УДК 577.344:577.19:582.284.3

СВЕТОВАЯ РЕГУЛЯЦИЯ РОСТА И МЕЛАНИНООБРАЗОВАНИЯ У *Inonotus obliquus* (Pers.) Pilat

Н. Л. Поединок Институт ботаники им. Н. Г. Холодного НАН Украины, Киев

E-mail: poyedinok@ukr.net

Получено 21.11.2012

Целью работы было изучение возможности использования различных источников света низкой интенсивности для регуляции роста мицелия и синтеза меланина лекарственным грибом *Inonotus obliquus* (Pers.) Pilat.

Исследования влияния света на линейный рост, накопление биомассы и синтез меланина *I. obliquus* проводили с использованием экспериментальных установок, которые обеспечивали генерацию как лазерного излучения (когерентный свет) с заданными параметрами, так и излучения источников некогерентного света. Показано, что наибольший стимулирующий эффект имел место при облучении мицелия синим светом. Установлено, что дальнейшая реализация фотобиологического эффекта в значительной степени зависит от способа культивирования. Облучение лазерным светом при всех исследованных диапазонах длин волн в большей степени способствовало росту, накоплению биомассы и меланина в мицелии гриба, чем облучение некогерентным светом в том же диапазоне длин волн. Световая обработка позволила существенно сократить длительность ферментации.

Результаты исследований дают основания рассматривать низкоинтенсивный свет в видимой части спектра как перспективный регулятор роста и биосинтетической активности *I. obliquus* в биотехнологии его культивирования.

Ключевые слова: *Inonotus obliquus*, меланин, фотобиологический эффект, лазерный свет, некогерентный свет.

В связи с ухудшением экологической ситуации весьма актуальным становится поиск экологически чистых регуляторов роста и биологической активности грибов в культуре. Одним из таких факторов является природный регулятор всего живого — свет. В настоящее время меланинсодержащие грибы рассматривают как перспективные источники меланинов. Меланиновые пигменты грибов нетоксичны, обладают фото- и радиопротекторным действием, проявляют антиоксидантную, генопротекторную, противоопухолевую, антибактериальную, иммуномодулирующую и гепатопротекторную активность [1, 2].

Inonotus obliquus — широко известный меланинсодержащий гриб, обладающий широким спектром лекарственных свойств [3]. Известны работы, где исследователи рассматривают этот гриб как перспективный продуцент меланинов и меланинсодержащих субстанций [4].

Имеются данные о положительном влиянии освещения в видимой части спектра на интенсивность пигментации разных видов микромицетов. Сведения о влиянии низкоинтенсивного излучения на рост и синтез меланиновых пигментов макромицетами в литературе практически отсутствуют.

Нами изучена возможность использования различных источников света низкой интенсивности (лазеры, светодиоды) для регуляции роста мицелия и синтеза меланина *I. obliquus*.

Материалы и методы

Объектом исследования была культура базидиального меланинсинтезирующего лекарственного гриба *Inonotus obliquus* (Pers.) Pilat (шт. 1877) из Коллекции культур шляпочных грибов Института ботаники им. Н. Г. Холодного НАН Украины.

Культивирование осуществляли при температуре 26 °С на жидкой (12 сут) и агаризованной средах следующего состава: глюкоза — 30 г/л; KH_2PO_4 — 1,1 г/л; $MgSO_4$ —

0,008 г/л; кукурузный экстракт — 2 мл; пептон — 3 г/л, тирозин 0,2 г/л; тиамин 30 мкг/л. На жидкой среде культивирование проводили поверхностным (без перемешивания) и глубинным (с перемешиванием на круговой качалке со скоростью 160 об/мин) методами. Для изучения биосинтеза меланина *I. obliquus* культивировали глубинным методом в течение 12 сут. Скорость линейного роста [5] и накопления биомассы [6] определяли по общепринятым методикам. Биомассу отделяли от культуральной жидкости фильтрованием. Высушивание ее до абсолютно сухой биомассы (а.с.б.) проводили при 60 °С.

Экстракцию меланина из биомассы осуществляли 2%-м раствором NaOH с коэффициентом разбавления 1:10 в течение 2 ч на кипящей водяной бане. Полученный экстракт охлаждали и подкисляли до pH 2,0 концентрированной соляной кислотой. Коагулированный пигмент отделяли центрифугированием при 6 000 g в течение 15 мин. Полученный осадок растворяли в 2%-м растворе NaOH и использовали для количественного определения меланина, рассчитывая его по калибровочной кривой. Построение ее вели на основании данных фотометрирования растворов пигмента *I. obliquus* различной концентрации при длине проходящего света 490 нм. Для построения калибровочной кривой меланин гриба предварительно очищали методом гель-хроматографии на колонке 1,5×72 см с сорбентом Toyopearl HW-65 (Tojo Soda, Япония) в 0,01 н NaOH [7, 8]. Очищенный меланин с целью обессоливания диализовали против дистиллированной воды и лиофильно высушивали.

Содержание меланина в среде культивирования определяли прямым фотометрированием культуральной жидкости после отделения мицелиальной массы грибов [4]. Общий выход рассчитывали как сумму меланина, экстрагированного из биомассы гриба (эндомеланины) и меланина, синтезированного грибом, в культуральной жидкости (экзомеланины).

Исследования влияния света на линейный рост, накопление биомассы и синтез меланина *I. obliquus* проводили с использованием экспериментальных установок. Эти установки обеспечивали генерацию как лазерного излучения (когерентный свет) с заданными параметрами (длина волн 476,0 нм — синий, 488,0 нм — синий, 514,0 нм — зеленый и 632,8 нм — красный, 720,0 нм — дальний красный), так и излучения источников некогерентного света (длина волн 660,0 нм — красный, 520,0 нм — зеленый, 430,0 нм — синий и 720,0 нм — дальний красный). Доза облучения составляла 230 мДж/см^2. На агаризованной среде облучение мицелия производили на чашках Петри. Далее, в стерильных условиях вырезали диски с облученным мицелием диаметром 5 мм. Их помещали в центр чашек Петри с агаризованной средой для изучения скорости линейного роста либо в ферментационные колбы с жидкой средой (по 15 дисков) для исследования синтеза биомассы и меланина.

Полученные результаты были обработаны статистически [9] с помощью 5-й версии программы Origin. В таблице и рисунках приведены средние статистически достоверные данные при 95%-й вероятности.

Результаты и обсуждение

Поскольку разные виды грибов отличаются по чувствительности к свету, при выборе режимов облучения (230 мДж/см^2) руководствовались данными, которые были получены нами и другими исследователями в процессе изучения фотобиологических реакций [10–16].

Изучение влияния света, полученного из разных источников, на рост и биосинтетическую активность *I. obliquus* показало, что наибольший эффект в данном случае наблюдался при облучении мицелия синим светом (таблица; рис. 1, 2). Облучение зеленым светом различного происхождения не оказывало достоверного влияния на рост гриба. В то же время облучение красным светом как в дальнем, так и ближнем диапазоне увеличивало скорость линейного роста и накопление биомассы. Причем дальний красный свет (720 нм) обладал большим стимулирующим эффектом, чем красный с длиной волн 632,8 нм (лазерный) и 660 нм (некогерентный) (таблица). Это отличает *I. obliquus* от каротинсодержащих грибов (*Candida guillermondii, Verticillium agaricinum* и *Puccinia graminis*) [17]. У *Candida guillermondii* облучение светом длиной волны 660 нм вызывало увеличение скорости деления дрожжевых клеток, у *Puccinia graminis* положительно влияло на прорастание уредоспор, а у *Verticillium agaricinum* — на каротинообразование. Последующее облучение светом 730 нм (дальним красным) полностью снимало указанные эффекты. Авторы рассматривают их как характерный признак каротинсодержа-

щих грибов. Отсутствие такой реакции у *I. obliquus* может свидетельствовать о существовании других механизмов фотобиологических реакций у этого вида. С другой стороны, положительная реакция гриба на облучение в синем и красном диапазоне длин волн говорит в пользу теории об одновременном существовании у меланинсодержащих грибов двух фоторецепторных систем: микохромной и с участием меланиновых пигментов.

Кроме того, следует отметить, что фотобиологический эффект облучения мицелия *I. obliquus* более четко выражен для процессов роста на жидкой среде (таблица). Аналогичные результаты мы получили ранее при изучении факторов стимуляции роста и биосинтетической активности у *Ganoderma lucidum* [18]. Этот факт еще раз свидетельствует о том, что при оценке роста грибов, в том числе и во время проведения скрининга по критерию скорости роста, недостаточно оценивать скорость линейного роста на твердых средах, поскольку этот показатель не учитывает густоту и высоту мицелия. Используя в качестве показателя роста гриба накопление им биомассы на жидких средах, можно более достоверно определить влияние какого-либо фактора на рост мицелия.

Анализ полученных результатов дает основания утверждать, что дальнейшая реализация фотобиологического эффекта в значительной степени зависит от условий существования гриба после облучения, в частности от способа культивирования. В наших исследованиях стимулирующий эффект, кроме облучения когерентным зеленым светом и некогерентным красным, был более значительным при глубинном культивировании. После облучения в одном режиме количество биомассы мицелия, выращенной на жидких средах одинакового состава, но при разных способах культивирования, существенно различалось (таблица).

Установлено, что облучение лазерным светом при всех исследованных диапазонах длин волн в большей степени способствовало росту, накоплению биомассы мицелия и меланина гриба, чем облучение некогерентным светом. При глубинном культивировании гриба облучение инокулюма когерентным светом примерно в 2 раза более эффективно по сравнению с некогерентным (таблица; рис. 1, 2).

Как правило, при оценке биохимического воздействия света принимают во внимание энергию светового кванта, интенсивность светового потока (количество квантов света на единицу площади в единицу времени), дозу, спектральный состав света. С этой точки зрения лазерные источники способны обеспечить, даже при низкой и средней интенсивности, спектральную густоту (энергию на одиночный частотный интервал), которая недоступна тепловым источникам.

Поэтому, учитывая, что когерентный и некогерентный свет одинаковой длины волны и дозы оказывает одинаковое воздействие на биологические объекты [13], с этими уникальными характеристиками лазерного света можно связать некоторые специфичные механизмы воздействия света на биологические объекты. Установлено,

Влияние света на рост мицелия *I. obliquus*

	Когерентный (лазерный) свет					Некогерентный свет (светодиоды)			
		514,0 нм (зеленый)	476,0 нм (синий)	488,0 нм (синий)	720 нм (дальний красный)	660,0 нм (красный)	520,0 нм (зеленый)	430,0 нм (синий)	720 нм (дальний красный)
Линейный рост на агаризованной среде									
% увеличения скорости роста	11,29± 0,55	6,18± 0,70	23,39± 1,10	26,61± 1,42	18,01± 1,71	10,75± 1,90	–0,70± 0,08	22,31± 1,78	10,22± |0,76
Поверхностный рост на жидкой среде (12 сут)									
% увеличения биомассы	11,10± 0,23	1,31± 0,07	32,22± 1,31	36,64± 1,84	18,62± 0,87	7,90± 0,33	1,81± 0,06	21,03± 0,74	14,22± 0,65
Рост при глубинном культивировании (12 сут)									
% увеличения биомассы	17,20± 0,78	2,15± 0,08	44,09± 1,98	56,99± 2,01	21,51± 1,03	9,68± 0,48	5,38± 0,23	23,66± 0,99	13,98± 0,34

что облучение посевного мицелия *I. obliquus* синим (430 нм, 476 нм и 480 нм) и красным (632,8 нм и 660 нм) светом при глубинном культивировании приводит к увеличению скорости роста культуры и накоплению биомассы гриба (рис. 1).

Полученные результаты позволяют 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. 2). Здесь можно отметить ту же тенденцию — облучение лазерным светом в значительно большей степени индуцировало синтез меланина, чем облуче-

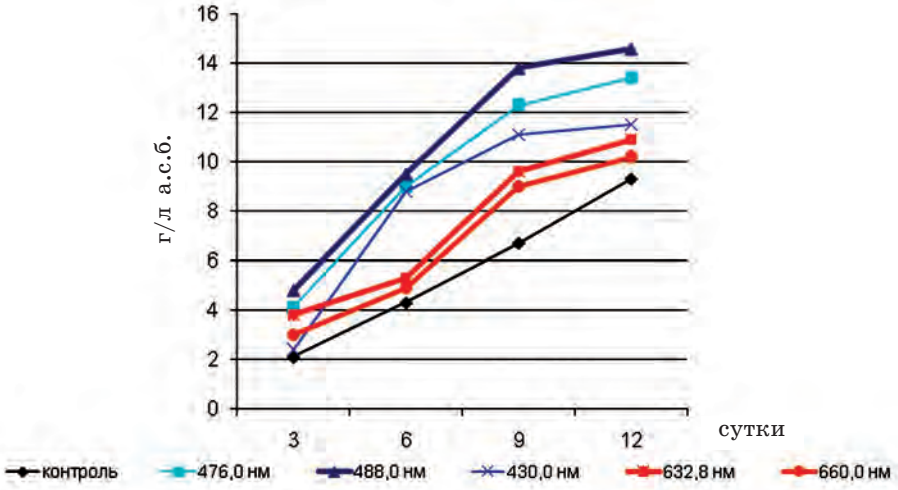

Рис. 1. **Динамика накопления биомассы *I. obliquis* при глубинном культивировании**

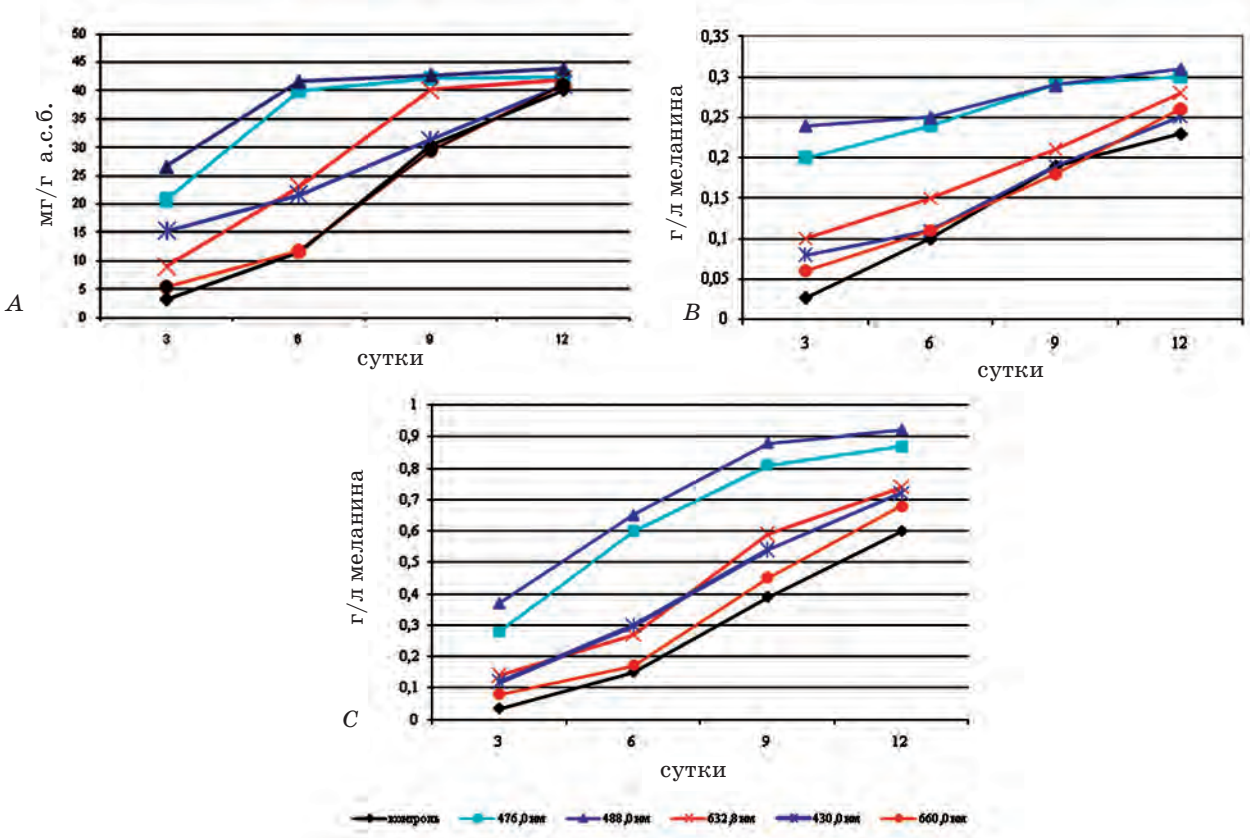

Рис. 2. **Динамика накопления меланина *I. obliquus* при глубинном культивировании:**
A — эндомеланин; *B* — экзомеланин; *C* — общий выход меланина

ние неполяризованным светом. Облучение гриба синим светом (476 и 488 нм) увеличивало количество синтезируемого грибом меланина на 43–54%. Изучение динамики накопления меланина показало, что его синтез достигает стационарной фазы после облучения лазерным светом в диапазоне 476–488 нм на 9-е сут, в то время как в контроле на 12-е сут культивирования переход в стационарную фазу не был отмечен.

Суммируя вышесказанное, можно утверждать, что использование на практике адаптационных возможностей меланинсодержащего гриба *I. obliquus*, его защитных свойств, проявляющихся в увеличении синтеза меланина в ответ на облучение видимым светом природы, позволит значительно интенсифицировать биотехнологические этапы получения биомассы и меланина этого ценного лекарственного гриба и увеличит выход конечного продукта.

Кроме того, изучение фотобиологических реакций грибов, накопление экспериментального материала по вопросам стимулирующего действия низкоинтенсивного облучения разной природы на их биосинтетическую активность приблизит нас к пониманию фундаментальных механизмов действия света на организм грибов.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Борщевская М. И., Васильева С. М.* Развитие представлений о биохимии и фармакологии меланиновых пигментов // Вопр. мед. химии. — 1999. — Т. 45, № 1. — С. 13–23.
2. *Курченко В. П., Кукулянская Т. А., Новиков Д. А.* Биохимическая фармакология грибных меланинов / Усп. мед. микологии: Мат. 2-го Всерос. конгр. по мед. микологии, Москва, 24–25 марта 2004. — С. 156–158.
3. *Wasser S. P., Weis A. L.* Medicinal properties of substances occurring in Higher Basidiomycetes mushrooms: a current perspectives (rewire) // Int. J. Med. Mushrooms. — 1999. — V. 1. — P. 31–62.
4. *Бабицкая В. Г. Щерба В. В.* Природа меланиновых пигментов некоторых микро- и макромицетов // Прикл. биохим. микробиол. — 2002. — Т. 38, № 3. — С. 286–291.
5. *Соломко Е. Ф., Ломберг М. Л., Митропольська Н. Ю., Чоловська Е. В.* Ріст окремих видів лікарських макроміцетів на живильних середовищах різного складу// Укр. ботан. журн. — 2000. — Т. 57, № 2. — С. 119–126.
6. *Методы* экспериментальной микологии: Справочник. — К.: Наук. думка, 1982. — 550 с.
7. *Гриффитс Э. и др.* Методы практической биохимии. — М.: Мир, 1978. — 384 с.
8. *Остерманн Л. А.* Хроматография белков и нуклеиновых кислот. — М.: Мир, 1985. — 257 с.
9. *Кокунин В. А.* Статистическая обработка данных при малом числе опытов // Укр. біохім. журн. — 1975. — Т. 47, № 6. — С. 776–790.
10. *Хорлин А. Я.* Методы исследования углеводов. — М.: Мир, 1975. — 313 с.
11. *Duand R.* Photomorphogenése d'un basidiomycéte Coprinus congreratus Bull. Ex Fr.: influences de variations quantatives et qualitatives de la lumiére sur les phases successives du développement des carpophores. Analyse du phenoméne du photoreception // Thése doct. Sci. boil. Lyon: Univ. Claude-Bernard, 1975. — 116 p.
12. *Кару Т. Й.* О молекулярном механизме терапевтического действия низкоинтенсивного лазерного света // ДАН СССР. — 1986. — Т. 291, № 5. — С. 1245–1249.
13. *Ляндрес И. Г.* Механизмы биостимуляции низкоинтенсивного лазерного излучения. — Минск: 1998. — 207 с.
14. *Poyedinok N. L., Potemkina J. V. et al.* Stimulation with low-intensity laser light of basidiospore germination and growth of monocaryotic isolates in Medicinal Mushroom *Hericium erinaceus* (Bull.: Fr.) Pers. (Aphyllophoromycetideae) // Int. J. Med. Mushrooms. — 2000. — V. 2, N 4. — P. 339–342.
15. *Poyedinok N. L., Buchalo A. S., Potemkina J. V. et al.* The Action of Argon and Helium-Neon Laser Radiation on Growth and Fructification of Culinary-Medicinal Mushrooms *Pleurotus ostereatus*, *Lentinus edodes* and *Hericium erinaceus* // Ibid. — 2003. — V. 3, N 4. — P. 251–257.
16. *Поединок Н. Л., Негрейко А. М.* Использование лазерного света при культивировании некоторых видов съедобных грибов // Биотехнология. — 2003. — № 3. — С. 66–78.
17. *Жданова Н. Н., Василевская А. И.* Экстремальная экология грибов в природе и эксперименте. — К.: Наук. думка, 1982. — 168 с.
18. *Poyedinok N. L., Potemkina J. V., Negriyko A. M. et al.* Light Regulation of Growth and Biosynthetic Activity of Ling Zhi or Reishi of Medicinal Mushroom *Ganoderma lucidum* (W.Curt.: Fr.) P. Karst. (Aphyllophoromycetideae) in Pure Culture // Int. J. Med. Mushrooms. — 2008. — V. 10, N 4. — P. 368–378.

СВІТЛОВЕ РЕГУЛЮВАННЯ РОСТУ ТА МЕЛАНІНОУТВОРЕННЯ В *Inonotus obliquus* (Pers.) Pilat

Н. Л. Поєдинок

Інститут ботаніки ім. Н. Г. Холодного
НАН України,
Київ

E-mail: poyedinok@ukr.net

Метою роботи було вивчення можливості використання різних джерел світла низької інтенсивності для регуляції росту міцелію та синтезу меланіну лікарським грибом *Inonotus obliquus* (Pers.) Pilat.

Дослідження впливу світла на лінійний ріст, накопичення біомаси і синтез меланіну *I. obliquus* проводили з використанням експериментальних установок, які забезпечували генерацію як лазерного випромінювання (когерентне світло) із заданими параметрами, так і випромінювання джерел некогерентного світла. Показано, що найбільший стимулювальний ефект мав місце за опромінення міцелію синім світлом. Встановлено, що подальша реалізація фотобіологічних ефектів значною мірою залежить від способу культивування. Опромінення лазерним світлом за всіх досліджених діапазонів довжин хвиль більшою мірою сприяло росту, накопиченню біомаси та меланіну в міцелії гриба, ніж опромінення некогерентним світлом у тому самому діапазоні довжин хвиль. Світлова обробка дала змогу істотно скоротити тривалість ферментації.

Результати досліджень дають підстави розглядати низькоінтенсивне світло у видимій частині спектра як перспективний регулятор росту і біосинтетичної активності *I. obliquus* у біотехнології його культивування.

Ключові слова: *Inonotus obliquus*, меланін, фотобіологічний ефект, лазерне світло, некогерентне світло.

LIGHT REGULATION OF GROWTH AND MELANIN FORMATION IN *Inonotus obliquus* (Pers.) Pilat

N. L. Poyedinok

Kholodny Institute of Botany
of National Academy of Sciences of Ukraine,
Kyiv

E-mail: poyedinok@ukr.net

The study aims to investigate possibilities of using different sources of low-intensity light for the regulation of mycelium growth and melanin synthesis by medicinal mushroom *Inonotus obliquus* (Pers.) Pilat.

Studies of the light's influence on the linear growth, biomass accumulation and melanin synthesis *I. obliquus* were performed using experimental installations that provide both lasing (coherent light) with specified parameters, as well as sources of incoherent light. It has been demonstrated that the greatest stimulating effect took place during the irradiation of mycelium with blue light. It has been found that further realization of photobiological effect is largely dependent on the method of cultivation. Irradiation with laser light within all studied wavelength ranges was more conducive to growth, biomass and melanin accumulation in the mushroom mycelium than incoherent light irradiation within the same wavelength range. Light treatment made it possible to significantly reduce the duration of fermentation.

The results of studies allow considering low-intensity light in the visible part of the spectrum as a perspective growth and biosynthetic activity regulator of *I. obliquus* in the biotechnology of its cultivation.

Key words: *Inonotus obliquus*, melanin, photobiological effect, laser light, incoherent light.