которых являются высокомолекулярные полисахариды (β -глюканы) и терпеноиды (ганодериковые кислоты) [2, 7].

В природе плодовые тела гриба имеют коричневую окраску различных оттенков – от рыжеватой, красно-коричневой до темно-коричневой, почти черной. Важнейшими пигментами, определяющим коричневую окраску у трутовых грибов, считаются меланины. Обычно эти пигменты находятся в клеточной стенке и связаны с хитином.

Меланины – это высокомолекулярные полимеры, имеющие сложную структуру, сходную с лигнином. Структура меланинов изучена недостаточно. Они образуются в результате полимеризации индольных и фенольных соединений. Меланины содержат неспаренные электроны в виде стабильных свободных радикалов, которые могут дополнительно вступать в реакции с ионами металлов или с некоторыми белками.

Присутствие в клетках меланинов не является необходимым для развития грибов, но эти пигменты защищают их от неблагоприятных условий окружающей среды (ультрафиолетового света, экстремальных температур, окислителей, тяжелых металлов, радионуклидов, гидролитических ферментов, противомикробных препаратов). Защитный эффект обусловлен способностью меланиновых пигментов за счёт обратимого процесса окисления и восстановления удалять образующиеся в ответ на действие стрессовых факторов свободные радикалы (активные формы азота и кислорода) и стабилизировать уровень окислительно-восстановительного потенциала в клетках.

Благодаря своим физико-химическим свойствам меланины трутовых грибов обладают антиоксидантными, генопротекторными, сорбционными и фотопротекторными свойствами, ингибируют образование продуктов

перекисного окисления липидов и замедляют процесс старения. Грибные меланины находят все более широкое применение в медицине и производстве косметических средств [4-6].

В то же время, меланиновые пигменты грибов рода *Ganoderma* до настоящего время остаются мало изученными. Целью данной работы являлось исследование образования меланинов у гриба *G. lucidum* на разных стадиях роста и при различных способах культивирования.

В работе использовали выделенный из природных плодовых тел в чистую культуру штамм *G. lucidum* 3, который затем поддерживали на скошенном агаризованном сусле, 8 °Б. Колонии гриба выращивали в чашках Петри на агаризованных средах: сусле (8 °Б) или глюкозо-пептонной среде (г/л воды: глюкоза, 20; пептон, 3; кукурузный экстракт, 2; K_2HPO_4 , 1; KH_2PO_4 , 1; $MgSO_4 \times 7H_2O$, 0,25; агар-агар, 20) при температуре 24-26 °С. Инкубирование чашек проводили до тех пор, пока мицелий полностью обрастал поверхность среды, а колонии становились очень плотными и пигментированными. Затем все содержимое чашки Петри помещали в кипящую дистиллированную воду на 3 минуты для расплавления агаризованной среды, а затем мицелиальную биомассу отделяли фильтрованием.

Мицелий гриба также выращивали на различных жидких питательных средах в условиях стационарной или глубинной культуры в колбах Эрленмейера объемом 0,5 л. Культивирование гриба в стационарных условиях проводили без перемешивания питательной среды до образования плотной мицелиальной пленки. Глубинное культивирование осуществляли на круговой качалке (180-200 об/мин), что обеспечивало постоянное перемешивание питательной среды и рост мицелия в виде пеллет. Температура культивирования – 24-26 °С. Выросший мицелий отделяли от питательной среды фильтрованием.

Плодовые тела гриба выращивали на стерильном субстрате, приготовленном из осиновых опилок и отрубей, которым заполняли полипропиленовые пакеты низкого давления и формировали субстратные блоки массой 1 кг.

К грибной биомассе добавляли 2%-ный раствор NaOH (1:10) и проводили экстракцию меланиновых пигментов в течение 2-х часов на кипящей водяной бане. Полученный экстракт охлаждали, подкисляли до pH 2,0 концентрированной HCl. Коагулировавший пигмент отделяли центрифугированием при 6000 g в течение 15 мин. Осадок растворяли в 2%-ном растворе NaOH и использовали для определения выхода меланина. Количество меланина рассчитывали по калибровочной кривой на основании данных фотометрирования раствора при длине волны проходящего света 490 нм. Количество меланина пересчитывали на абсолютно сухую биомассу.

Для идентификации выделенных пигментов проводили исследование их растворимости и качественных реакций с $KMnO_4$, H_2O_2 , $FeCl_3$ [1, 3].

Поглощение пигментами УФ- и видимого света оценивали на приборе «Specord М-40». Для определения молекулярной массы пигмента проводили гель хроматографию на колонке с сефадексом G-75.

Гриб *G. lucidum* 3 при выращивании на агаризованных питательных средах сначала формировал белые или светло-бежевые колонии, которые постепенно приобретали цвет от желтовато-золотистого до светло-коричневого. Более интенсивная окраска колоний наблюдалась, если чашки инкубировались на свету. Через 20-25 суток культивирования, когда колонии становились высокими, плотными и окрашенными, биомассу гриба отделяли от питательной среды и в ней определяли содержание пигмента.

В качестве жидких питательных сред использовали глюкозо-пептонную, а также среды, в которых в качестве источника углерода использовались крахмал, меласса или молочная сыворотка. Они обеспечивали хороший рост мицелия. При глубинном культивировании с перемешиванием выход сухой биомассы на 7 сутки культивирования в зависимости от состава среды достигал от 10 до 15 г/л, а цвет мицелия от кремового до светло-бежевого.

При культивировании на этих жидких средах в стационарных условиях для образования плотных мицелиальных пленок требовалось 20-25 суток. Максимальное количество биомассы составляло 2,0-2,5 г/л. Постепенно поверхность мицелиальных пленок приобретала желтоватую окраску.

Для получения плодовых тел *G. lucidum* стерильные субстраты из смеси осинового опилок и отрубей инокулировали зерновым мицелием. Обрастание субстрата мицелием гриба происходило при температуре 24-26 °С, образование плодовых тел – при температуре 16-20°С и освещении 100-200 люкс в течение 8 часов. В начале обрастания субстрата мицелий имел светлую окраску, позже на поверхности часто приобретал бежево-коричневый цвет. Выросшие карпофоры были сверху покрыты блестящей бордово-коричневой коркой, гименофор имел светлую окраску, споры – коричневую. Измельченная биомасса плодовых тел имела светло-коричневый цвет.

После экстракции пигментов и количественного определения установлено, что их присутствие в исследуемых образцах значительно различалось (табл.). Молодой мицелий, растущий на поверхности субстрата и при интенсивном глубинном культивировании, имел светлую окраску. В глубинном мицелии определялось небольшое количество пигмента (1,0-1,4%). При более длительном культивировании (20-25 суток) содержание пигмента повышалось до 1,8-2,5%. Образование пигмента стимулировало освещение. В субстрате на основе осинового опилок и отрубей содержались низкомолекулярные фенольные предшественники меланина – продукты разложения лигнина, поэтому окраска мицелия на поверхности субстратных блоков была более темной. Содержание пигмента в плодовых телах составляло 5,0-5,5% от сухой биомассы.

Таблица – Содержание меланиновых пигментов в образцах мицелия и плодовых тел *G. lucidum*, % от сухой биомассы

Образец	Меланины, %
Мицелий на агаризованной среде	2,2-2,5
Мицелий при стационарном культивировании	1,8-2,0
Мицелий при глубинном культивировании	1,0-1,4
Плодовые тела	5,0-5,5

Чтобы убедиться в том, что пигменты, влияющие на окраску мицелия и плодовых тел *G. lucidum* являлись меланинами, проводили их экстракцию 2%-ным раствором NaOH и исследование физико-химических свойств. Образцы пигментов растворялись в щелочи (NaOH), концентрированных кислотах (H₂SO₄ и HNO₃). Проведенные качественные реакции с растворами исследуемых пигментов свидетельствовали о присутствии в их структуре хиноидных и фенольных компонентов. Щелочные растворы пигментов обесцвечивались под воздействием H₂O₂, Na₂S₂O₄, KMnO₄ и бромной воды, взаимодействовали с FeCl₃ с образованием хлопьевидного осадка. Спектры поглощения 0,001% раствора пигмента в 0,1 N NaOH в видимой и ультрафиолетовой областях спектра имели форму наклонных прямых, характерных для меланинов грибного происхождения. Значения тангенса углов наклона спектров поглощения в волновом диапазоне 250-500 нм составляли 0,0024-0,0025. Молекулярная масса пигмента составляла 45-50 кДа.

Таким образом, исследуемый коричневый пигмент гриба *G. lucidum* имел характерные для меланинов физико-химические свойства. Наибольшее количество пигмента присутствовало в плодовых телах – 5,0-5,5%. Содержание пигмента в мицелии зависело от условий и длительности культивирования и составляло 1,0-2,5%.

Литература

1. Бабицкая В.Г., Щерба В.В., Иконникова Н.В., Меланиновый комплекс гриба *Inonotus obliquus* // Прикладная биохимия и микробиология. 2000. Т. 36, № 4. С. 439-444.
2. Бисько Н.А., Бабицкая В.Г., Бухало А.С., Круподерова Т.А., Ломберг М.Л., Михайлова О.Б., Пучкова Т.А., Соломко Э.Ф., Щерба В.В. Биологические особенности лекарственных макромицетов в культуре: Сборник научных трудов в двух томах. Т. 2 / под ред. чл.-кор. НАН Украины С.П. Вассера. – Киев, 2012. – 459 с.
3. Лях С.П. Микробный меланиногенез и его функции. – М.: Наука, 1981. – 273 с.
4. Сушинская Н.В., Кукулянская Т.А., Курченко В.П., Шостак Л.М. Физико-химические свойства и получение меланинов из базидиомицетов // Труды БГТУ. Сер. IV. Химия и технология органических веществ. – 2004. – Вып. XII. – С.193–197.
5. Plonka P.M., Grabacka M. Acta biochimica polonica. Melanin synthesis in microorganisms — biotechnological and medical aspects. 2006. Vol. 53, N 3. P. 429-443.

6. Pombeiro-Sponchiado S.R, Sousa G.S., Andrade J.C.R., Lisboa H.F., Gonçalves R.C.R. Production of melanin pigment by fungi and its biotechnological applications. In book: Melanin / Ed.: M. Blumenberg. – InTechOpen, 2017. P.47-75.

7. Stamets P. Growing gourmet and medicinal mushrooms. – Hong Kong: Ten Speed Press, 2000. – 574 p.