
БИОТЕХНОЛОГИЯ И МИКРОБИОЛОГИЯ

BIOTECHNOLOGY AND MICROBIOLOGY

УДК 579.222.3

ВЛИЯНИЕ ТЕМПЕРАТУРЫ НА РОСТ КУЛЬТУРЫ ДРОЖЖЕЙ *DOTHIORA* sp. БИМ Y-383 И СИНТЕЗ МЕЛАНИНА

Е. А. ГРИБАНОВА¹⁾, В. П. КУРЧЕНКО¹⁾,
И. И. АЗАРКО¹⁾, В. Е. МЯМИН¹⁾

¹⁾Белорусский государственный университет,
пр. Независимости, 4, 220030, г. Минск, Беларусь

Аннотация. Исследовано влияние температур 10; 18; 22; 28; 32 и 37 °С на рост дрожжей *Dothiora* sp. БИМ Y-383 в течение 16 сут культивирования. Показано, что дрожжи относятся к психротолерантным микроорганизмам с оптимальным ростом культуры и синтезом меланина при 22–28 °С. Наиболее интенсивно процесс меланиногенеза происходит на стадии отмирания культуры дрожжей. С использованием спектральных методов анализа установлено, что на 16-е сутки культивирования содержание меланина в экстрактах из сублимированного мицелия дрожжей, выращенных при температурах 10; 18; 22; 28 и 32 °С, составило (23,0 ± 0,5) мг/г, (39,0 ± 0,8) мг/г, (62,3 ± 1,2) мг/г, (69,0 ± 1,4) мг/г и (45,1 ± 0,9) мг/г соответственно.

Ключевые слова: меланин; электронный парамагнитный резонанс; ЭПР; электронная спектроскопия; *Dothiora* sp.; меланиногенез.

Благодарность. Работа выполнена при финансовой поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (проект «Производство биологически активных веществ психрофильными дрожжами, выделенными из образцов почв Восточной Антарктиды», № гос. регистрации 20231168), а также в рамках государственной программы научных исследований «Конвергенция-2025» (задание 2.2.02.3).

Образец цитирования:

Грибанова ЕА, Курченко ВП, Азарко ИИ, Мямин ВЕ. Влияние температуры на рост культуры дрожжей *Dothiora* sp. БИМ Y-383 и синтез меланина. *Экспериментальная биология и биотехнология*. 2025;3:74–87.
EDN: LZTBJC

For citation:

Gribanova EA, Kurchenko VP, Azarko II, Miamin VE. Influence of temperature on the growth of *Dothiora* sp. BIM Y-383 yeast culture and melanin synthesis. *Experimental Biology and Biotechnology*. 2025;3:74–87. Russian.
EDN: LZTBJC

Сведения об авторах см. на с. 87.

Information about the authors see p. 87.

INFLUENCE OF TEMPERATURE ON THE GROWTH OF *DOTHIORA* sp. BIM Y-383 YEAST CULTURE AND MELANIN SYNTHESIS

E. A. GRIBANOVA^a, V. P. KURCHENKO^a,
I. I. AZARKO^a, V. E. MIAMIN^a

^aBelarusian State University, 4 Niezaliezhnasci Avenue, Minsk 220030, Belarus

Corresponding author: E. A. Gribanova (gribanova@bsu.by)

Abstract. The effect of temperatures of 10; 18; 22; 28; 32 and 37 °C on the growth of *Dothiora* sp. BIM Y-383 yeast over 16 days of cultivation was studied. The yeast was shown to be psychrotolerant microorganisms with optimal culture growth and melanin synthesis at 22–28 °C. Melaninogenesis is most intense during the yeast culture death stage. Using spectral methods of analysis, it was established that on the 16th day of cultivation, the melanin content in extracts from freeze-dried yeast mycelium grown at temperatures of 10; 18; 22; 28 and 32 °C was (23.0 ± 0.5) mg/g, (39.0 ± 0.8) mg/g, (62.3 ± 1.2) mg/g, (69.0 ± 1.4) mg/g and (45.1 ± 0.9) mg/g, respectively.

Keywords: melanin; electron paramagnetic resonance; EPR; electron spectroscopy; *Dothiora* sp.; melaninogenesis.

Acknowledgements. This work was carried out with financial support from the Belarusian Republican Foundation for Fundamental Research (project «Production of biologically active substances by psychrophilic yeast isolated from soil samples of East Antarctica», state registration No. 20231168), as well as within the framework of the state programme of scientific research «Convergence-2025» (assignment 2.2.02.3).

Введение

Антарктида находится в одной из наиболее суровых климатических зон планеты. Низкие температуры, минимальные годовые осадки, регулярные циклы замерзания и оттаивания, сильные ветры, высокий уровень ультрафиолетового излучения, наличие процессов сублимации и испарения, дефицит питательных веществ – все эти условия являются значительными ограничивающими факторами для поддержания жизнедеятельности организмов [1; 2]. К защитным механизмам, которые помогают организмам сохранять метаболическую активность при низких температурах, относится синтез криопротекторов, ферментов, активных при низких температурах, и фотозащитных веществ (каротиноидов, микоспоринов, меланинов), а также высокое содержание полиненасыщенных жирных кислот в составе цитоплазматических мембран [3–7].

В Антарктиде были обнаружены и описаны дрожжи черного цвета, представляющие собой полифилетическую морфоэкологическую группу грибов, которые относятся либо к порядку Chaetothyriales из класса Eurotiomycetes, либо к классу Dothideomycetes (отдел Ascomycota, подотдел Pezizomycotina) [8]. Класс аскомицетов Dothideomycetes более многочисленный: он насчитывает около 19 000 видов, которые встречаются по всему миру в наземных, пресноводных и морских местообитаниях. Представители данного класса являются симбиотрофами, сапробионтами, фитопатогенами, микопаразитами, эпифитами, эндофитами, эктофитами. Они могут обитать на различных субстратах (например, на поверхности горных пород) и выдерживать экстремальные климатические условия [9]. Так, грибы рода *Dothiora* были выделены из образцов темного льда Гренландского ледникового щита [10] и песчаника из долины Алатна (Антарктида) [9]. Одним из ключевых факторов, обеспечивающих защиту этих микроорганизмов от экстремальных условий окружающей среды, является способность синтезировать меланины.

Меланины – это темно-коричневые либо черные пигменты полимерной природы, образующиеся в результате окисления фенольных и (или) индольных соединений. Данные пигменты широко распространены в организмах животных, растений и микроорганизмов. По химическому строению они классифицируются на феомеланин, зумеланин, пиомеланин и др. На рис. 1 представлены структурные формулы возможных мономеров этих меланинов. Для сравнения приведена известная структурная формула синтетического меланина, полученного путем ферментативного окисления L-3,4-дигидроксифенилаланина (L-ДОФА). Как следует из рис. 1, меланины также могут различаться по степени ароматизации молекул и содержанию функциональных групп. Структурные отличия и строение меланинов разного происхождения оказывают влияние на их спектральные свойства [11].

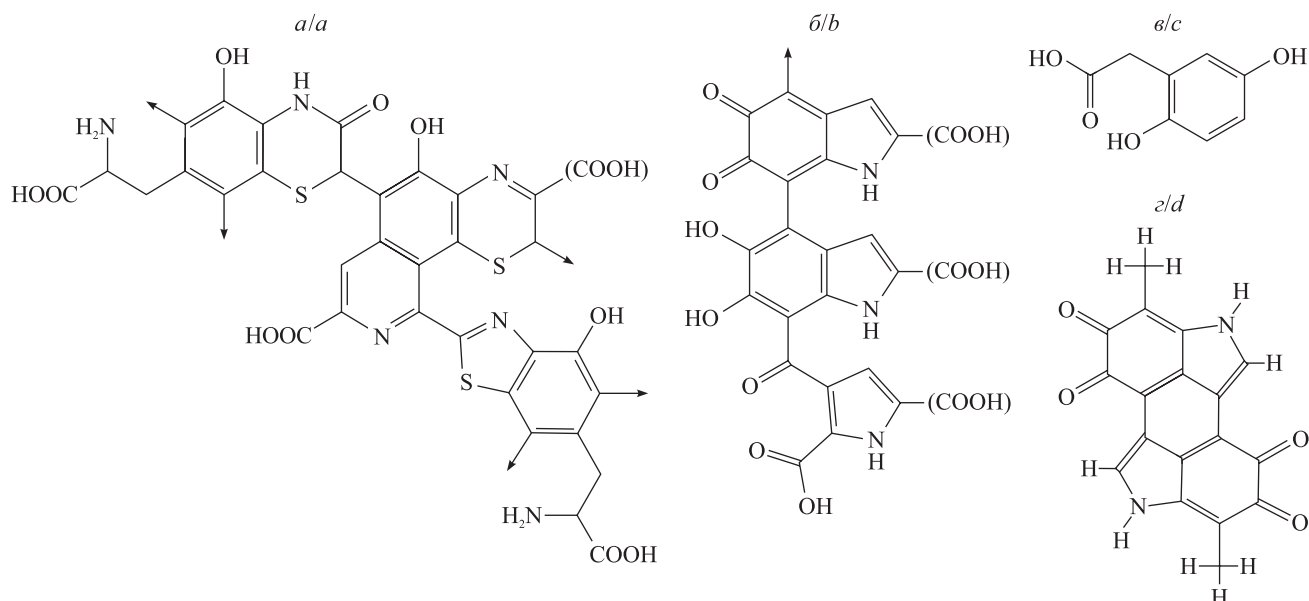


Рис. 1. Структурные формулы возможных мономеров феомеланина (а), зумеланина (б), пиомеланина (в) и синтетического меланина (г).
Источник: https://www.chemicalbook.com/productchemicalpropertiescb9324024_en.htm

Fig. 1. Structural formulas of possible monomers of pheomelanin (a), eumelanin (b), pyromelanin (c) and synthetic melanin (d).
Source: https://www.chemicalbook.com/productchemicalpropertiescb9324024_en.htm

Большое количество типов меланинов, синтезируемых грибами, указывает на сложные адаптивные механизмы и разнообразие биохимических путей синтеза этих пигментов. Будучи гетерогенными полифенолами, они обладают уникальными свойствами, такими как широкополосное оптическое поглощение, парамагнетизм, перенос заряда и высокая структурная стабильность [11; 12].

Широкий спектр биологической активности меланина (антиоксидантная, противоопухолевая, противовоспалительная, антивирусная, гепатопротекторная и радиопротекторная активность [13]) делает актуальным поиск штаммов меланизированных грибов в качестве источника получения меланина для практического использования в медицине, фармакологии, косметологии и других областях.

Исследованные в рамках настоящей работы черные дрожжи *Dothiora* sp. БИМ Y-383 были отобраны полярниками белорусских антарктических экспедиций из образцов мелкозема, собранного на участке Вечерний оазиса Холмы Тала (Восточная Антарктида) [14]. Климат данного региона характеризуется сверхнизкими температурами зимой (длится более 6 мес.), высоким уровнем ультрафиолетовой радиации, а также сильными стоковыми ветрами со скоростью более 60 м/с [15].

Для получения меланина из используемого штамма дрожжей требовалось исследовать процесс меланиногенеза в ходе его культивирования при различных температурах. Вне зависимости от источника получения для меланинов характерны генерализованное поглощение в диапазоне длин волн 220–460 нм и высокое содержание парамагнитных центров благодаря конденсированной структуре ароматических соединений [11; 16; 17].

В связи с вышеизложенным цель настоящей работы заключалась в том, чтобы с использованием методов электронной спектроскопии и электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) исследовать влияние температуры культивирования на синтез меланина дрожжами *Dothiora* sp. БИМ Y-383.

Материалы и методы исследования

Объектом исследования выступал штамм дрожжей *Dothiora* sp. БИМ Y-383, который был выделен из образца мелкозема, собранного на участке Вечерний оазиса Холмы Тала. Чистую культуру сохраняли путем консервирования в 20 % растворе глицерина и буфера PBS при температуре –70 °C [14; 18]. Штамм депонирован в Белорусскую коллекцию непатогенных микроорганизмов Института микробиологии НАН Беларуси. Нуклеотидная последовательность фрагмента гена 18S рРНК депонирована в базу данных GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/) с присвоением идентификационного номера PP832938 [14; 19; 20].

Культивирование дрожжей *Dothiora* sp. БИМ Y-383. Культуру дрожжей, выращенную до стационарной фазы роста, высевали на поверхность агаризованной среды Сабуро¹ и культивировали при температурах 10; 18; 22; 28; 32 и 37 °С. Учет результатов роста дрожжей проводили на 16-е сутки. Мицелий дрожжей снимали с агаризованной среды, замораживали при температуре –20 °С и сублимировали в вакуумной камере установки LyoAlfa-15 (*Telstar Technologies*, Испания) при давлении 0,8 мбар и температуре –85 °С в течение 24 ч. Используя гравиметрический метод, измеряли выход биомассы сублимированного мицелия² [17] на 16-е сутки культивирования при температурах 10; 18; 22; 28; 32 и 37 °С.

Микроскопические исследования. Окрашивание живых препаратов проводили метиленовым синим. Фотографии клеток делали с помощью светового микроскопа «Микромед-1» (модель 3–20 inf.) (Китай) и программного обеспечения *ToupView* при увеличении объектива ×100, числовой апертуре 1,25 (масляная иммерсия), увеличении окуляра ×10.

Экстракция меланина. В целях проведения спектральных исследований получали экстракты из образцов сублимированного мицелия. Экстракцию проводили из 1 г мицелия 10 мл 1 н. раствора NaOH при температуре 20 °С в течение 24 ч. Полученный экстракт сублимировали и взвешивали. Нерастворенную часть мицелия отделяли центрифугированием в течение 10 мин при 10 000 об/мин на приборе Sigma 3-30K (*Sigma Laborzentrifugen*, Германия), промывали водой и сублимировали [11; 17; 21].

Для выделения меланина из сублимированного мицелия дрожжей и его очистки проводили щелочную экстракцию. Из щелочного экстракта меланин осаждали 0,1 моль/л HCl, доводя раствор до pH 2. Образовавшийся хлопьевидный осадок коричневого цвета отделяли центрифугированием в течение 10 мин при 10 000 об/мин, промывали водой до достижения pH 7, сублимировали и использовали для определения парамагнитных свойств пигмента, а также снятия электронных спектров [11; 17; 21].

Спектрофотометрический анализ. Спектры поглощения полученных экстрактов из сублимированного мицелия и щелочных растворов синтетического меланина (M8631; *Sigma-Aldrich*, Великобритания) регистрировали с использованием спектрофотометра UV-VIS PB 2201 (ЗАО «СОЛАР», Беларусь) в диапазоне длин волн 200–800 нм [17; 22].

ЭПР-спектроскопия. Исследования ЭПР проводили на стационарном спектрометре SE/X-2543 (*Radiopan*, Польша) в X-диапазоне с частотой модуляции поляризующего магнитного поля 100 кГц и амплитудой модуляции от 0,05 до 0,50 мТл при комнатной температуре. Для контроля добротности резонатора и настройки фазы использовали кристалл рубина, закрепленный в резонаторе. Образцы располагали в центре резонатора в пучности магнитной компоненты СВЧ-поля. Индукцию постоянного магнитного поля измеряли датчиком ядерного магнитного резонанса, а частоту сверхвысокочастотного электромагнитного излучения – частотомером. Максимальная мощность СВЧ-излучения в резонаторе составляла 200 мВт. Кинетику насыщения сигнала ЭПР исследовали в диапазоне изменения мощности СВЧ-излучения от 0,5 до 30,0 дБ. По результатам ЭПР-спектрометрии рассчитывали количество парамагнитных центров (число спинов на грамм) в образцах сублимированного мицелия дрожжей, в осадках, образовавшихся после экстракции меланина, а также в образцах синтетического меланина и выделенного из мицелия дрожжей *Dothiora* sp. БИМ Y-383 меланина [11]. Полученные данные спектров обрабатывали с использованием программ *Excel 2016* и *Origin* (версия 8.6).

Статистическая обработка. Статистическую обработку результатов осуществляли в программе *Excel 2016*. Полученные данные представляли в виде средних арифметических значений со стандартным отклонением.

Результаты и их обсуждение

Дрожжи *Dothiora* sp. БИМ Y-383 относятся к отделу Ascomycota, представители которого способны к формированию мицелия [9]. Визуальная оценка роста дрожжей и их микроскопические исследования показали, что на начальных этапах экспоненциального роста происходило образование одноклеточных дрожжей, размножающихся почкованием. Переход в стадию стационарного роста, а затем и в стадию отмирания сопровождался формированием плотной структуры мицелия. Этот процесс описывает способность грибов существовать в двух морфологических формах – мицелиальной (нитевидной) и дрожжевой

¹Использовалась «Питательная среда № 2 ГРМ (Сабуро)» (Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии, Россия), в ее состав входят панкреатический гидролизат рыбной муки (10 г/л), панкреатический гидролизат казеина (10 г/л), дрожжевой экстракт (2 г/л), натрий фосфорнокислый однозамещенный 2-водный (2 г/л), D-глюкоза (40 г/л), агар бактериологический ((10 ± 3) г/л).

²ОФС.1.2.1.0010.15. Потеря в массе при высушивании // Фармакопоея.рф : сайт. URL: <https://pharmacopoeia.ru/ofs-1-2-1-0010-15-poterya-v-masse-pri-vysushivanii/> (дата обращения: 28.07.2025).

(одноклеточной). Мицелиальная форма состоит из ветвящихся нитей (гифов), которые обеспечивают питание, а дрожжевая – из одиночных шаровидных или овальных клеток, размножающихся почкованием [23].

Следует отметить, что увеличение температуры культивирования приводило к сокращению периода одноклеточной стадии роста. Так, при 18 °С этот период длился вплоть до 9 сут, при 22 °С – до 6 сут, а при 28 °С был минимальным и составлял 3 сут. Это обстоятельство свидетельствует о температурно-зависимом диморфизме исследуемых микроорганизмов (рис. 2).

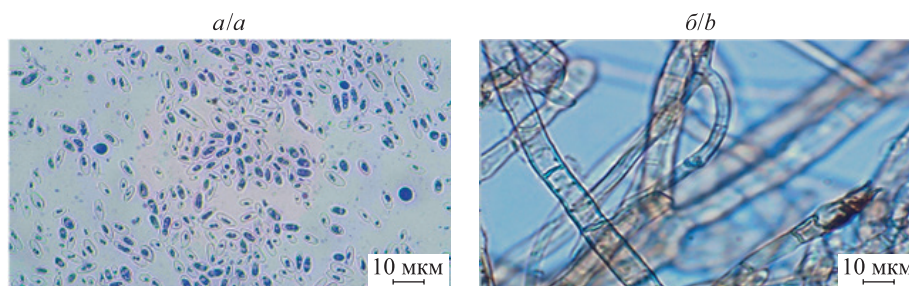


Рис. 2. Микрофотографии дрожжей *Dothiora* sp. БИМ Y-383, выращенных при температуре 28 °С: а – дрожжевая форма (24-й час культивирования); б – мицелиальная форма (144-й час культивирования)

Fig. 2. Micrographs of yeast *Dothiora* sp. BIM Y-383 grown at a temperature of 28 °C: а – yeast form (24th hour of cultivation); б – mycelial form (144th hour of cultivation)

Таким образом, переход от одноклеточной к нитевидной форме у дрожжей *Dothiora* sp. БИМ Y-383 зависит от времени и температуры культивирования. Для анализа влияния этих параметров на рост дрожжей *Dothiora* sp. БИМ Y-383, культивируемых на поверхности агаризованной среды Сабуро в течение 16 сут при температурах 10; 18; 22; 28; 32 и 37 °С, были определены морфологические особенности образования мицелия, выход его биомассы и изучен процесс биосинтеза меланина.

На рис. 3 представлены фотографии роста дрожжей *Dothiora* sp. БИМ Y-383 на 3-и, 6-е, 9-е, 12-е и 16-е сутки культивирования при температурах 10; 18; 22; 28; 32 и 37 °С.

В ходе визуальной оценки роста дрожжей *Dothiora* sp. БИМ Y-383 было определено, что при температурах культивирования 10 и 32 °С рост культуры и синтез пигмента существенно замедлены, а при температуре культивирования 37 °С отмечено полное отсутствие роста культуры. Образцы, культивируемые при температурах 18; 22; 28 и 32 °С, демонстрировали различные стадии роста культуры во времени. Так, начало стационарной фазы роста, при которой происходит синтез пигмента и мицелий приобретает светло-коричневый цвет, при температуре 22 °С приходится на 6-е сутки, при температуре 28 °С – на 9-е сутки, при температуре 18 °С – на 12-е сутки, а при температуре 32 °С – на 16-е сутки культивирования. Кроме того, на 16-е сутки культивирования при температурах 22 и 28 °С наблюдалось формирование плотной структуры мицелия от темно-коричневого до черного цвета, что, предположительно, связано с активным спороношением дрожжей, переходом культуры к стадии отмирания и, соответственно, максимальным накоплением пигмента. Следует отметить, что при температуре 10 °С большая часть биомассы дрожжей на 16-е сутки культивирования оставалась неокрашенной.

Таким образом, рост дрожжей *Dothiora* sp. БИМ Y-383 в широком диапазоне температур (10–32 °С) позволяет отнести их к группе психротолерантных микроорганизмов с факультативным синтезом пигмента. Оптимальным для роста культуры и синтеза пигмента является диапазон температур 22–28 °С.

Для проведения последующих гравиметрических исследований влияния температуры культивирования на увеличение биомассы дрожжей *Dothiora* sp. БИМ Y-383 их мицелий был снят с чашек Петри и сублимирован. На рис. 4 представлена поверхностная диаграмма, отражающая трехмерную зависимость прироста биомассы сублимированного мицелия дрожжей *Dothiora* sp. БИМ Y-383 от времени и температуры культивирования. Область минимальных значений биомассы приходится на 3-и сутки культивирования: при температурах 18; 22 и 28 °С выход биомассы мицелия составлял $(0,108 \pm 0,031)$ г, $(0,203 \pm 0,024)$ г и $(0,111 \pm 0,027)$ г соответственно. Область же максимальных значений биомассы мицелия (в диапазоне 0,3–0,4 г) приходится на 6–9-е сутки культивирования при температурах 22 и 28 °С.

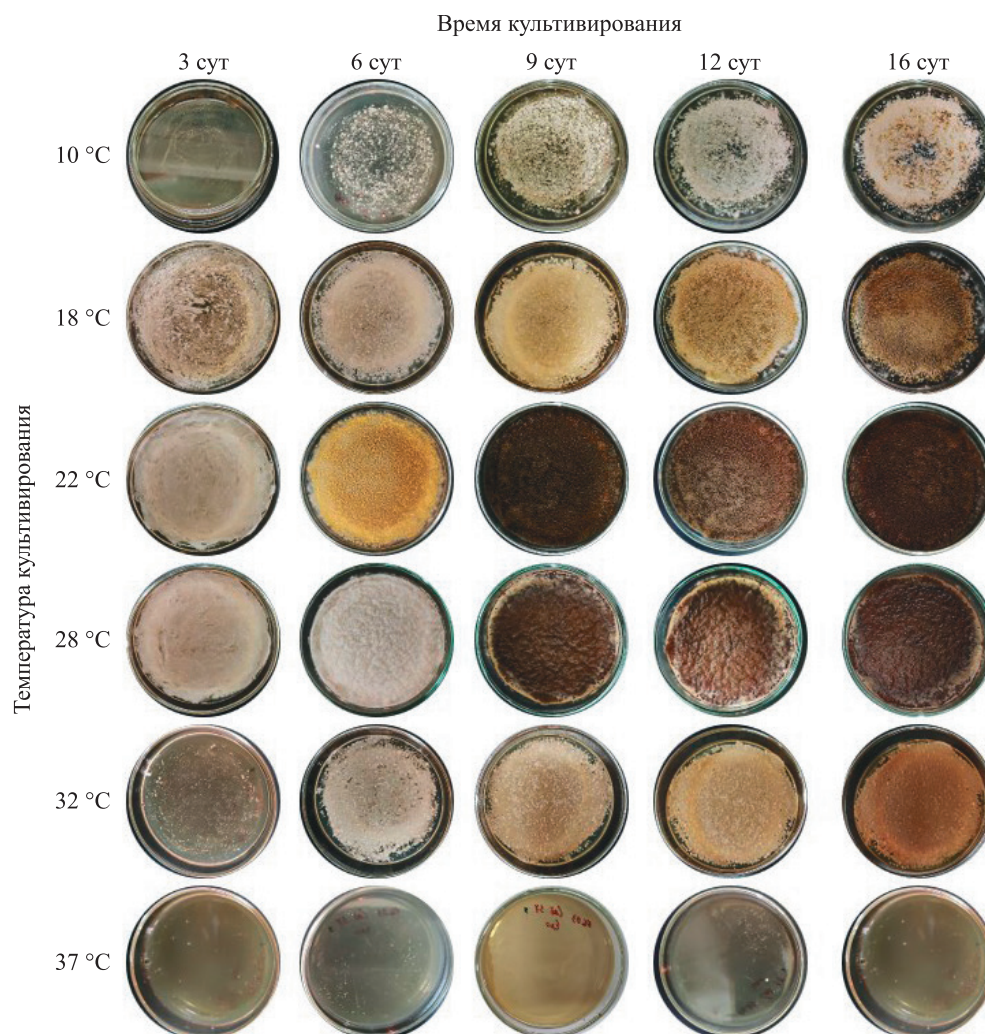


Рис. 3. Фотографии роста дрожжей *Dothiora* sp. БИМ Y-383 на 3-и, 6-е, 9-е, 12-е и 16-е сутки культивирования при температурах 10; 18; 22; 28; 32 и 37 °C

Fig. 3. Photographs of the growth of *Dothiora* sp. BIM Y-383 yeast on 3rd, 6th, 9th, 12th and 16th days of cultivation at temperatures of 10; 18; 22; 28; 32 and 37 °C

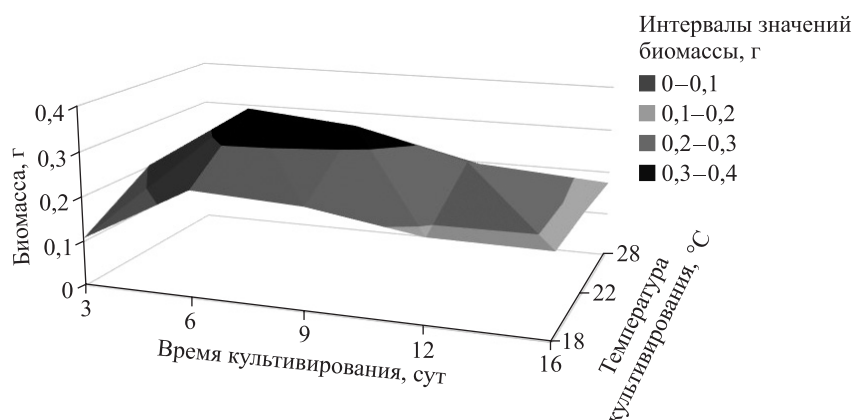


Рис. 4. Поверхностная диаграмма зависимости прироста биомассы сублимированного мицелия дрожжей *Dothiora* sp. БИМ Y-383 от времени и температуры культивирования

Fig. 4. Surface diagram of the dependence of the biomass increase of freeze-dried mycelium of *Dothiora* sp. BIM Y-383 yeast on cultivation time and temperature

Исходя из гравиметрических измерений, на 6–9-е сутки культивирования в диапазоне температур 18–28 °С приходится стадия стационарного роста. Уменьшение массы мицелия подтверждает, что на 16-е сутки эксперимента культура переходит к стадии отмирания. Эти данные согласуются с предварительной визуальной оценкой роста дрожжей.

Как показано ранее, при культивировании дрожжей *Dothiora* sp. БИМ Y-383 на плотной питательной среде происходит синтез пигмента темно-коричневого цвета. Для его идентификации исследованы спектральные свойства пигмента, который был выделен из сублимированного мицелия дрожжей, культивируемых при температуре 28 °С в течение 16 сут. Следует отметить, что среди природных биополимеров только меланины проявляют парамагнитные свойства вне зависимости от их происхождения и структурных особенностей [11], при этом отличительной характеристикой является форма спектров, средняя между лоренцевой и гауссовой формами. Эти наблюдения подтверждаются результатами исследования ЭПР пигмента, выделенного из сублимированного мицелия дрожжей *Dothiora* sp. БИМ Y-383. Для сравнения на рис. 5 представлены спектры ЭПР синтетического меланина (см. рис. 5, кривая 1) и выделенного из мицелия дрожжей пигмента (см. рис. 5, кривая 2), которые указывают на их меланиновый характер [11].

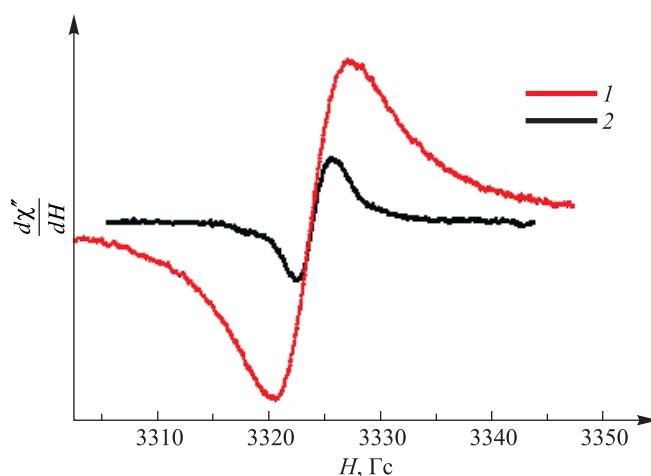


Рис. 5. Спектры ЭПР образцов синтетического меланина (1) и выделенного из мицелия дрожжей *Dothiora* sp. БИМ Y-383 пигмента (2)
Fig. 5. Electron paramagnetic resonance spectra of synthetic melanin samples (1) and pigment isolated from the mycelium of *Dothiora* sp. BIM Y-383 yeast (2)

Необходимо отметить, что содержание парамагнитных центров в выделенном из мицелия дрожжей *Dothiora* sp. БИМ Y-383 меланине и синтетическом меланине различается на порядок и составляет $1,2 \cdot 10^{18}$ и $1,2 \cdot 10^{19}$ спинов на грамм соответственно.

Спектральные свойства меланинов ввиду их сложной ароматической структуры проявляются в широком и непрерывном поглощении света в видимой и ультрафиолетовой областях с характерными наклонными спектральных кривых в диапазоне длин волн 400–600 нм, что позволяет эффективно поглощать ультрафиолетовые лучи и защищать клетки от повреждений [17; 24; 25].

На рис. 6 представлены спектры поглощения синтетического меланина и выделенного из мицелия дрожжей *Dothiora* sp. БИМ Y-383 меланина. Оба пигмента имеют характерный нисходящий спектральный профиль.

При одинаковом содержании в растворе синтетического меланина и выделенного из мицелия дрожжей *Dothiora* sp. БИМ Y-383 меланина их спектры различаются интенсивностью поглощения при длине волны 460 нм, характерной для меланиновых пигментов. Для синтетического меланина оптическая плотность при длине волны 460 нм составила примерно 0,187, а для выделенного из дрожжевого мицелия меланина – 0,044. Низкая оптическая плотность выделенного из мицелия дрожжей *Dothiora* sp. БИМ Y-383 меланина свидетельствует о его структурных отличиях от синтетического меланина, в котором содержится большое количество функциональных групп (см. рис. 1). Таким образом, показано, что синтезируемый дрожжами *Dothiora* sp. БИМ Y-383 пигмент является меланином и для исследования процесса меланиногенеза можно использовать спектральные методы анализа.

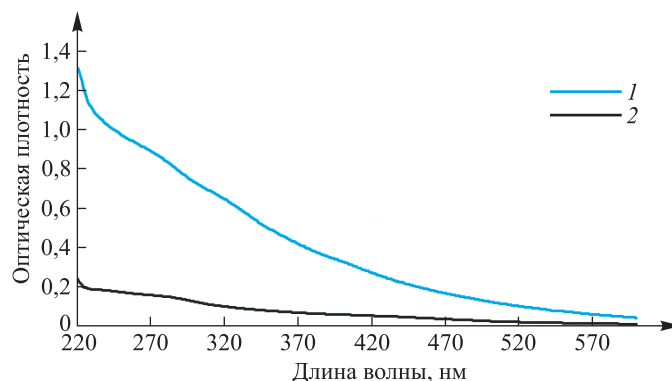


Рис. 6. Спектры поглощения синтетического меланина в концентрации 0,03 мг/мл (1) и выделенного из мицелия дрожжей *Dothiora* sp. БИМ Y-383 меланина в концентрации 0,03 мг/мл (2)

Fig. 6. Absorption spectra of synthetic melanin at a concentration of 0.03 mg/mL (1) and melanin isolated from the mycelium of *Dothiora* sp. BIM Y-383 yeast at a concentration of 0.03 mg/mL (2)

Из рис. 4 видно, что время и температура культивирования влияют и на рост дрожжей *Dothiora* sp. БИМ Y-383, и на синтез пигмента. Чтобы оценить влияние температуры культивирования на рост дрожжей *Dothiora* sp. БИМ Y-383 и синтез меланина, на 16-е сутки эксперимента были сделаны фотографии культур, выросших на чашках Петри при температурах 10; 18; 22; 28; 32 и 37 °C (рис. 7, а), и фотографии соответствующих им образцов сублимированного мицелия (рис. 7, б). Как следует из рис. 7, б, при изменении температуры культивирования цвет сублимированного мицелия меняется от светло-бежевого до черного, что свидетельствует о накоплении в нем меланина в разных количествах.



Рис. 7. Морфологические особенности роста дрожжей *Dothiora* sp. БИМ Y-383 на 16-е сутки культивирования при температурах 10; 18; 22; 28; 32 и 37 °C:
а – фотографии роста дрожжей на чашках Петри;
б – фотографии сублимированной биомассы дрожжей

Fig. 7. Morphological features of the growth of *Dothiora* sp. BIM Y-383 yeast on the 16th day of cultivation at temperatures of 10; 18; 22; 28; 32 and 37 °C:
a – photographs of yeast growing on Petri dishes;
b – photographs of freeze-dried yeast biomass

Результаты гравиметрических исследований, представленные на рис. 8, показывают, что при увеличении температуры культивирования до 28 °C на 16-е сутки эксперимента выход биомассы сублимированного мицелия возрастает до $(0,25 \pm 0,03)$ г (см. рис. 8, кривая 1). Культивирование дрожжей как при более низких, так и при более высоких температурах приводит к уменьшению выхода биомассы мицелия.

Для оценки количественного содержания меланина в мицелии дрожжей *Dothiora* sp. БИМ Y-383 были исследованы спектральные свойства пигмента, экстрагированного из сублимированной биомассы дрожжей. Необходимо отметить, что полученный после экстракции меланина осадок мицелия имел черный цвет, свидетельствующий о возможном ковалентном взаимодействии пигмента с хитином

клеточных стенок дрожжей. Из представленной на рис. 8 температурной зависимости выхода экстракта из сублимированного мицелия видно, что с увеличением температуры культивирования на 16-е сутки эксперимента количество экстрагированных веществ уменьшается (см. рис. 8, кривая 2).

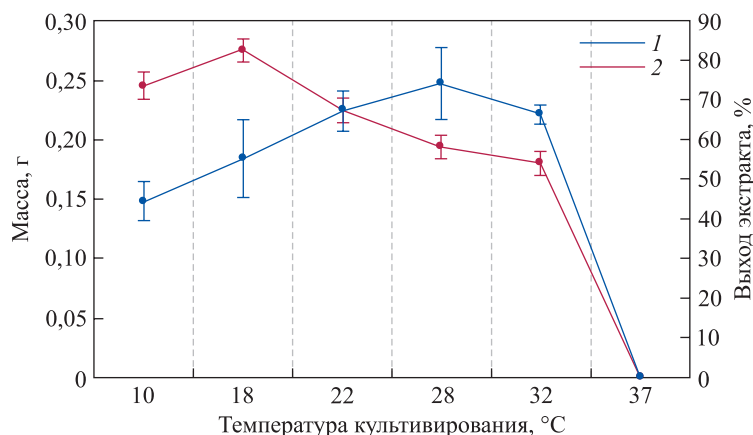


Рис. 8. Масса сублимированного мицелия дрожжей *Dothiora* sp. БИМ Y-383 (1) и выход экстракта из сублимированного мицелия дрожжей *Dothiora* sp. БИМ Y-383 (2) на 16-е сутки культивирования при температурах 10; 18; 22; 28; 32 и 37 °C

Fig. 8. Mass of freeze-dried mycelium of *Dothiora* sp. BIM Y-383 yeast (1) and yield of extract from freeze-dried mycelium of *Dothiora* sp. BIM Y-383 yeast (2) on the 16th day of cultivation at temperatures of 10; 18; 22; 28; 32 and 37 °C

Спектральные исследования биосинтеза меланина дрожжами *Dothiora* sp. БИМ Y-383 проведены с использованием методов электронной спектроскопии и ЭПР. На рис. 9 представлены электронные спектры поглощения щелочных экстрактов из сублимированного мицелия дрожжей *Dothiora* sp. БИМ Y-383, выращенных при температурах 10; 18; 22; 28 и 32 °C.

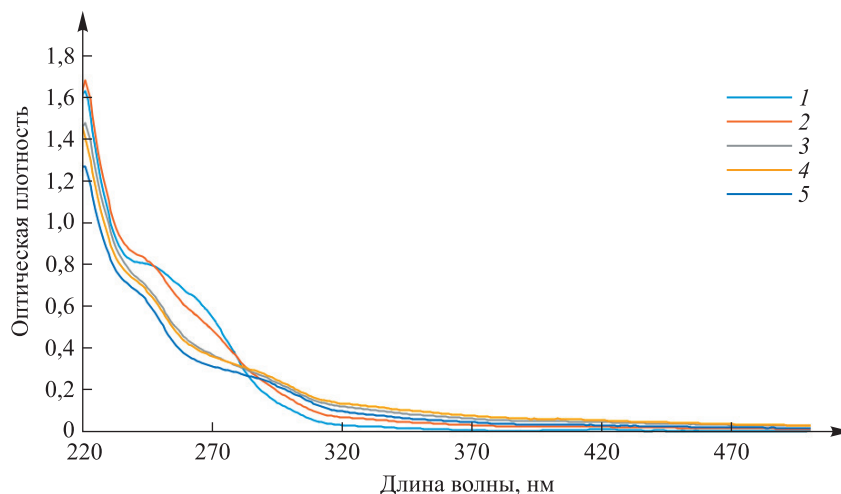


Рис. 9. Электронные спектры поглощения экстрактов из сублимированного мицелия дрожжей *Dothiora* sp. БИМ Y-383 на 16-е сутки культивирования при температурах 10 °C (1), 18 °C (2), 22 °C (3), 28 °C (4) и 32 °C (5)

Fig. 9. Electronic absorption spectra of extracts from freeze-dried mycelium of *Dothiora* sp. BIM Y-383 yeast on the 16th day of cultivation at temperatures of 10 °C (1), 18 °C (2), 22 °C (3), 28 °C (4) and 32 °C (5)

Из рис. 9 видно, что с увеличением температуры культивирования в диапазоне длин волн 230–283 нм происходит уменьшение оптической плотности экстракта, тогда как в диапазоне длин волн 283–470 нм оптическая плотность экстракта, наоборот, возрастает.

Следует отметить, что при длине волны 283 нм наблюдается изобестическая точка. Ее наличие свидетельствует о присутствии в растворе двух типов поглощающих в этой спектральной области центров, молярные коэффициенты поглощения которых при указанной длине волны совпадают [26]. Такими

веществами в полученных экстрактах из мицелия могут являться меланин и хорошо растворимые в щелочных растворах белки. Эти наблюдения согласуются с анализом оптической плотности в области поглощения ароматических аминокислот белков при длине волны 280 нм и меланиновых пигментов при длине волны 460 нм [24; 27].

Спектральные свойства экстрагированного из мицелия дрожжей *Dothiora* sp. БИМ Y-383 меланина исследованы в сравнении со спектральными свойствами синтетического меланина и очищенного меланина из мицелия дрожжей *Dothiora* sp. БИМ Y-383. Полученные результаты представлены в таблице.

**Спектральные характеристики синтетического меланина,
очищенного меланина из мицелия дрожжей *Dothiora* sp. БИМ Y-383
и меланина в составе экстрактов из мицелия
дрожжей *Dothiora* sp. БИМ Y-383**

**Spectral characteristics of synthetic melanin,
purified melanin from the mycelium of *Dothiora* sp. BIM Y-383 yeast
and melanin in the composition of extracts from the mycelium
of *Dothiora* sp. BIM Y-383 yeast**

Образец	Концентрация, мг/мл	Температура культивирова- ния, °C	Оптическая плотность			Соотношение поглощения при длинах волн 280 и 460 нм
			При длине волны 220 нм	При длине волны 280 нм	При длине волны 460 нм	
Синтетический меланин	0,01	—	0,725	0,322	0,080	4,04
	0,02	—	0,881	0,527	0,113	4,66
	0,03	—	1,312	0,843	0,187	4,51
	0,04	—	1,616	1,105	0,239	4,63
Очищенный меланин из мицелия дрожжей <i>Dothiora</i> sp. БИМ Y-383	0,03	—	0,232	0,155	0,044	3,51
	0,10	—	0,974	0,618	0,176	3,51
Меланин в составе экстрактов из мицелия дрожжей <i>Dothiora</i> sp. БИМ Y-383	—	10	1,615	0,341	0,005	71,17
	—	18	1,634	0,348	0,017	20,67
	—	22	1,460	0,313	0,034	9,09
	—	28	1,455	0,318	0,040	8,04
	—	32	1,270	0,281	0,021	13,14

С увеличением концентрации синтетического меланина наблюдается характерное возрастание оптической плотности при длинах волн 220 и 280 нм. Для меланина в составе экстрактов из мицелия дрожжей *Dothiora* sp. БИМ Y-383 с увеличением температуры культивирования оптическая плотность при указанных длинах волн изменяется незначительно (в сторону уменьшения).

В отличие от белков для меланиновых пигментов характерно поглощение в видимой области спектра при длинах волн 380–480 нм [17; 24; 25]. Как следует из таблицы, при длине волны 460 нм наблюдается увеличение оптической плотности растворов синтетического меланина и очищенного меланина из мицелия дрожжей *Dothiora* sp. БИМ Y-383 с ростом их концентрации. Увеличение оптической плотности характерно и для меланина в составе экстрактов из мицелия при повышении температуры культивирования от 10 до 28 °C, после чего снова отмечается снижение показателей поглощения при температуре культивирования 32 °C, что свидетельствует о росте содержания меланина в полученных экстрактах при увеличении температуры культивирования до 28 °C.

Анализ соотношения поглощения при длинах волн 280 и 460 нм показал, что с увеличением концентрации синтетического меланина эта величина возрастает. Для экстрактов из мицелия дрожжей *Dothiora* sp. БИМ Y-383 данный показатель уменьшается при увеличении температуры культивирования до 28 °C,

что обусловлено ростом содержания в них меланинов и снижением количества экстрагированных из мицелия белков. Полученные результаты согласуются с выходом экстрактивных веществ, приведенным на рис. 8.

С использованием очищенного меланина из мицелия дрожжей *Dothiora* sp. БИМ Y-383 в качестве стандарта рассчитано содержание пигмента в экстрактах из мицелия дрожжей при различных температурах культивирования. Расчет, проведенный по величине оптической плотности при длине волны 460 нм, показал, что содержание меланина в экстрактах из сублимированного мицелия на 16-е сутки культивирования при температурах 10; 18; 22; 28 и 32 °C составило ($23,0 \pm 0,5$) мг/г, ($39,0 \pm 0,8$) мг/г, ($62,3 \pm 1,2$) мг/г, ($69,0 \pm 1,4$) мг/г и ($45,1 \pm 0,9$) мг/г соответственно (рис. 10, кривая 3).

Таким образом, проведенные спектральные исследования позволили установить, что меланиногенез у дрожжей *Dothiora* sp. БИМ Y-383 носит факультативный характер и зависит от стадии роста культуры и температуры культивирования. Синтезируемый дрожжами меланин находится в связанном состоянии с их клеточными стенками, и только небольшая часть пигмента, растворимая в щелочных растворах, может быть выделена из мицелия.

Данные наблюдения подтверждаются исследованием ЭПР сублимированного мицелия дрожжей *Dothiora* sp. БИМ Y-383. Результаты ЭПР-спектроскопии выявили преобладание одиночного сигнала с g -фактором 2,003 6 и шириной линии 4,1 Гс, характерного для меланинов бензосемихиноновой природы. Этот сигнал насыщается при увеличении мощности СВЧ-излучения. Спектры имеют форму, среднюю между лоренцевой и гауссовой формами, что также является характерной особенностью меланинов. Близкие значения g -факторов позволяют предположить единую природу парамагнитных центров во всех исследуемых образцах мицелия.

На рис. 10 представлена зависимость содержания парамагнитных центров с g -фактором, равным 2,003 6, от температуры культивирования клеток штамма *Dothiora* sp. БИМ Y-383 на 16-е сутки эксперимента до экстракции меланина (см. рис. 10, кривая 1) и после нее (см. рис. 10, кривая 2).

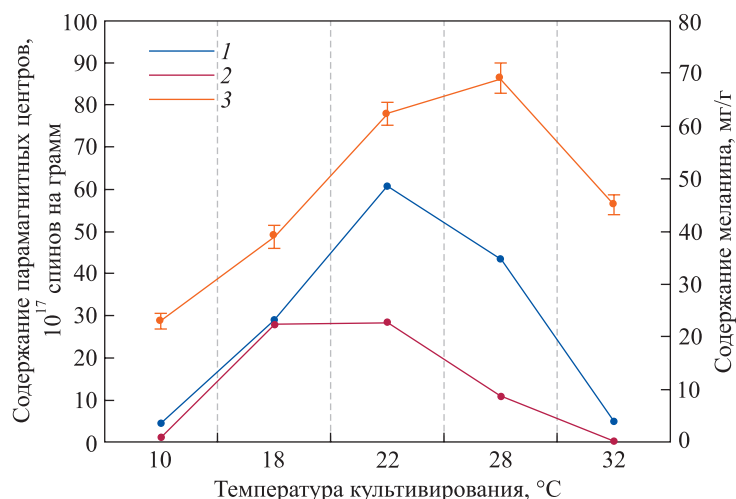


Рис. 10. Содержание парамагнитных центров в образцах сублимированного мицелия до экстракции меланина (1) и после нее (2), а также содержание меланина в экстрактах из сублимированного мицелия дрожжей *Dothiora* sp. БИМ Y-383 (3) в зависимости от температуры культивирования

Fig. 10. The content of paramagnetic centres in samples of freeze-dried mycelium before melanin extraction (1) and after her (2), as well as the content of melanin in extracts from freeze-dried mycelium of *Dothiora* sp. BIM Y-383 yeast (3) depending on the cultivation temperature

При повышении температуры культивирования дрожжей от 10 до 22 °C наблюдался рост содержания парамагнитных центров от $4,5 \cdot 10^{17}$ до $60,8 \cdot 10^{17}$ спинов на грамм. Дальнейшее увеличение температуры культивирования до 28 °C сопровождалось постепенным снижением синтеза меланина, при этом содержание парамагнитных центров составляло $43,5 \cdot 10^{17}$ спинов на грамм. Повышение же температуры культивирования до 32 °C приводило к резкому снижению синтеза пигмента, в этом случае содержание парамагнитных центров было равно $5,1 \cdot 10^{17}$ спинов на грамм.

Сублимированный мицелий дрожжей *Dothiora* sp. БИМ Y-383 после экстракции растворимой фракции меланина имел черный цвет, свидетельствующий о содержании в нем связанного с клеточной стенкой пигмента. Определение его количества в образцах с использованием ЭПР показало, что при температурах культивирования дрожжей 10; 18; 22; 28 и 32 °С содержание парамагнитных центров составляло $1,2 \cdot 10^{17}$; $28,0 \cdot 10^{17}$; $28,5 \cdot 10^{17}$; $11,0 \cdot 10^{17}$ и $0,4 \cdot 10^{17}$ спинов на грамм соответственно.

Тот факт, что в образцах мицелия дрожжей, выращенных при температурах 10 и 18 °С, отсутствуют различия в содержании парамагнитных центров до и после экстракции меланина, свидетельствует о синтезе преимущественно связанного с клеточной стенкой пигмента. Вместе с тем в образцах мицелия дрожжей, выращенных при температурах 22; 28 и 32 °С, наблюдается уменьшение количества парамагнитных центров после экстракции меланина на $32,3 \cdot 10^{17}$; $32,5 \cdot 10^{17}$ и $4,7 \cdot 10^{17}$ спинов на грамм соответственно, что говорит о синтезе свободного меланина, не связанного с клеточными стенками дрожжей (см. рис. 10, кривые 1 и 2).

Как следует из полученной с использованием метода электронной спектроскопии температурной зависимости содержания меланина в экстрактах из сублимированного мицелия дрожжей *Dothiora* sp. БИМ Y-383 на 16-е сутки эксперимента (см. рис. 10, кривая 3), максимальный выход меланина был зафиксирован при температурах культивирования 22 и 28 °С, он составил $(62,3 \pm 1,2)$ мг/г и $(69,0 \pm 1,4)$ мг/г соответственно. Эти данные коррелируют с изменением количества парамагнитных центров в мицелии дрожжей до и после экстракции пигмента: количество парамагнитных центров экстрагированного меланина при температурах культивирования 22 и 28 °С составило $3,2 \cdot 10^{18}$ и $3,3 \cdot 10^{18}$ спинов на грамм соответственно. Указанное обстоятельство позволяет применять метод ЭПР для изучения меланиногенеза в дрожжах и других объектах. Кроме того, проведенное исследование показало возможность использования спектральных методов анализа для изучения синтеза меланина дрожжами *Dothiora* sp. БИМ Y-383 в процессе роста культуры при различных температурах.

Заключение

Исследование роста дрожжей *Dothiora* sp. БИМ Y-383 в широком диапазоне температур позволило отнести их к группе психротолерантных микроорганизмов с факультативным синтезом пигмента. Установлено, что оптимальным для роста культуры и синтеза пигмента у данного штамма дрожжей является диапазон температур 22–28 °С. Показано, что синтезируемый дрожжами *Dothiora* sp. БИМ Y-383 пигмент является меланином и что для исследования процесса меланиногенеза можно использовать спектральные методы анализа. Максимальный выход меланина из мицелия дрожжей *Dothiora* sp. БИМ Y-383 составил $(69,0 \pm 1,4)$ мг/г и был зафиксирован в образцах, культивируемых при температуре 28 °С в течение 16 сут.

Согласно литературным данным очищенный меланин обладает парамагнитными свойствами, благодаря которым он может проявлять антиоксидантную, противоопухолевую, противовоспалительную, анти-вирусную, гепатопротекторную и радиопротекторную активность [11], что делает его перспективной субстанцией для использования в качестве биологически активной добавки и др.

Библиографические ссылки

1. Cowan DA, Tow LA. Endangered Antarctic environments. *Annual Review of Microbiology*. 2004;58:649–690. DOI: 10.1146/annurev.micro.57.030502.090811.
2. Ruisi S, Barreca D, Selbmann L, Zucconi L, Onofri S. Fungi in Antarctica. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*. 2007;6(1–3):127–141. DOI: 10.1007/s11157-006-9107-y.
3. Amato P, Doyle S, Christner BC. Macromolecular synthesis by yeasts under frozen conditions. *Environmental Microbiology*. 2009;11(3):589–596. DOI: 10.1111/j.1462-2920.2008.01829.x.
4. Libkind D, Sommaruga R, Zagarese H, van Broock M. Mycosporines in carotenogenic yeasts. *Systematic and Applied Microbiology*. 2005;28(8):749–754. DOI: 10.1016/j.syapm.2005.05.005.
5. Thomas-Hall SR, Turchetti B, Buzzini P, Branda E, Boekhout T, Theelen B, et al. Cold-adapted yeasts from Antarctica and the Italian Alps – description of three novel species: *Mrakia robertii* sp. nov., *Mrakia blollopis* sp. nov. and *Mrakiella niccombsii* sp. nov. *Extremophiles*. 2010;14(1):47–59. DOI: 10.1007/s00792-009-0286-7.
6. Vaz ABM, Rosa LH, Vieira MLA, de Garcia V, Brandão LR, Teixeira LCRS, et al. The diversity, extracellular enzymatic activities and photoprotective compounds of yeasts isolated in Antarctica. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2011;42(3):937–947. DOI: 10.1590/S1517-83822011000300012.
7. Vishniac HS. Yeast biodiversity in the Antarctic. In: Rosa C, Péter G, editors. *Biodiversity and ecophysiology of yeasts*. Berlin: Springer-Verlag; 2006. p. 419–440 (The yeast handbook). DOI: 10.1007/3-540-30985-3_16.

8. Coleine C, Selbmann L, Masonjones S, Onofri S, Zucconi L, Stajich JE. Draft genome sequence of an Antarctic isolate of the black yeast fungus *Exophiala mesophila*. *Microbiology Resource Announcements*. 2019;8(19):e00142-19. DOI: 10.1128/MRA.00142-19.
9. Ruibal C, Gueidan C, Selbmann L, Gorbushina AA, Crous PW, Groenewald JZ, et al. Phylogeny of rock-inhabiting fungi related to Dothideomycetes. *Studies in Mycology*. 2009;64:123–133. DOI: 10.3114/sim.2009.64.06.
10. Perini L, Gostinčar C, Anesio AM, Williamson C, Tranter M, Gunde-Cimerman N. Darkening of the Greenland Ice Sheet: fungal abundance and diversity are associated with algal bloom. *Frontiers in Microbiology*. 2019;10:557. DOI: 10.3389/fmicb.2019.00557.
11. Грачева НВ, Желтобрюхов ВФ. Меланины. Перспективы и проблемы использования в промышленности. Волгоград: Волгоградский государственный технический университет; 2019. 92 с.
12. Курченко ВП, Сенчук ВВ, Гавриленко НВ, Кукулянская ТА, Бабицкая ВГ, Щерба ВВ. Сравнительная характеристика меланиновых пигментов макромицетов *Phellinus igniarius* и *Inonotus* sp. *Вестник Белорусского государственного университета. Серия 2, Химия. Биология. География*. 1998;3:22–26. EDN: JNXXUD.
13. Dong C, Yao Y. Isolation, characterization of melanin derived from *Ophiocordyceps sinensis*, an entomogenous fungus endemic to the Tibetan Plateau. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2012;113(4):474–479. DOI: 10.1016/j.jbiosc.2011.12.001.
14. Gribanova EA, Akhremchuk KU, Semenchukova EA, Dolgikh AV, Shchur VV, Yantsevich AV, et al. Isolation and primary characterisation of yeasts isolated from different ecosystems in East Antarctica. *Polar Science*. 2025;46:101262. DOI: 10.1016/j.polar.2025.101262.
15. Lukashanets DA, Convey P, Borodin OI, Miamin VYe, Hihiniak YuH, Gaydashov AA, et al. Eukarya biodiversity in the Thala Hills, East Antarctica. *Antarctic Science*. 2021;33(6):605–623. DOI: 10.1017/S0954102021000328.
16. Сушинская НВ, Кукулянская ТА, Курченко ВП, Сенчук ВВ. Характеристика меланина, полученного из *Inonotus obliquus* (Pers.: Fr.) Pil. f. *sterilis* (Vanin) Nicol. *Вестник Белорусского государственного университета. Серия 2, Химия. Биология. География*. 2004;3:33–36. EDN: ZBLGDZ.
17. Хабибрахманова ВР, Рассабина АЕ, Хайруллина АФ, Минибаева ФВ. Физико-химические характеристики и антиоксидантные свойства меланинов, выделенных из лишайника *Leptogium furfuraceum* (Harm.). *Химия растительного сырья*. 2022;4:115–125. DOI: 10.14258/jcprm.20220411774.
18. Грибанова ЕА, Мямин ВЕ, Курченко ВП. Исследование особенностей меланиногенеза «черных дрожжей» Антарктиды. В: Аршанский ЕЯ, Балаева-Тихомирова ОМ, Галкин АН, Дорофеев СА, Красовская ИА, Литвенкова ИА и др., редакторы. *Экологическая культура и охрана окружающей среды: IV Дорофеевские чтения. Материалы Международной научно-практической конференции; 29 ноября 2024 г.; Витебск, Беларусь*. Витебск: Витебский государственный университет имени П. М. Машерова; 2024. с. 237–239.
19. Грибанова ЕА, Охремчук ЕВ, Семенчукова ЕА, Гигиняк ЮГ, Мямин ВЕ. Молекулярно-биологическая идентификация дрожжей, выделенных из различных экосистем Восточной Антарктики. В: *Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты. Материалы XIII Международной научной конференции; 6–9 июня 2023 г.; Минск, Беларусь*. Минск: Белоруская наука; 2023. с. 39–40.
20. Грибанова ЕА, Охремчук ЕВ, Семенчукова ЕА, Мямин ВЕ. Разнообразие и биотехнологический потенциал дрожжей, выделенных из различных экосистем Восточной Антарктиды. В: Сергеев ЮВ, Кураков АВ, Белозерская ТА, Волобуев СВ, Бурова СА, Кононенко ГП и др., редакторы. *Современная микология в России. Том 10, Материалы Международного микологического форума. Выпуск 1, Генетика, морфология и физиология грибов*. Москва: Национальная академия микологии; 2024. с. 55–58.
21. Pralea I-E, Moldovan R-C, Petrache A-M, Ilieș M, Hegheș S-C, Ielciu I, et al. From extraction to advanced analytical methods: the challenges of melanin analysis. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019;20(16):3943. DOI: 10.3390/ijms20163943.
22. Бухало АС, Бабицкая ВГ, Бисько НА, Вассер СП, Дудка ИА, Митропольская НЮ и др. *Биологические свойства лекарственных макромицетов в культуре. Том 1*. Вассер СП, редактор. Киев: Альтерпрес; 2011. 212 с.
23. Satyanarayana T, Kunze G, editors. *Yeast biotechnology: diversity and applications*. Dordrecht: Springer; 2009. XXI, 744 p. DOI: 10.1007/978-1-4020-8292-4.
24. Курченко ВП, Сенчук ВВ, Кукулянская ТА, Новиков ДА, Леонтьев ВН, Борисик ОИ. Структура и функции природных меланиновых пигментов. *Труды Белорусского государственного технологического университета. Серия 3, Химия и технология неорганических веществ*. 1998;6:85–90. EDN: TBROHU.
25. Курченко ВП, Новиков ДА. Особенности физико-химических свойств меланинов из винограда (*Vitis vinifera*) и черного чая (*Thea sinensis*). *Вестник Белорусского государственного университета. Серия 2, Химия. Биология. География*. 2001;3:33–39. EDN: VUYMJP.
26. Белько НВ, Самцов МП, Гусаков ГА, Тарасов ДС, Луговский АА, Воропай ЕС. Спектрально-люминесцентные свойства и морфология самоорганизованных наноструктур индотрикарбоцианинового красителя. *Журнал прикладной спектроскопии*. 2018;85(6):868–878. EDN: YNRUBF.
27. Суховская ИВ, Борвинская ЕВ, Смирнов ЛПИ, Немова НН. Сравнительный анализ методов определения концентрации белка – спектрофотометрии в диапазоне 200–220 нм и по Бредфорд. *Труды Карельского научного центра Российской академии наук*. 2010;2:68–71. EDN: NBJDXP.

Получена 23.08.2025 / исправлена 09.10.2025 / принята 10.10.2025.
Received 23.08.2025 / revised 09.10.2025 / accepted 10.10.2025.

Авторы:

Екатерина Александровна Грибанова – старший преподаватель кафедры микробиологии биологического факультета.

Владимир Петрович Курченко – кандидат биологических наук, доцент; заведующий научно-исследовательской лабораторией прикладных проблем биологии кафедры общей экологии и методики преподавания биологии биологического факультета.

Игорь Иосифович Азарко – кандидат физико-математических наук, доцент; заведующий научно-исследовательской лабораторией физики и техники полупроводников кафедры физики полупроводников и наноэлектроники физического факультета.

Владислав Евгеньевич Мямин – кандидат биологических наук, доцент; доцент кафедры микробиологии биологического факультета.

Authors:

Ekaterina A. Gribanova, senior lecturer at the department of microbiology, faculty of biology.

gribanova@bsu.by

<https://orcid.org/0009-0008-1562-4218>

Vladimir P. Kurchenko, PhD (biology), docent; head of the laboratory of applied biology, department of general ecology and methods of biology teaching, faculty of biology.

kurchenko@tut.by

<https://orcid.org/0000-0002-4859-2389>

Igor I. Azarko, PhD (physics and mathematics), docent; head of the laboratory of physics and engineering of semiconductors, department of semiconductor physics and nanoelectronics, faculty of physics.

azarko@bsu.by

Vladislav E. Miamin, PhD (biology), docent; associate professor at the department of microbiology, faculty of biology.

vladmiamin@mail.ru

<https://orcid.org/0000-0002-6379-2207>
