

УДК 579.22 : 582.282

ПОЛУЧЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА ГУМИНОПОДОБНЫХ ВЕЩЕСТВ, СИНТЕЗИРУЕМЫХ ДЕРЕВОРАЗРУШАЮЩИМИ ГРИБАМИ, ВОЗБУДИТЕЛЯМИ “БЕЛОЙ ГНИЛИ”

© 2003 г. И. С. Явметдинов*, Е. В. Степанова*, В. П. Гаврилова**, Б. В. Локшин***, И. В. Перминова***, О. В. Королева*

*Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН

г. Москва, 119071, e-mail: ildar26@pisem.net

**Ботанический институт им. В.Л. Комарова РАН, г. Санкт-Петербург, 197022, e-mail: Valeria@VG2438.spb.edu

***ИНЭОС РАН, г. Москва, 119991, e-mail: bloksh@ineos.ac.ru

****Московский государственный университет, химический факультет,

г. Москва, 119899, e-mail: iperm@cityline.ru

Поступила в редакцию 08.10.2002 г.

Получены три препарата высокомолекулярных гуминоподобных веществ, образующихся при твердофазном культивировании базидиомицетов *Coriolus hirsutus* и *Cerrena maxima* и обоих штаммов одновременно на овсяной соломе. Выход гуминоподобных веществ составил 1.38–2.26% от массы потребленного растительного субстрата. Показано, что эти вещества, синтезированные как индивидуальными культурами, так и при совместном культивировании, близки по строению и физико-химическим свойствам. По данным ИК- и ЯМР ¹³C-спектроскопии полученные гуминоподобные вещества имели в своем составе ароматические фрагменты и были близки к классу почвенных гуминовых кислот. Изучена динамика образования фермента лакказы. Предполагается, что исследованные гуминоподобные вещества образуются из разрушенных макромолекул лигнина при непосредственном участии внеклеточной лакказы.

Гуминовые вещества (ГВ) представляют собой один из наиболее обширных классов природных соединений, компонент органического вещества почвенных и водных экосистем. Они образуются при разложении растительных и животных остатков под действием микроорганизмов и абиотических факторов среды [1]. По химическому составу ГВ представляют собой нерегулярные сополимеры ароматических оксиполикарбоновых кислот с включениями азотсодержащих и углеводных фрагментов. Наличие ароматического углеродного скелета, замещенного алкильными и функциональными группами, связанного с олигосахаридными и пептидными фрагментами, является общим для ГВ различного происхождения. Эти вещества могут вступать как в ионообменные, донорно-акцепторные, так и гидрофобные взаимодействия, что определяет их особое значение в биосфере. Одним из наиболее важных, но наименее исследованных свойств ГВ является их физиологическая активность. Адаптогенное действие ГВ на растения изучается уже более полувека [2], но механизм его до сих пор неясен. В последнее время обнаружены антиканцерогенные и антимуtagenные свойства ГВ [3–6]. Не оставляет сомнений, что ГВ представляют собой класс соединений, имеющих большое будущее для использова-

ния в медицине. Весьма перспективной может оказаться разработка биосинтетических подходов к получению ГВ с заданными свойствами в течение ограниченного времени.

Известно, что некоторые представители базидиомицетов, вызывающих “белую гниль” древесины, способны накапливать гуминоподобные вещества (ГПВ) в большом количестве [7–9]. Изучение путей биосинтеза ГПВ грибами, разрушающими лигнин, представляет большой интерес. Эти микроорганизмы являются активными продуцентами ферментов лигнолитической системы, в том числе и медьсодержащей оксидазы – лакказы (монофенол, дегидроксифенилаланин: кислород оксидоредуктазы КФ 1.14.18.1) [10]. В работах [11, 12] приводятся данные о способности лакказы синтезировать полимеры высокой молекулярной массой (более 8000 Да) при использовании модельных компонентов лигнина в качестве исходных мономеров. Это позволяет предположить, что образование некоторыми видами грибов в большом количестве ГПВ может быть связано с биосинтезом внеклеточной лакказы [13]. Подтверждением роли лигнолитического фермента в процессе синтеза ГПВ могло бы стать сходство состава и свойств ГПВ, синтезированных в процессе роста

различных базидальных грибов на одном и том же природном субстрате.

Цель работы – характеристика темноокрашенных кислотонерастворимых веществ, синтезированных различными дереворазрушающими грибами, возбудителями “белой гнили”, при росте на лигнинсодержащем субстрате и подтверждение их гуминовой природы.

МЕТОДИКА

Объекты исследования – базидальные грибы *Coriolus hirsutus* 075 и *Cerrena maxima* 0275 из коллекции культур базидомицетов Ботанического института им. В.Л. Комарова РАН.

Грибы выращивали на овсяной соломе в качалочных колбах на 750 мл в стационарных условиях при 37°C в течение 45 сут. В каждую колбу вносили 10 г мелкоизмельченного субстрата (размер частиц не более 1 см), 50 мл среды без глюкозы, содержащей медь [14]. После стерилизации при 1 атм 1 ч проводили засев 30 мл гомогенизированного инокулята, полученного при поверхностном выращивании [14].

Активность лакказы определяли спектрофотометрическим методом [14] при 410 нм, используя в качестве хромогенного субстрата 10 мМ раствор пирокатехина в 0.1 М Na-ацетатном буфере, рН 4.9. Пирокатехин предварительно очищали возгонкой в вакууме. За единицу активности принимали увеличение оптической плотности на 1 ед. за 1 мин при 25°C.

Активность Mn-пероксидазы определяли, используя в качестве субстрата Mn^{2+} [15]. За единицу активности принимали окисление 1 мкмоль Mn^{2+} за 1 мин при 25°C.

После окончания выращивания во всех образцах соломы определяли: зольность, трудногидролизуемые (целлюлоза) полисахариды, влажность, массу остатка и содержание лигнина по методу Комарова [16].

Выделение темноокрашенной фракции ГПВ проводили по описанной ранее методике [17]. После 45 сут выращивания в колбы с выращенными культурами грибов заливали теплой (60°C) дистиллированной водой в количестве 150 мл на каждую колбу и оставляли на 6 ч при постоянном перемешивании.

Жидкость отделяли от соломы с мицелием фильтрованием на бумажном фильтре. В фильтр добавляли концентрированную HCl по каплям до рН 2.0. Раствор оставляли на 24 ч при температуре 4°C. При этом выпадал хлопьевидный осадок бурого цвета. Осадок собирали центрифугированием при 7000 g в течение 30 мин, промывали дистиллированной водой, затем снова центрифугировали и диализовали против дистиллированной воды. Для диализа использовали мембраны

с размерами пор, позволяющими отделить компоненты с молекулярной массой менее 6000 Да. Диализ заканчивали через 24 ч и достижении рН диализуемого раствора 4.5. Диализованный препарат высушивали в вакууме при -18°C в течение 12 ч.

В высушенном препарате определяли содержание углерода, азота и водорода на автоматическом CHN анализаторе фирмы “Carlo Erba” (Италия). Зольность определяли сжиганием препарата в муфельной печи. Содержание кислорода рассчитывали по разности между массой беззольной навески и суммарным содержанием C, H, N.

Для исследования физико-химических свойств выделенных препаратов ГПВ готовили 0.04%-ные растворы в 0.1 М NaOH. Спектры поглощения регистрировали в кюветах с длиной оптического пути 1 см на спектрофотометре Hitachi 557 (Япония). На основании экспериментальных данных рассчитывали коэффициент цветности, E_{465}/E_{665} , который представляет собой отношение оптических плотностей раствора ГПВ при 465 и 665 нм. Полученный показатель характеризует степень конденсации или глубину гумификации гуминовых кислот (ГК) [18].

Гель-хроматографию проводили на колонке 38 × 1.6 см, заполненной гелем Toyopearl HW-50F (“Toyo Soda”, Япония). На колонку, предварительно промытую 0.028 М фосфатным буфером рН 6.8, наносили 0.5 мл раствора ГПВ концентрацией 20 мг/л в том же буфере. Скорость элюирования составляла 1 мл/мин. Регистрацию ГПВ на выходе колонки проводили с помощью проточного УФ-детектора Unicords 2138 (“LKB”, Швеция) при длине волны 280 нм. Для калибровки колонки использовали препарат почвенных ГК с известной молекулярной массой (23000 Да).

ИК-спектры полученных препаратов ГПВ регистрировали на ИК-фурье-спектрометре Magna-750 фирмы “Nicolet” (США). Образцы готовили путем прессования таблеток из КВг с ГПВ.

Для регистрации спектров ЯМР ^{13}C 150 мг высушенного препарата ГПВ растворяли в 3.5 мл 0.1 М NaOD. Регистрацию спектров проводили в десяти миллиметровой ЯМР-ампуле на спектрометре “VXR-400” фирмы “Varian” (США) при рабочей частоте 100 МГц. Ширина развертки спектра составляла около 26000 Гц, время регистрации сигнала спада свободной индукции – 0.6 с, интервал между импульсами (T_d) – 4 с, ширина импульса – 45°, длительность накопления спектра – 12 ч. В качестве внутреннего стандарта использовали натриевую соль 3-триметилсилил-1-пропансульфокислоты. Пропорциональность интенсивности спектральных сигналов атомов углерода различных типов их реальному содержанию в образце обеспечивалась использованием времени задержки 4 с, достаточного для релаксации всех типов атомов углерода [19].

Таблица 1. Изменение содержания основных компонентов соломы и образование гуминоподобных веществ после 45 сут культивирования на ней грибов *C. hirsutus*, *C. maxima*

Культура	Потребление субстрата, %			I_c	Выход ГПВ, % от потребленного субстрата
	солома	целлюлоза	лигнин		
<i>C. hirsutus</i>	52.77	53.73	52.53	0.51	1.38
<i>C. maxima</i>	51.83	52.45	59.53	0.47	2.15
Совместное культивирование	41.27	43.12	32.79	0.57	2.26

Все неорганические реактивы имели квалификацию “хч” или “осч”.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Культивирование штаммов и выделение ГПВ. Используемые в работе штаммы базидиальных грибов – активные делигнификаторы растительных субстратов, одинаково хорошо использовали как лигнин, так и целлюлозу (табл. 1). Известно, что продукты деградации как лигнина, так и целлюлозы могут рассматриваться как предшественники ГВ [1], поэтому исследовались образования ГПВ при разрушении грибами лигноуглеводного комплекса. Для изучения возможного синергетического эффекта при деградации растительного субстрата проводили совместное культивирование двух штаммов базидиальных грибов. Ранее при выращивании *C. hirsutus* была отмечена более высокая лакказная активность, чем у гриба *C. maxima*. В работе [20] показано также, что *C. maxima* образует преимущественно марганецзависимую пероксидазу, тогда как *C. hirsutus* – преимущественно лакказу.

Для оптимизации процесса образования ГПВ культивирование проводилось при температуре 37°C, что нетипично для грибов “белой гнили”. Изменение температуры культивирования объясняется тем, что одна из культур – *C. maxima* – термотолерантный штамм, растущий при 30–32°C, выделена на Кубе. Повышение температуры культивирования (как при компостировании) имело целью активизировать метаболические процессы и увеличить скорость образования ГПВ [13]. Как и предполагалось, деградация лигноуглеводного комплекса соломы происходила более активно при повышенной температуре. Штаммы *C. maxima* и *C. hirsutus*, встречающиеся в умеренном климате, хорошо росли в этих условиях на растительном субстрате, утилизируя как целлюлозу, так и лигнин. Потери массы соломы составили для *C. maxima* – 51.8% и 52.8% для *C. hirsutus* (табл. 1). При культивировании при 28°C эти показатели составляли 32.7% и 31.8% соответственно [21].

Анализ данных по изменению содержания основных компонентов соломы (целлюлозы и лигнина) до и после твердофазной ферментации на

этом субстрате (табл. 1) позволяет рассчитать потери целлюлозы и лигнина, а также индекс I_c . Индекс I_c является важной характеристикой грибов-разрушителей древесины, по которому судят об избирательной способности данного микроорганизма деградировать лигнин или целлюлозу [22].

Потери целлюлозы (С) и лигнина (L) от их первоначальной массы вычисляли по формулам:

$$C(\%) = 100 - K(100 - D)K_k, \quad (1)$$

$$L(\%) = 100 - K(100 - D)/K_k, \quad (2)$$

где D – потеря массы соломы после воздействия гриба, %; K_k и K – содержание соответствующего компонента в контрольном образце соломы до и после воздействия гриба, соответственно, %.

Способность микроорганизмов избирательно разрушать лигнин оценивалась с помощью I_c :

$$I_c = C/(C + L), \quad (3)$$

где С и L – потери целлюлозы и лигнина.

Из полученных результатов следует, что использованные в данной работе грибы-деструкторы в равной степени хорошо разрушали как лигнин, так и целлюлозу, вызывая при этом значительную минерализацию растительного сырья. Культура *C. maxima* в большей степени утилизировала лигнин ($I_c = 0.47$). У культуры *C. hirsutus* утилизация целлюлозы и лигнина происходила приблизительно в равном соотношении ($I_c = 0.51$). При совместном культивировании $I_c = 0.57$, что говорит о более активном потреблении целлюлозы. Последний факт можно объяснить конкуренцией грибных культур за источник питания, которым на начальной стадии их развития является целлюлоза.

При выращивании на среде с соломой при температуре 37°C (рис. 1) пик лакказной активности для *C. maxima* наблюдали уже на 11 сут, для *C. hirsutus* и при совместном культивировании на 13 сут. По-видимому, *C. maxima* лучше растет и утилизирует лигнин при более высоких температурах, чем *C. hirsutus* (как видно из рассчитанного I_c). Образование фермента при 37°C увеличивалось в 1.5–2 раза по сравнению с 28°C как у отдельных культур, так и при совместном культивировании

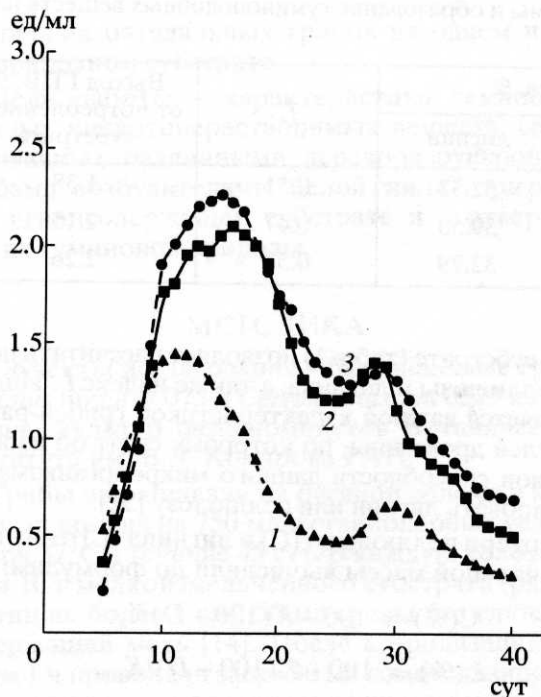


Рис. 1. Динамика образования лакказы в ходе культивирования. 1 – *C. maxima*, 2 – *C. maxima* + *C. hirsutus*, 3 – *C. hirsutus*, ед/мл.

штаммов [14, 21]. Это свидетельствует об активном участии лакказы в деградации растительного сырья при 37°C. Динамика образования фермента для всех исследованных культур имела два пика. Второй пик активности для всех культур наблюдался на 29–30 сут выращивания, что, возможно, говорит об активизации процессов автолиза клеток, сопровождающихся выделением внутриклеточных фенолоксидаз, активизацией других ферментативных систем (например, внутриклеточной тирозиназы). Эти ферментативные системы могут окислять фенольные соединения, в том числе и пирокатехин [23], являющийся стандартным субстратом для определения активности лакказы.

Активность Mn-зависимой пероксидазы в процессе культивирования базидиомицетов зарегистрировать не удалось, что, возможно, объясняется отсутствием ее синтеза в данных условиях культивирования. Возможно также, что в силу невысо-

кой термостабильности образующаяся Mn-зависимая пероксидаза разрушается при 37°C [24].

Уменьшение содержания лигнина в субстрате не коррелировало с образованием лакказы. Высокий уровень лакказной активности в течение 18 сут культивирования, который мог значительно превышать уровень, необходимый для деградации лигноуглеводного комплекса, объяснялся использованием в питательной среде индуктора лакказы – ионов меди. Однако высокая активность фермента в ходе всей дальнейшей ферментации не оставляет сомнений в важности его участия в процессах делигнификации.

При выращивании базидиомицетов образовывались темноокрашенные высокомолекулярные соединения предположительно гуминовой природы, для обозначения которых в дальнейшем мы использовали термин гуминоподобные вещества (ГПВ).

Данные о выходе ГПВ, синтезированных выбранными культурами базидиомицетов при росте на лигнинсодержащем субстрате, приведены в табл. 1. Синтез ГПВ составлял от 1.28 до 2.36% от массы утилизированного субстрата (овсяной соломы). При этом максимальное образование ГПВ наблюдали при культивировании штамма *C. maxima* и совместном культивировании. Данный факт может быть связан со способностью этой культуры лучше расти при повышенной температуре 37°C. Меньший выход ГПВ в случае *C. hirsutus* согласуется с данными литературы [25], где установлена его невысокая способность деметоксилировать и конденсировать лигнин по сравнению с другими грибами. Возможно, этот гриб преимущественно осуществляет процессы окисления без конденсации.

Как видно из рис. 1 и табл. 2, высокая лакказная активность в культуре грибов не всегда соответствует максимальному накоплению ГПВ (1.38% у *C. hirsutus* по сравнению с 2.26% при совместном культивировании). Полученные результаты по изменению активности фермента и выхода ГПВ позволяют говорить о ключевой роли лакказы в процессе деструкции лигнина и почти полной его минерализации этими грибами. Небольшая часть разрушенного лигноуглеводного субстрата переходит под воздействием лакказы в ГПВ (табл. 2). Следует отметить также, что pH среды культивирования на протяжении всего роста культур не

Таблица 2. Элементный состав и коэффициенты цветности исследуемых гуминоподобных веществ

Культура	Содержание элементов, % масс.				Соотношение атомов			E_{465}/E_{665}
	C	H	N	O	H/C	C/N	O/C	
<i>C. maxima</i>	59.50	5.84	3.87	30.79	1.18	17.94	0.39	7.0
<i>C. hirsutus</i>	60.04	6.27	5.16	28.52	1.25	13.57	0.36	7.0
Совместное культивирование	59.84	6.08	4.33	29.76	1.22	16.14	0.37	7.0

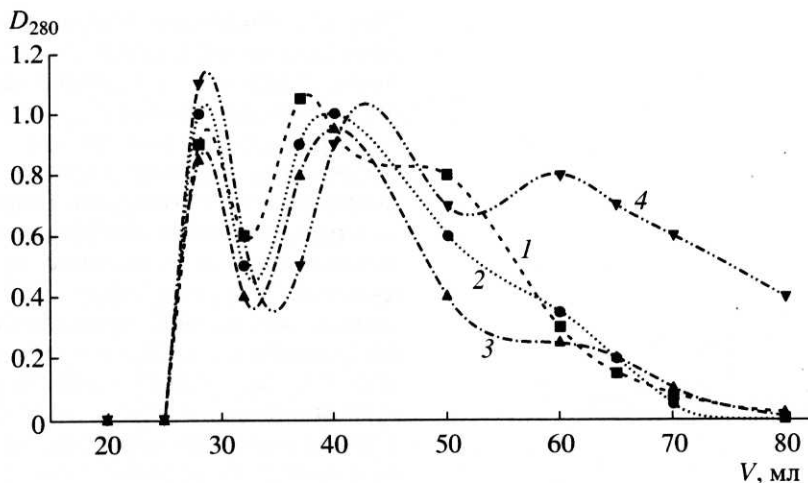


Рис. 2. Гель-хроматография на колонке с носителем – гелем Toyopearl HW-50 F. (Подвижная фаза – 0.028 М фосфатный буфер при pH 6.8; концентрация раствора ГПВ или ГК почвы – 20 мл/л в том же буфере; объем вносимого препарата – 0.5 мл; скорость элюирования 1 мл/мин). 1 – ГК почв, 2 – ГПВ *C. maxima*, 3 – ГПВ *C. hirsutus*, 4 – ГПВ *C. maxima* + *C. hirsutus*.

превышал 4.5, что исключает возможность автоокисления пропилфенольных метаболитов, образующихся при деградации лигнина. Кроме того, это значение pH оптимально для действия большинства грибных лакказ [20].

По окончании выращивания из всех трех культуральных жидкостей выделяли фракцию ГПВ. Для этой цели исходный раствор подкисляли до pH 2 и выпавший осадок отделяли. Описанная процедура выделения аналогична традиционной схеме выделения гуминовых кислот и основана на их классификационном признаке – нерастворимости при pH < 2. Выделенные препараты ГПВ характеризовали по следующим показателям: растворимость в щелочах и кислотах, элементный состав, молекулярная масса, структурно-групповой состав, спектральные характеристики.

Сравнительная характеристика строения и физико-химических свойств полученных ГПВ.

Все три препарата ГПВ, как и ГК, полностью растворялись в слабых щелочных растворах (0.1 М) при pH 12, а также осаждались из раствора при его подкислении до pH 2.0. При этом ГПВ выпадали в виде осадков бурого цвета. Надосадочная жидкость имела светло-желтую окраску.

Данные по элементному составу выделенных ГПВ приведены в табл. 2. Для всех трех препаратов характерно высокое содержание углерода (от 59.50 до 60.04%) и водорода (от 5.84 до 6.27%). Близкое содержание углерода характерно только для высокоароматичных препаратов ГК угля, чернозема, низинного торфа, тогда как такое высокое (как в ГПВ) содержание водорода не характерно для природных ГК [26]. Так, в 80 препаратах ГК [27], выделенных из различных источников, содержание водорода не превышало 5.1%. Обращает

на себя внимание в выделенных нами препаратах и высокое содержание азота (3.87–5.16%), характерное только для почвенных ГК [26], и довольно низкое содержание кислорода (28.52–30.79%). В публикациях, посвященных классификации гумусовых кислот [28], указывается на гораздо более высокую дискриминирующую способность атомных соотношений по сравнению с абсолютным содержанием элементов. Особое внимание было уделено сравнению значений H/C, O/C и C/N, рассчитанных для выделенных ГПВ, с таковыми для ГК из различных природных источников.

Как видно из табл. 2, для выделенных ГПВ характерны высокие значения H/C (1.18–1.25) и низкие O/C (0.36–0.39). Это определяет особое положение группы ГПВ на диаграмме Ван-Кревелена при ее максимальной близости к группе почвенных ГК [27]. Наиболее близки почвенным ГК и значения C/N (13.6–17.9) [27].

Высокие значения H/C могут быть связаны с низкой степенью гумификации полученных ГПВ, т.е. высоким содержанием в них алифатических фрагментов, вклад которых в структуру природных ГК значительно ниже. Высокое содержание азота в препаратах ГПВ можно объяснить избытком азотсодержащего сырья (пептон), использовавшегося для культивирования базидиомицетов. Следует отметить, что природные ГК активно участвуют в процессах обмена веществ, происходящих в почве, торфах, водоемах, что мешает большому накоплению азотсодержащей фракции в их составе [1].

На рис. 2 представлены результаты гель-хроматографии препаратов ГПВ. Как видно, ГПВ различных культур базидиомицетов, выросших на одном и том же растительном субстрате, мало

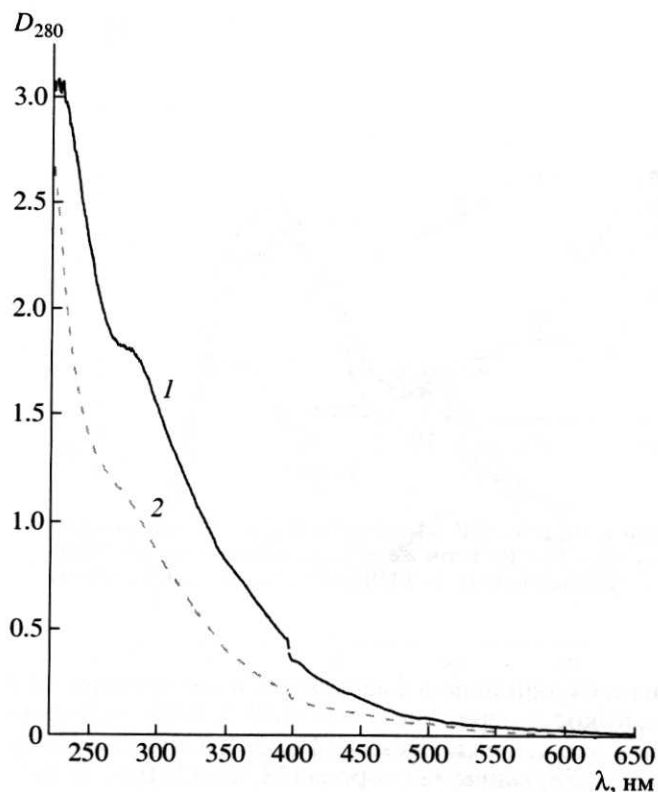


Рис. 3. Спектры поглощения 0.01%-ных щелочных растворов (рН 12); 1 – ГПВ базидиальных грибов, 2 – почвенной ГК.

отличались по характеру и положению второго основного пика на кривой элюирования. Кроме того, гель-хроматограммы всех трех ГПВ были очень близки охарактеризованному препарату почвенных ГК с молекулярной массой 23000 Да (рис. 2). Так, на хроматограммах и всех ГПВ и почвенных ГК наблюдался острый пик в области выхода свободного объема колонки, что свидетельствовало о присутствии в их составе фракции с большей молекулярной массой, чем предел фракционирования геля Тоуорепл HW-50 F (500–20000 по декстрану). Однако выбор данного носителя обеспечивал возможность разделения преобладающих низкомолекулярных фракций. Положение второго, более широкого пика на кривой элюирования ГПВ соответствовало выходу фракций с молекулярной массой около 23000 Да, что свидетельствует о макромолекулярной природе ГПВ и их близости в этом отношении к почвенным ГК [29].

Спектры поглощения щелочных растворов ГПВ в УФ и видимой области представляют собой ниспадающие кривые без характеристических полос поглощения (рис. 3). Значительное поглощение в УФ области спектра, ослабевающее с увеличением длины волны, и небольшое “плечо” при длине волны 280 нм характерно как для исследуемых препаратов, так и для природных ГК

[30]. На основании полученных экспериментальных данных рассчитывали коэффициенты цветности (“степень конденсации”, E_{465}/E_{665}). Коэффициенты цветности $E_{465/665}$ всех препаратов были приблизительно равны 7, что составляет предельную величину данного показателя для гуминовых кислот, у которых он варьирует от 3 до 7 [18]. Высокие значения коэффициентов цветности указывают на более высокий вклад алифатических фрагментов в структуру ГПВ и, соответственно, низкое содержание ароматических структур ГПВ по сравнению с большинством препаратов природных ГК. Это свидетельствует о низкой степени гумификации выделенных ГПВ как следствие малого времени их образования (45 сут), тогда как почвенные гуминовые вещества образуются годами.

ИК-спектры всех трех ГПВ, синтезированных в процессе роста базидиомицетов на растительном субстрате, оказались практически идентичными (рис. 4). На всех ИК-спектрах наблюдается широкая интенсивная полоса поглощения в области 3333–3370 cm^{-1} , что соответствует валентным колебаниям ОН-группы. Небольшие пики при 2919 и 2850 cm^{-1} могут вызываться колебаниями алифатических групп CH_2 и CH_3 . Заметное плечо в области 1712–1722 cm^{-1} , соответствующее колебаниям С–О групп в составе кислот, сложных эфиров и кетонов, является типичным для ГК [9]. Сильно выраженная широкая полоса поглощения с максимумом при 1650–1659 cm^{-1} также характерна для двойных связей С–N и совпадает с максимумом для ГК торфа и ГПВ из культуры чаги на среде с веточным лигнином [9]. Полоса при 1600 cm^{-1} , отвечающая колебаниям С–С в конденсированной ароматической системе [9], представлена на спектре в виде небольшого плеча. Четкий пик в области 1502–1505 cm^{-1} может быть отнесен к плоскостным колебаниям С–С связей в ароматической кольце [30]. Поглощение в области 1460–1465 cm^{-1} дают группы CH_3 и CH_2 . За небольшой пик в области 1415–1420 cm^{-1} могут быть ответственны группы NH , OH , COO^- , присутствующие в ГК [30]. Поглощение с максимумом в области 1268–1270 cm^{-1} может быть вызвано валентными колебаниями С–О первичных и вторичных спиртовых групп. Характерная область поглощения при 1226–1228 cm^{-1} вызвана колебаниями связей С–О в кислотных, сложноэфирных и фенольных группах. По интенсивности поглощения в этой области можно судить о степени метоксилирования исследуемых препаратов. Следует заметить, что во всех исследованных ГПВ она была примерно одинаковой.

Поглощение в областях 1123–1048 cm^{-1} может быть связано с колебаниями С–О углеводных и спиртовых групп. Наличие перечисленных выше атомных группировок свидетельствует о том, что

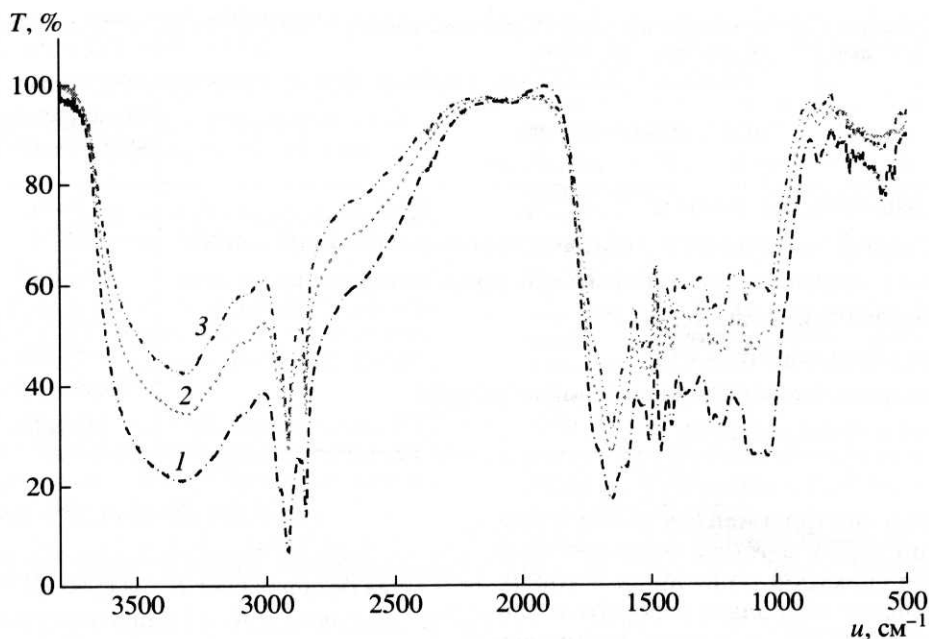


Рис. 4. ИК-спектры ГПВ базидиальных грибов. 1 – *C. maxima*, 2 – *C. maxima* + *C. hirsutus*, 3 – *C. hirsutus*.

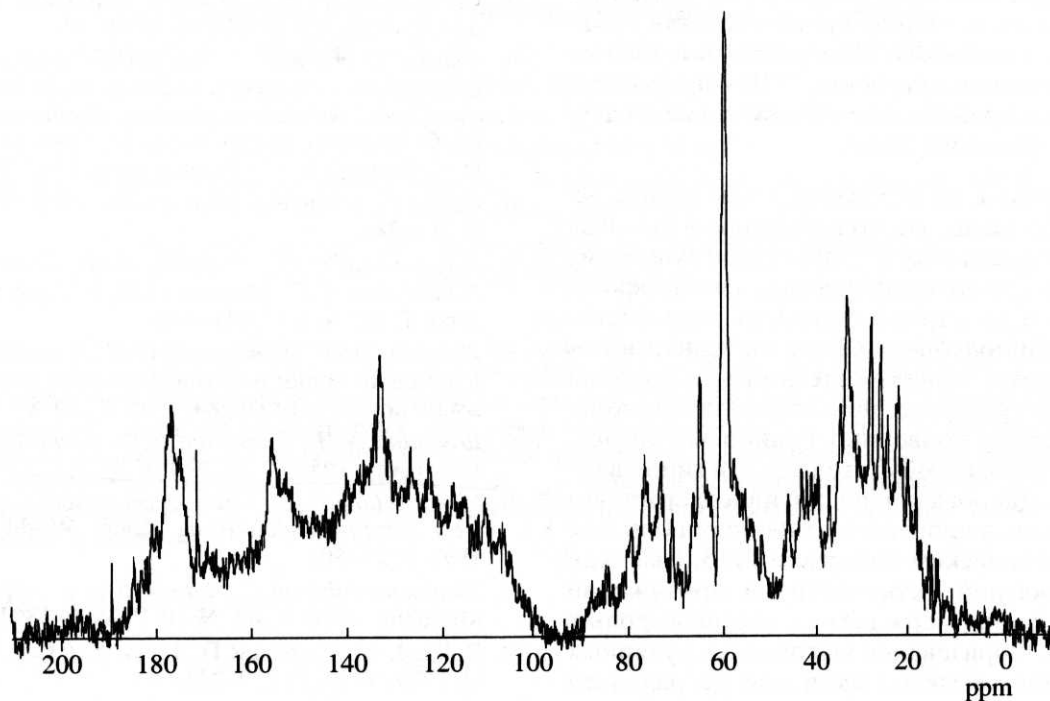


Рис. 5. Спектр ЯМР ^{13}C ГПВ, образованного при совместном культивировании культур *C. maxima* и *C. hirsutus*.

выделенные препараты близки другим микробным ГПВ [9], а также природным ГК [30].

На рис. 5 представлен спектр ЯМР ^{13}C препарата ГПВ, полученного при совместном культивировании *C. hirsutus* и *C. maxima*. Условия прове-

дения эксперимента (интервал между импульсами T_d равен 4 с) позволяли количественно оценить содержание углерода с различным химическим окружением [19]. Процентное содержание каждого типа атомов углерода от общего содержания С представлено в табл. 4. Содержание углерода в

Таблица 3. Качественная и количественная характеристика спектра ЯМР C^{13} ГПВ, образующих при совместном культивировании штаммов *C. maxima* и *C. hirsutus*

Типы атомов углерода	Спектральная область, ppm	Количество атомов углерода, %
Незамещенные алифатические атомы С	5–50	26.0
Алифатические атомы С, связанные простой связью с гетероатомом (О или N)	50–95	22.0
Ацетальные атомы С, связанные простыми связями с двумя атомами кислорода	95–105	1.5
С- и Н-замещенные ароматические атомы С	105–145	28.0
О-замещенные ароматические атомы С	145–160	9.5
Атомы С карбоксильных, сложноэфирных и амидных групп	160–188	12.0
Атомы С кетонных и хинонных групп	188–220	1.0

составе ароматических фрагментов (37%) и карбоксильных групп (12%), а также большое сходство с профилями спектров почвенных и торфяных гуминовых кислот позволяет говорить о близости исследованных ГПВ к классу гуминовых кислот [27]. Наибольшее соответствие наблюдается между спектрами ГПВ и спектрами ГК почв [27]. Наличие резонансов в области 50–58 ppm, обусловленных метоксильными группировками, указывает на растительный источник происхождения гуминоподобного комплекса. Для детальной оценки сходства и различия в строении ГПВ и природных ГК наиболее современным методом является двумерная спектроскопия ЯМР.

Таким образом, на основании проведенных исследований показано, что по поведению в щелочах и кислотах, элементному и структурно-групповому составу, гель-хроматографическим, спектрофотометрическим и спектроскопическим характеристиками гуминоподобные вещества, синтезируемые различными базидиомицетами при росте на растительном субстрате, наиболее близки, но не идентичны классу почвенных гуминовых кислот. Кроме того, грибы-возбудители белой гнили в условиях культивирования на лигнинсодержащем сырье образуют в процессе метаболизма близкие по физико-химическим свойствам ГПВ. Высокий уровень лакказной активности на протяжении всего процесса подтверждает ее ведущую роль в синтезе ГПВ. Образование высокомолекулярных ГПВ, вероятно, вызвано активной деградацией лигниноуглеводного комплекса и сополимеризацией высвободившихся пропиленфенольных радикалов и аминокислот в высокомолекулярные соединения. Можно предположить, что таким способом культура гриба пытается защитить себя от негативного воздействия многочисленных низкомолекулярных пропиленфенольных метаболитов.

Работа поддержана грантом РФФИ “Молекулярный механизм биodeградации пестицидов оксидазми базидиомицетов” 01-04-48507.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Орлов Д.С. Гумусовые кислоты почв и общая теория гумификации. М.: Изд-во МГУ, 1990. С. 66–275.
2. Христева Л.А. // Гуминовые удобрения. Теория и практика их применения. Тр. Херсонск. с.-х. инст. 1957. С. 75–108.
3. Ferrara G., Loffredo E., Simeone R., Senesi N. // Environ. Toxicol. 2000. V. 15. № 5. P. 513–517.
4. Севостьянова Н.В. // Вопр. курортол. фисеотер. леч. культ. 1998. Т. 4. С. 46–47.
5. Shankel D.M., Kuo S., Haines C., Mitscher L.A. // Extracellular interception of mutagens. In Antimutagenesis and Anticarcinogenesis Mechanisms III // Ed. G. Bronzetti, H. Hayatsu, S. De Flora, M.D. Waters, D.M. Shankel; N.-Y.: Plenum Press, 1993. P. 65–74.
6. Davies G. // Nucleus Proceedings. 1996. V. 17. № 4. P. 213–216.
7. Низковская О.П., Шиврина А.Н., Ловягина Е.В., Платонова Е.Г., Милова Н.М. // Микробиология. 1960. Т. 34. № 3. С. 441–445.
8. Шиврина А.Н., Низковская О.П., Платонова Е.Г. // Кормовые белки и физиол. активн. вещества для животнов. М.–Л.: Наука, 1965. С. 80–87.
9. Шиврина А.Н., Ловягина Е.В., Платонова Е.Г. // Биохимия. 1959. Т. 24. № 1. С. 67–72.
10. Messerschmidt A. // Multicopper Oxidases. Singapore–New Jersey–London–Hong Kong: World Scientific, 1997. P. 23–80.
11. Ruttimann-Johnson C., Lamar R.T. // Appl. Environ. Microbiol. 1996. V. 62. № 10. P. 3890–3893.
12. Bollag J.-M., Sjoblad R.D., Liu S.-Y. // Can. J. Microbiol. 1979. V. 25. P. 229–233.
13. Chefetz B., Chen Y., Hadar Y. // Appl. Environ. Microbiol. 1998. V. 64. № 9. P. 3175–3179.
14. Koroleva-Skorobogat'ko O., Stepanova E., Gavrilova V., Morozova O., Lubimova N., Dzchafarova A., Yaropolov A., Makower A. // J. Biotechnol. Appl. Biochem. 1998. V. 28. № 1. P. 47–54.
15. Paszczyński A., Crawford R.L., Huynh V.-B. Methods Enzymol. // Ed. Wood W.A., Kellogg S.T. New York: Acad. Press. 1988. V. 161. P. 264–271.
16. Оболенская А.В., Шеголев В.П., Аким Г.Л., Аким Э.Л., Коссович Н.Л., Емельянова И.З. Прак-

- тические работы по химии древесины и целлюлозы. М.: Лесная пром-сть, 1965. 412 с.
17. Шиврина А.Н. // Почвоведение. 1962. Т. 11. С. 51–60.
 18. Орлов Д.С., Гришина Л.А., Ерошичева Н.Л. // Практикум по биохимии гумуса. М.: Изд-во МГУ, 1969. С. 106.
 19. Ковалевский Д.В., Пермин А.Б., Перминова И.В., Петросян В.С. // Вестник МГУ. Сер. 2. Химия. 2000. Т. 41. С. 39–42.
 20. Koroleva O.V., Gavrilova V.P., Stepanova E.V., Lebedeva V.I., Sverdlova N.I., Landesman E.O., Yavmetdinov I.S., Yaropolov A.I. // Enzyme Microbiol. Technol. 2002. V. 30. № 4. P. 573–580.
 21. Степанова Е.В., Королева О.В., Васильченко Л.Г., Карапетян К.Н., Ландесман Е.О., Явметдинов И.С., Козлов Ю.П., Рабинович М.Л. // Прикл. биохимия и микробиология. 2003. Т. 39. № 1. С. 74–84.
 22. Соловьев В.А., Мальшева О.Н., Малева И.Л., Саплина В.И. // Химия древесины. 1985. Т. 6. С. 94–100.
 23. Sanchez-Ferrer A., Rodriguez-Lopez J.N., Garcia-Canovas F., Garcia-Carmona F. // Biochim. biophys. Acta. 1995. V. 1247. P. 1–11.
 24. Mester T., Field J.A. // FEMS Microbiol. Lett. 1997. V. 155. P. 161–168.
 25. Екабсоне М.Я., Крейцберг З.Н., Сергеева В.Н., Кирибаум И.З. // Химия древесины. 1978. № 2. С. 61–64.
 26. Rice J.A., MacCarthy P. // Org. Geochem. 1991. V. 17. P. 635–648.
 27. Перминова И.В. Анализ, классификация и прогноз свойств гумусовых кислот: Автореф. дис. ... докт. хим. наук. М.: МГУ им. Ломоносова, 2000. 50 с.
 28. Visser S.A. // Environ. Sci. Technol. 1983. V. 17. P. 412–417.
 29. Perminova I.V., Frimmel F.H., Kovalevskii D.V., Abbt-Braun G., Kudryavtsev A.V., Hesse S. // Wat. Res. 1998. V. 32. P. 872–881.
 30. Stevenson F.J. // Humus Chemistry. Genesis, Composition, Reactions. N.Y.: Wiley, 1988. P. 264–270. ✓

Isolation and Characterization of Humin-like Substances Produced by Wood-degrading Fungi Causing White Rot

I. S. Yavmetdinov*, E. V. Stepanova*, V. P. Gavrilova**,
B. V. Lokshin***, I. V. Perminova***, and O. V. Koroleva*

Bach Institute of Biochemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia;

e-mail: ildar26@pisem.net

Komarov Institute of Botany, Russian Academy of Sciences, St.-Petersburg, 197022 Russia;

e-mail: valeria@vg2438.spb.edu

Nesmeyanov Institute of Organoelement Compounds, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia;

e-mail: bloksh@ineos.ac.ru

Moscow State University, Faculty of Chemistry, Moscow, 119899 Russia;

e-mail: iperm@cityline.ru

Abstract—Three samples of high-molecular-weight humin-like substances were obtained by solid-phase cultivation of *Coriolus hirsutus* and/or *Cerrena maxima* on oat straw. The yield of humin-like substances amounted to 1.38–2.26% of the weight of the plant substrate consumed. These substances, produced both by individual and mixed cultures of the basidiomycetes, were shown to be similar in their structure and physicochemical properties. According to the data of IR and ¹³C-NMR spectroscopy, the substances contained aromatic fragments and were close to soil humic acids. Studies of the dynamics of laccase production suggested that the humin-like substances were produced via direct degradation of lignin macromolecules with direct involvement of extracellular laccase.