

УДК 579.22:582.282

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ГРИБНОГО МЕЛАНИНА И ГУМИНОПОДОБНЫХ ВЕЩЕСТВ, СИНТЕЗИРУЕМЫХ *Cerrena maxima* 0275

© 2007 г. О. В. Королёва*, Н. А. Куликова**, Т. Н. Алексеева***, Е. В. Степанова*, В. Н. Давидчик*, Е. Ю. Беляева**, Е. А. Цветкова****

*Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, Москва, 119071; e-mail: v davidchik@gmail.com

**Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, 119992

***Всероссийский научно-исследовательский институт пивоваренной, безалкогольной и винодельческой промышленности РСХАН, Москва, 119021

****Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского, Москва, 117913

Поступила в редакцию: 10.01.2006 г.

Проведены сравнительные исследования грибного меланина и двух препаратов высокомолекулярных гуминоподобных веществ, образующихся при твердофазном культивировании базидиомицета *Cerrena maxima* 0275, в течение 45 и 70 сут. Грибной меланин из *Aspergillus niger* и препараты гуминоподобных веществ, синтезируемых базидиальным грибом *C. maxima* 0275, близки по физико-химическим свойствам (элементный состав, поведение в кислотах и щелочах) и ауксиноподобной активности. На структурном уровне эти биополимеры значительно отличаются друг от друга. По данным ИК-спектроскопии, полученные гуминоподобные вещества имеют большее сходство с природными гуминовыми кислотами и более разнообразны по функциональным группам по сравнению с грибными меланинами. Предполагается, что это связано с участием в образовании гуминоподобных веществ лакказы, включающим не только синтез этих полимеров, но и их модификацию и деградацию.

Меланины – высокомолекулярные пигменты, синтезируемые растениями, грибами, бактериями и гельминтами [1–3], представляют собой полимеры фенольной и (или) индольной природы [4]. Исследования природы меланинов и особенностей их метаболизма показали полифункциональность данных соединений (фармакотерапевтические эффекты при лечении заболеваний различного генеза), что поставило их в ряд перспективных компонентов при создании новых поколений лекарственных форм. Общепринято, что меланины играют роль универсальных протекторов у живых организмов при воздействии факторов мутагенной и канцерогенной природы на клеточном уровне. Однако в настоящее время нет единого мнения даже по содержанию самого термина меланины.

Согласно современной классификации, меланины делятся на две группы: эумеланины (нерастворимые черные и темно-коричневые пигменты) и феомеланины (растворимые в щелочах пигменты желто-красно-коричневого цвета). При этом различают два пути синтеза указанных групп меланинов [5], приводящих к принципиальным различиям в строении и свойствах эу- и феомеланинов. Общепринято, что эумеланины не могут быть предшественниками гуминовых веществ (ГВ) [6], в то время как пути превращений феомеланинов в окружающей среде и возможность их включения в ГВ установлены. По физико-химическим свойствам и

структурным характеристикам феомеланины наиболее близки к гуминовым веществам, о чем свидетельствует их поведение в растворителях, особенности элементного состава, спектральные характеристики (оптические, инфракрасные и ЯМР-спектры) и низкое содержание полисахаридов [7, 8]. В отличие от эумеланинов, биосинтез феомеланинов микробного происхождения включает ряд ферментативных стадий, катализируемых фенолоксидазами (тирозиназы, лакказы и катехолазы), хотя возможны и другие пути синтеза. Для *Cryptococcus neoformans* установлено, что меланизация катализируется лакказой (КФ 1.14.18.1) [9], которая является продуктом одного гена (CNLAC1) [10]. Фитопатогенный аскомицет *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* синтезирует лакказу, участвующую в формировании меланиновых пигментов и деполимеризации лигнина, принадлежащего инфицированным растениям [11].

Лакказы и продуцирующие их базидиальные грибы в настоящее время широко используются в биотехнологиях утилизации лигнинсодержащих отходов и при рекультивации сред, загрязненных полихлорированными бифенилами (ПХБ), полиароматическими углеводородами (ПАУ), синтетическими красителями и пестицидами.

Исследования, направленные на идентификацию и изучение свойств гуминоподобных веществ (ГПВ), синтезируемых базидиомицетами являют-

ся актуальными. Нерешенной остается проблема положения ГПВ в ряду других природных полимеров, образующихся в сходных условиях, таких, как меланины и ГВ. Принимая во внимание мнение ряда исследователей [4], что уникальная полифункциональность меланинов вытекает из характера самого процесса их синтеза, можно рассматривать синтез ГПВ с участием лакказы как модель образования биополимеров с определенными свойствами (антиоксидантные, антимутагенные и антиканцерогенные).

Нашими предыдущими исследованиями было показано, что в синтезе ГПВ базидиальными грибами принимает участие лакказы [12]. Следовательно, сходство путей биосинтеза грибных ГПВ и грибных меланинов (феомеланинов) может быть обусловлено участием лакказы – внеклеточной оксидазы базидиомицетов. Анализируя данные литературы, можно сделать вывод, что главное отличие этих двух видов полимеров основано на источнике их происхождения, месте локализации и условиях образования. У грибов белой гнили, выращенных на средах с растительным субстратом, ГПВ образуются, главным образом, вне клетки, тогда как меланиновые пигменты, как правило, прочно связаны с клеточной стенкой. Следует подчеркнуть, что грибы белой гнили не относятся к активным продуцентам меланинов, но способны образовывать ГПВ из продуктов деградации лигнина. Таким образом, меланины и ГПВ имеют много общих черт: стохастичность, значительная гетерогенность структуры и высокая устойчивость к биодеградации, участие полифенолоксидаз, в частности лакказ, в их биосинтезе, а наиболее значительное отличие – их локализация.

Роль лакказы в процессе биосинтеза грибного меланина может быть оценена путем сравнения состава, свойств и биологической активности грибного меланина, в биосинтезе которого данный фермент не принимает участия [13] и продуцируемых грибами ГПВ, образуемых при непосредственном участии лакказы. В качестве объекта исследования был выбран грибной меланин, синтезируемый *A. niger* из ацетата с образованием в качестве промежуточного продукта 1,8-дигидрокси-нафталина без участия лакказы [14] и ГПВ, синтезируемые базидиальным грибом *Cerrena maxima* 0275.

Цель работы – сравнительная характеристика грибного меланина из *A. niger* и ГПВ, синтезируемых базидиальным грибом *C. maxima* 0275 возбудителем “белой гнили”, в процессе роста на лигнинсодержащем субстрате.

МЕТОДИКА

Получение гуминоподобных веществ. Базидиальный гриб *C. maxima* 0275 (коллекция культур базидиомицетов Ботанического института им. В.Л. Ко-

марова РАН) выращивали твердофазным способом на овсяной соломе в качалочных колбах на 750 мл в стационарных условиях при 37°C в течение 45 и 70 сут, как описано ранее [15]. Среда для культивирования на соломе, вносимая в каждую колбу в количестве 50 мл, содержала CuSO_4 [16] и не содержала глюкозы. В колбу вносили 30 мл гомогенизированного инокулята, полученного при поверхностном выращивании культур [16]. В процессе культивирования поддерживали 80%-ную влажность в колбах.

Выделение темноокрашенной фракции ГПВ проводили по описанной ранее методике [17]. После 45 и 70 сут выращивания в колбы, содержащие культуры грибов, заливали теплую (60°C) дистиллированную воду в количестве 150 мл на колбу и оставляли на 6 ч при постоянном перемешивании.

Далее жидкость фильтровали, отделяя солому с мицелием, с использованием бумажного фильтра. В фильтрат добавляли концентрированную HCl по каплям до pH 2.0. Раствор оставляли на 24 ч при 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 проводили ≥ 24 ч и заканчивали при достижении диализуемого раствора pH 4.5. Диализованные препараты ГПВ, синтезируемые базидиомицетом в течение 45 (ГПВ-45) и 70 (ГПВ-70) сут культивирования, высушивали в вакууме при -18°C в течение 12 ч. Препараты ГПВ представляли собой темно-окрашенный порошок.

Получение меланина из грибов. Меланин из *Aspergillus niger* был предоставлен профессором Б.Н. Огарковым (НИИ биологии при Иркутском государственном университете).

Предоставленный меланин был получен согласно общепринятой методике. Культивирование продуцента проводили согласно [6, 18] на минеральной среде, содержащей глюкозу, при 26°C до появления сильной пигментации мицелия. Мицелий отделяли фильтрованием, промывали дистиллированной водой и замораживали при -16°C. Мицелий подвергали щелочному гидролизу (0.1 M NaOH) с последующим осаждением концентрированной HCl. Полученный осадок центрифугировали при 7000 g в течение 30 мин, промывали дистиллированной водой, затем снова центрифугировали и диализовали против дистиллированной воды. Диализ проводили не менее 24 ч и заканчивали при достижении диализуемого раствора pH 4.5. Диализованный препарат грибного меланина (ГМ) высушивали при 40°C.

Элементный анализ. С,Н,N,S-анализ был выполнен на элементном анализаторе модели 1106 фирмы “Carlo Erba Strumentazione” (Италия). Содержание кислорода рассчитывали по разности между массой беззольной навески и суммарным содержанием С, Н, N. Зольность определяли сжиганием препарата в муфельной печи.

Определение молекулярной массы. Гель-хроматографическое определение молекулярной массы и обработку полученных хроматограмм проводили согласно [19]. В качестве фракционирующего геля использовали “Toyopearl-55 HW(S)” (Япония), размеры колонки составляли 20 мм × 25 см. Пробы ГПВ-45, ГПВ-70 и ГМ растворяли в 0.028 М фосфатном буфере (рН 6.8), который использовали в качестве подвижной фазы при проведении фракционирования. Концентрация ГПВ-45, ГПВ-70 и ГМ во фракционируемых пробах составляла 50 мг/л. Объем инжектируемой пробы 1 мл, скорость элюирования 1 мл/мин. Регистрацию проводили с использованием УФ-детектора (модель 115, “Gilson”, США) при 254 нм. На основании полученных данных рассчитывали значения средневесовой молекулярной массы (**Мм**) и показатель полидисперсности M_w/M_n (M_w – среднечисленная молекулярная масса).

Потенциметрическое определение кислотных групп. Определение содержания кислотных групп в исследуемых препаратах проводили методом потенциметрического титрования в соответствии с [19]. Навеску препаратов 10 мг растворяли в 1 мл 0.1М NaOH и добавляли 5 мл дистиллированной воды. После полного растворения пробы к раствору приливали 1 мл 0.1М HCl. Полученный раствор титровали на автотитраторе (“Metrom”, Германия) раствором 0.02М NaOH до рН 11.0, раствор щелочи прибавляли порциями по 0.05 мл. Параллельно проводили титрование смеси 1 мл 0.1М NaOH + 5 мл дистиллированной воды + 1 мл 0.1М HCl. По разнице кривых титрования исследуемых препаратов в смеси соляной кислоты и гидроксида натрия и кривой титрования смеси соляной кислоты и гидроксида натрия определяли кривую титрования собственно препаратов. При расчете предполагали, что карбоксильные группы (COOH) титруются в диапазоне рН от 3.0 до 7.0, а фенольные (PhOH) – от 7.5 до 11.0.

Спектрофотометрический и ИК - спектроскопический анализ. Для исследования ГПВ-45, ГПВ-70 и ГМ готовили 0.01%-ные растворы веществ в 50 мМ калий-фосфатном буфере (КФБ) при рН 6.0. Спектры поглощения регистрировали в кюветах с длиной оптического пути 1 см на спектрофотометре (Beckman, DU 650, “Beckman” США). На основании экспериментальных данных рассчитывали коэффициент цветности E_{465}/E_{665} , который представляет собой отношение оптиче-

ских плотностей растворов при длинах волн 465 и 665 нм [21].

ИК-спектры ГПВ-45, ГПВ-70 и ГМ регистрировали на ИК-спектрометре с Фурье-преобразователем Magna-750 (“Nicolet”, США). Образцы готовили путем прессования таблеток из КВг с ГПВ-45, ГПВ-70 и ГМ (концентрация 0.33%) под давлением 7 т/см².

Определение ауксиноподобной активности. Биотест по определению ауксиноподобной активности ГПВ-45, ГПВ-70 и ГМ проводили на проростках мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L., сорт “Московская-39”) согласно общепринятой методике [22]. У проростков пшеницы приблизительно одинакового размера, выращенных в темноте в течение 3 сут, отделяли coleoptили и отрезали лезвием сегмент длиной около 5 мм, отступая от верхушки 4 мм, чтобы избежать влияния эндогенных ауксинов. Из отрезка coleoptиля капилляром удаляли первичный лист и помещали отрезок в чашку Петри с водой. Отрезки нанизывали по 3 шт. на стеклянный капилляр, измеряли общую длину и помещали в чашки Петри (3 капилляра на чашку) с испытуемыми растворами (ГПВ-45, ГПВ-70 и ГМ). Затем чашки Петри помещали в термостат при 25°C. Через 72 ч проводили повторное измерение длины coleoptилей. Об ауксиноподобной активности исследованных препаратов судили на основании относительного прироста coleoptилей, рассчитываемого как:

$$\frac{L_k - L_n}{L_n} 100\%,$$

где L_k и L_n – общая длина 3 coleoptилей в конце и в начале эксперимента соответственно. В контрольном варианте (5 мМ КФБ, рН 6.0), этот показатель составил 82%.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Выделенные препараты ГПВ-45, ГПВ-70 и ГМ характеризовали по следующим показателям: элементный состав, молекулярная масса, структурно-групповой состав, спектральная характеристика и биологическая активность.

Элементный состав. Данные по элементному составу исследованных препаратов приведены в табл. 1. Для ГМ было характерно более низкое содержание углерода (41.8%) по сравнению с препаратами ГПВ-45 и ГПВ-70 (59.8 и 53.6% соответственно). Следует отметить, что низкое содержание углерода в грибных меланинах приведено в работах различных авторов [3, 6], что обусловлено, очевидно, особенностями его биосинтеза, а именно составом соединений, используемых для синтеза этого биополимера. По содержанию углерода грибные меланины сравнимы с гуминовыми кислотами (ГК) [23] природных вод и дерново-под-

Таблица 1. Элементный состав гуминоподобных веществ, продуцируемых *S. maxima* (ГПВ-45 и ГПВ-70), и меланина *A. niger* (ГМ)

Образец	Содержание элементов, масс %				Атомные отношения		
	С	Н	N	О	H/C	C/N	O/C
ГПВ-45	59.8 ± 0.2	6.1 ± 0.1	4.3 ± 0.3	29.8 ± 0.2	1.22	16.14	0.37
ГПВ-70	53.6 ± 0.1	4.6 ± 0.1	2.6 ± 0.2	39.2 ± 0.2	1.03	23.69	0.55
ГМ	41.8 ± 0.2	5.7 ± 0.1	4.2 ± 0.3	48.3 ± 0.2	1.62	11.68	0.87

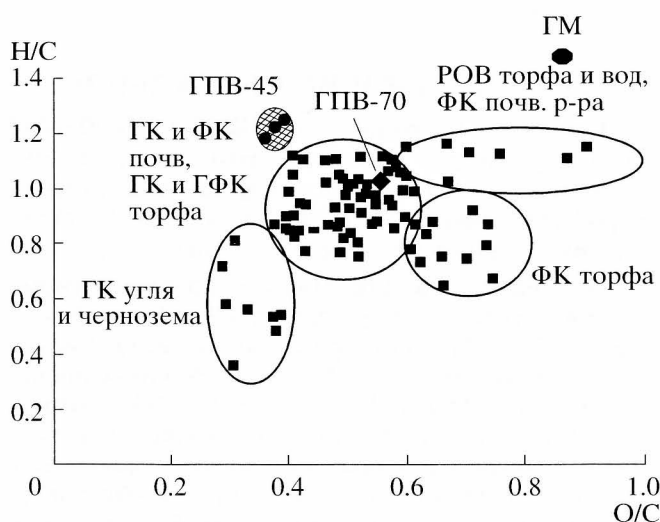
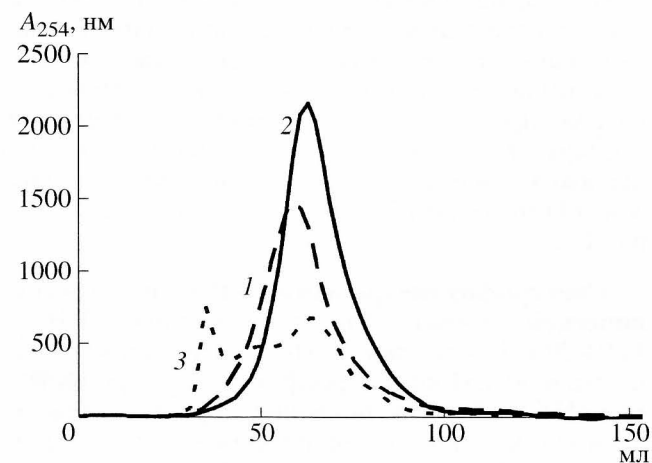
золистых почв, тогда как ГПВ по этому показателю приближаются к высоко ароматичным препаратам ГК из угля, чернозема и низинного торфа.

Высокое содержание водорода наблюдается для всех исследованных препаратов. Для ГПВ-45, ГПВ-70 и ГМ этот показатель составил 6.1, 4.6 и 5.7% соответственно, что нехарактерно для природных ГК. Обращает на себя внимание высокое и практически одинаковое содержание азота в ГМ (4.2%) и ГПВ-45 (4.3%) по сравнению с ГПВ-70 (2.6%). Можно предположить, что в процессе культивирования базидиомицетов уже синтезированные ГПВ претерпевают ряд изменений, причем это связано не только с их частичной деградацией [6, 24], но и созданием “низкоароматической структуры” вследствие трансформации и модификации периферийной части и(или) ядра. Однако одновременно происходит уменьшение атомных соотношений H/C, характеризующих вклад алифатических фрагментов в структуру ГК, в ряду ГМ, ГПВ-45 и ГПВ-70: 1.62, 1.22 и 1.03 соответственно.

Установленные особенности элементного состава изученных препаратов и их место в ряду гу-

миновых веществ различного происхождения и фракционного состава хорошо иллюстрируется их положением на диаграмме Ван-Кревелена (рис. 1). Как видно из рис. 1, ГМ значительно удалены от всех групп как гуминовых, так и фульвокислот, что подтверждает немеланиновую теорию происхождения ГВ. Препарат ГПВ-45, несмотря на близкое положение к группе почвенных и торфяных ГК и ФК, не относится к указанным ГВ, в то время как ГПВ-70 попадает в эту группу [23]. Таким образом, данные по элементному составу изучаемых препаратов доказывают близость ГПВ к ряду природных ГВ, тогда как грибные меланины, синтезируемые по “эумеланиновому” типу, являются принципиально отличными органическими веществами.

Молекулярная масса (Мм). На рис. 2 приведены гель-хроматограммы ГМ, ГПВ-45 и ГПВ-70. Как видно из рисунка, профили препаратов ГПВ характеризовались одним широким пиком. Препарат ГПВ-45, однако, имел меньшее время элюции, что свидетельствует о его большей, по сравнению с ГПВ-70, молекулярной массе. Рассчитанные значения средневесовых молекулярных масс (Мм) для ГПВ-45 и ГПВ-70 составили 98.0 и 79.6 кДа соответственно. При этом одновременно

**Рис. 1** Диаграмма Ван-Кревелена [28] и положение на ней гуминоподобных веществ, продуцируемых *S. maxima* (ГПВ-45 и ГПВ-70), и меланина *A. niger* (ГМ).**Рис. 2** Гель-хроматограммы гуминоподобных веществ, продуцируемых *S. maxima* ГПВ-45 (1) и ГПВ-70 (2) и меланина *A. niger* ГМ (3).

наблюдали снижение значений полидисперсности с 1.6 до 1.4, что подтверждает предположение о частичной деградации ГПВ в процессе культивирования базидиомицетов. Профиль элюции ГМ значительно отличался от профилей элюции препаратов ГПВ. Отношение M_w/M_w^{cp} для этого препарата составило 2.5, что свидетельствует о его большей, по сравнению с препаратами ГПВ, полидисперсности. Действительно, в отличие от мономодального распределения, характерного для ГПВ-45 и ГПВ-70, для ГМ наблюдали три пика: острый пик в области свободного объема колонки и два диффузных пика с объемами элюции, сходными с препаратами ГПВ. Полученные результаты свидетельствуют о том, что в составе ГМ присутствует высокомолекулярная фракция. Это подтверждается высоким значением рассчитанной средневесовой молекулярной массы, составившей 153 кДа.

Спектральные свойства. Спектры поглощения. Щелочные растворы ГМ и ГПВ в УФ- и видимой областях спектра представляют собой ниспадающие кривые без характеристических полос поглощения (рис. 3). Значительное поглощение в УФ-области, ослабевающее с увеличением длины волны, и небольшое “плечо” при длине волны 280 нм характерно для всех исследуемых препаратов. На основании полученных экспериментальных данных рассчитывали коэффициенты цветности E_{465}/E_{665} , которые для ГМ, ГПВ-45 и ГПВ-70 составили 4.6, 7.0 и 10.9 (табл. 2). Аналогичный показатель для гуминовых кислот дерново-подзолистых почв по данным [23] варьирует в диапазоне 3.4–4.5. Это свидетельствует о меньшей, по сравнению с ГК почв, обогащенности ГПВ и ГМ алифатическими фрагментами. При этом в изученном ряду препаратов меланин из *A. niger* характеризовался наибольшим относительным содержанием ароматических составляющих.

ИК-спектры. На рис. 4 представлены спектры исследованных препаратов. На всех трех спектрах наблюдается широкая интенсивная полоса поглощения в области 3150–3250 cm^{-1} , что соответствует валентным колебаниям ОН-группы. Небольшие пики в области 2935 и 2848 cm^{-1} могут вызываться колебаниями алифатических групп CH_2 и CH_3 . Хорошо заметное плечо в области 1720–1722 cm^{-1} соответствует колебаниям $C=O$ -

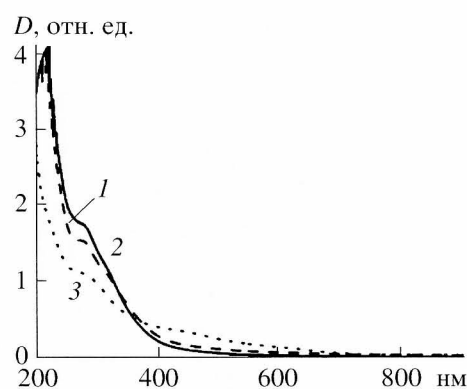


Рис. 3. Спектры поглощения гуминоподобных веществ, продуцируемых *S. maxim* ГПВ-45 (1) и ГПВ-70 (2), и меланина *A. niger* ГМ (3) в 50 мМ калий-фосфатном буфере, рН 6.0, при 25°C.

групп в составе кислот, сложных эфиров и кетонов и является типичным для гуминовых веществ. Однако это плечо присутствует только в спектрах ГПВ. Пик около 1600 cm^{-1} , отвечающий колебаниям $C=C$ -связей в конденсированной ароматической системе, отчетливо представлен на спектрах всех трех препаратов. Четкий пик в области 1499–1505 cm^{-1} на спектрах ГПВ может быть отнесен к плоскостным колебаниям $C=C$ -связей в ароматическом кольце, однако в спектре ГМ данный пик не наблюдается. Поглощение в области 1463 cm^{-1} дают группы CH_3 и CH_2 . За небольшой пик в области 1420–1423 cm^{-1} могут быть ответственны группы CH , OH , COO^- , присутствующие в ГК [24, 27]. Поглощение с максимумом в области 1268–1270 cm^{-1} может быть вызвано валентными колебаниями связи $C-O$ первичных и вторичных спиртовых групп. Характерная область поглощения с пиком при 1211 cm^{-1} вызвана колебаниями связей $C-O$ в кислотных, сложноэфирных и фенольных группах. По интенсивности поглощения в этой области можно судить о степени метоксилированности исследуемых препаратов, которая уменьшается у ГПВ-70 по сравнению с ГПВ-45. Поглощение в области 1131 cm^{-1} может быть связано с колебаниями связи $C-O$ спиртовых групп, в области 1123–1048 cm^{-1} – с колебаниями $C-O$ -связи углеводных и спиртовых групп и наблюдается во всех спектрах. Сравнение перечисленных выше атомных группировок сви-

Таблица 2. Молекулярно-массовое распределение, содержание кислотных групп и коэффициенты цветности исследованных гуминоподобных веществ, продуцируемых *S. maxima* (ГПВ-45 и ГПВ-70), и меланина *A. niger* (ГМ)

Образец	Мм, кДа	M_w/M_w^{cp}	COOH, мЭкв/г	PhOH, мЭкв/г	E_{465}/E_{665}
ГПВ-45	98.0 ± 0.7	1.6	0.7 ± 0.1	1.9 ± 0.3	7.0
ГПВ-70	79.6 ± 0.8	1.4	0.8 ± 0.1	1.7 ± 0.3	10.9
ГМ	153 ± 3	2.5	–	0.7 ± 0.1	4.6

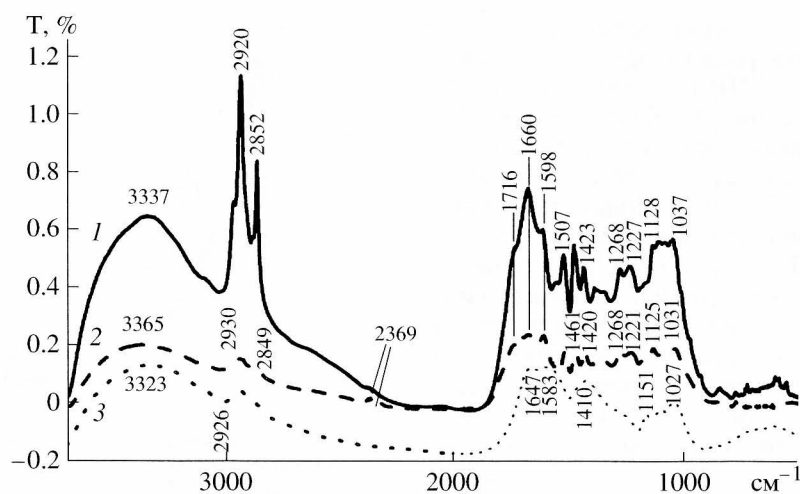


Рис. 4. ИК-спектры гуминоподобных веществ, продуцируемых *C. maxima* ГПВ-45 (1) и ГПВ-70 (2), и меланина *A. niger* ГМ (3) в таблетках КВг.

детельствует о том, что препараты ГПВ базидиомицетов имеют большее сходство с природными ГК [28] и значительно более разнообразны по функциональным группам по сравнению с ГМ.

Потенциометрическое определение кислотных групп. Результаты проведенного потенциометрического титрования (табл. 2) показали, что препараты ГПВ-45 и ГПВ-70 значительно отличаются по содержанию фенольных функциональных групп как от природных гуминовых веществ, так и от исследованного ГМ. Приводимый в литературе диапазон суммарного содержания карбоксильных и фенольных функциональных групп для почвенных ГК составляет 3.0–6.0 мЭкв/г [27], что в несколько раз превышает полученные значения для обоих препаратов ГПВ. С другой стороны, метод потенциометрического титрования не

позволил обнаружить карбоксильные группы в исследованном препарате ГМ. Таким образом, данные титрования позволяют сделать вывод о принципиальном отличии исследованных ГПВ от природных ГК и грибных меланинов.

Ауксиноподобная активность. Результаты проведенной оценки ауксиноподобной активности ГМ, ГПВ-45 и ГПВ-70 приведены на рис. 5. Было установлено, что при низких концентрациях (<20 мг/л) происходила активация роста coleoptiles при внесении ГМ, ГПВ-45 и ГПВ-70 на 94, 100 и 96%, соответственно. При дальнейшем повышении концентрации (до 100 мг/л) стимулирующая активность препаратов снижалась, и значимого отличия прироста длины coleoptiles от контрольного варианта не наблюдалось. Ранее нами было отмечено сходное поведение ГВ, выделенных из почв и углей [29]. Таким образом, проведенные эксперименты свидетельствуют о том, что препараты ГПВ и ГМ характеризуются сходной ауксиноподобной активностью, не отличающейся от таковой природных ГВ.

Основываясь на полученных данных можно сделать вывод, что, несмотря на близкий элементный состав, на структурном уровне ГМ значительно отличаются от ГПВ так же, как и от природных ГК. Возможно, участие лакказы в образовании ГПВ обеспечивает большее, по сравнению с ГМ, разнообразие их функциональных группировок вследствие образования в ходе синтеза свободнорадикальных фрагментов различной природы, что, в свою очередь, обеспечивает модификацию имеющихся функциональных групп и образование новых. При этом происходит частичная деградация образующихся ГПВ, о чем свидетельствует снижение молекулярной массы в ряду ГМ–ГПВ-45–ГПВ-70. С другой стороны, можно предположить, что в природных условиях процесс

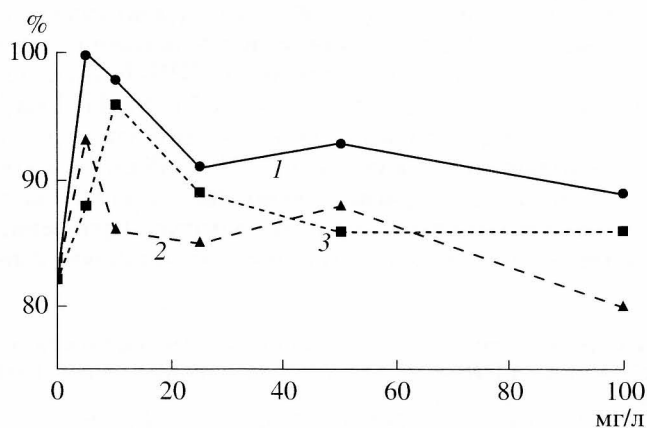


Рис. 5. Зависимость приращения длины coleoptiles (%) от концентраций гуминоподобных веществ, продуцируемых *C. maxima* ГПВ-45 (1), ГПВ-70 (2) и меланина *A. niger* ГМ (3).

ферментативной и неферментативной модификации синтезированных соединений занимает более длительный временной промежуток, что приводит к еще большей обогащенности ГВ карбоксильными и фенольными группами по сравнению с ГПВ. Следовательно, именно благодаря внеклеточной локализации, ГВ так же, как и ГПВ, являются объектами дальнейших превращений с участием ферментных систем и(или) промежуточных продуктов действия ферментов, что приводит к их постсинтетической модификации – изменению молекулярной массы и качественного и количественного состава функциональных групп. Внутриклеточное расположение ГМ позволяет им сохранить синтезированную структуру практически без изменений. Полученные данные могут быть использованы для разработки биотехнологического подхода получения биологически активных препаратов ГПВ при утилизации растительных остатков (овсяная солома). Высокая ауксиноподобная активность препарата ГПВ-45 позволяет применять его в качестве стимулятора роста растений.

Авторы статьи выражают благодарность: ООО “Завод Родник” г. Иркутск.

Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ: № 04-04-49679, МНТЦ № КР-993.2 и государственного контракта с Федеральным агентством по науке и инновациям № 02.467.11.3004 на базе Центра коллективного пользования Института биохимии А.Н. Баха РАН “Прикладные биотехнологии”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Fogarty R. V., Tobin J. M.* // *Enzyme and Microbial Technol.* 1996. V. 19. № 4. P. 311–317.
2. *Nicolaus R. A.* // *Melanins.* Paris: Hermann, 1968. 310 p.
3. *Nosanchuk J. D., Casadevall A.* // *Cell. Microbiol.* 2003. V. 5. № 4. P. 203–224.
4. *Henson J.M., Butler M.J., Day A.W.* // *Annu. Rev. Phytopathol.* 1999. V. 37. P. 447–471.
5. *Yabuuchi E., Ohyama A.* // *Int. J. System. Bacteriol.* 1972. V. 22. P. 53–64.
6. *Zavgorodnyaya Yu.A., Deminb V.V., Kurakova A.V.* // *Organic Geochem.* 2002. V. 33. № 3. P. 347–355.
7. *Haider K., Martin J.P., Filip Z.* // *Humus biochemistry* / Eds. E.A. Paul, A.D. McLaren // *Soil Biochemistry.* N. Y.: Marcel Dekker, 1975. V. 4. P. 195–244.
8. *Meuzelaar H.L.C., Haider K., Nagar B.R., Martin J.P.* // *Geoderma.* 1977. V. 17. P. 239–252.
9. *Williamson P.R.* // *J Bacteriol.* 1994. V. 176. № 3. P. 656–664.
10. *Salas S.D., Bennett J.E., Kwon-Chung K.J., Perfect J.R., Williamson P.R.* // *J. Exp. Med.* 1996. V. 184. № 2. P. 377–386.
11. *Edens W.A., Goins T.Q., Dooley D., Henson J.M.* // *Tritici Appl. Environ. Microbiol.* 1999. V. 65. № 7. P. 3071–3074.
12. *Явметдинов И.С., Степанова Е.В., Гаврилова В.П., Локишин Б.В., Перминова И.В., Королёва О.В.* // *Прикл. биохимия и микробиология.* 2003. Т. 39. № 3. С. 293–301.
13. *Romero-Martinez R., Wheeler M., Guerrero-Plata A., Rico G., Torres-Guerrero H.* // *Infect Immun.* 2000. V. 68. № 6. P. 3696–3703.
14. *Tsai H.F., Fujii I., Watanabe A., Wheeler M.H., Chang Y.C., Yasuoka Y., Ebizuka Y., Kwon-Chung K.J.* // *J. Biol. Chem.* 2001. V. 276. № 3. P. 29292–29298.
15. *Степанова Е.В., Королёва О.В., Васильченко Л.Г., Каранетян 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.
16. *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.
17. *Шиврина А. Н.* // *Почвоведение.* 1962. Т. 11. С. 51–60.
18. *Linhares I.F., Martin J.P.* // *Soil Science Society of America Journal.* V. 42. P. 738–743.
19. *Kudryavtsev A.V., Perminova I.V., Petrosyan V.S.* // *Anal. Chim. Acta.* 2000. V. 407. № 1–2. P. 193–202.
20. *Frimmel F.H., Abbt-Braun G.* // *Environ. Int.* 1999. V. 25. № 2–3. P. 191–207.
21. *Орлов Д.С., Гришина Л.А., Ерошicheva Н.Л.* // *Практикум по биохимии гумуса.* М.: Изд. МГУ, 1969. С. 106.
22. *Мокроносова А.Т.* // *Малый практикум по физиологии растений.* М.: Изд. МГУ. 1994. 183 с.
23. *Перминова И.В.* Анализ, классификация и прогноз свойств гумусовых кислот: Автореф. дисс....док. хим. наук, М.: МГУ, 2000. 50 с.
24. *Filip Z., Berthelin J.* // *Fresenius J. Anal. Chem.* 2001. V. 371. № 5. P. 675–681.
25. *Riley P.A.* // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 1997. V. 29. № 11. P. 1235–1239.
26. *Орлов Д.С.* Гумусовые кислоты почв и общая теория гумификации. М.: Изд. МГУ, 1990. 325 с.
27. *Stevenson F. J.* // *Humus Chemistry. Genesis, Composition, Reactions.* New York: Wiley and Sons, 1982. P. 264–270.
28. *Driouich A., Laine A.-C., Vian B., Faye L.* // *Plant J.* 1992. V. 2. № 1. P. 13–24.
29. *Kulikova N.A., Dashitsyrenova A.D., Perminova I.V., Lebedeva G.F.* // *Bulgarian J. Ecol. Sci.* 2003. V. 2. № 3–4. P. 55–56.

A Comparative Characterization of Fungal Melanin and the Humic-like Substances Synthesized by *Cerrena maxima* 0275

O. V. Koroleva^a, N. A. Kulikova^b, T. N. Alekseeva^c, E. V. Stepanova^a, V. N. Davidchik^a,
E. Yu. Belyaeva^b, and E. A. Tsvetkova^d

^a *Bach Institute of Biochemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071, Russia*
e-mail: v davidchik@gmail.com

^b *Moscow State University, Moscow, 119992 Russia*

^c *All-Russia Institute of Brewing, Nonalcoholic, and Wine-making Industry, Russian Academy of Agricultural Sciences, Moscow, 119021 Russia*

^d *Zelinsky Institute of Organic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, 117913 Russia*

Abstract—Comparative studies of fungal melanin and two preparations of the high-molecular-weight humic-like substances formed during a solid-phase cultivation of the basidiomycete *Cerrena maxima* 0275 for 45 and 70 days were performed. The fungal melanin from *Aspergillus niger* and the humic-like substances synthesized by the basidiomycete *C. maxima* 0275 are similar in their physicochemical properties (elemental composition and behavior in acids and alkalis) and auxin-like activities. However, these biopolymers differ, essentially, at the structural level. According to IR spectroscopy data, the obtained humic-like substances display a higher similarity to natural humic acids and are more diverse in their functional groups compared with fungal melanins. Presumably, this is connected with the fact that laccase is involved in formation of humic-like substances; moreover, this enzyme is involved not only in the synthesis of these polymers, but also in their modification and degradation.