

Н.В. Сушинская, аспирант БГУ; Т.А. Кукулянская, ассистент БГУ;
В.П. Курченко, вед. науч. сотрудник БГУ; Л.М. Шостак, мл. науч. сотрудник

ПОЛУЧЕНИЕ И ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА МЕЛАНИНОВ ИЗ БАЗИДИОМИЦЕТОВ

The physico-chemical properties of the melanin pigments isolated from various basidiomycetes were researched. The melanins under study can be referred as a class of allomelanins of pentaketids nature. The basidiomycete melanin pigments connect effectively heavy metals ions. Due to the high sorption capacity, melanins can be regarded as perspective substances for the development of biologically active additives and medicinal preparations that have enterosorptions properties.

Изучение фармакологических особенностей природных фенольных соединений, в частности конденсированных фенолов, характеризует их как класс соединений с низкой токсичностью, обладающих разнообразным биологическим действием [1, 7]. Эти свойства могут найти широкое применение в ряде областей профилактической и клинической медицины. Обширную группу природных конденсированных фенолов составляют меланиновые пигменты, имеющиеся у всех живых организмов. Наибольшее применение и, соответственно, более глубоко изучены, меланины млекопитающих и растений [2, 3, 4]. Грибные меланиновые пигменты до недавнего времени не рассматривались как возможные субстанции лекарственных препаратов, за исключением меланина из чаги березовой – стерильной формы гриба *Inonotus obliquus*. Он входит в состав экстрактивного комплекса «Бефунгин», применяющегося как противовоспалительный и противоязвенный препарат. Можно предположить, что очищенные меланиновые пигменты из таких базидиомицетов, как *Inonotus obliquus* (трутовика скошенного, чаги), *Ganoderma applanatum* (трутовика плоского), *Fomitopsis pinicola* (трутовика окаймленного), *Phellinus robustus* (трутовика ложного дубового) и других макромицетов могут быть использованы для создания фармакологических препаратов, обладающих разнообразными протекторными свойствами.

Цель данной работы заключалась в изучении физико-химических свойств меланиновых пигментов, полученных из базидиомицетов *Phellinus igniarius* и *Inonotus sp.* (щелочные экстракты были предоставлены лабораторией микологии ИнМи НАНБ), *Inonotus obliquus* и меланина из препарата «Микотон» – хитин-глюкан-меланинового комплекса *Fomes fomentarius*.

Изучение и использование меланиновых пигментов в практике затрудняется, в первую очередь, плохой растворимостью этих гетерополимеров в воде. Получение меланинов из грибов проводили методом горячей щелочной экстракции с последующим переосаждением. Экстракты очищали диализом и гель-фильтрацией. В дальнейшей работе использовались лиофильно высушенные препараты, которые существенно отличились растворимостью. Водорастворимыми были препараты из *Inonotus obliquus*, *Phellinus robustus* и меланин из «Микотона».

Изучение физико-химических характеристик меланиновых пигментов является основой их идентификации. В табл. 1 приведены физико-химические характеристики некоторых меланинов из базидиомицетов.

Физико-химические характеристики меланиновых пигментов

Источник меланина	$A^{0,001\%}$ $l=1$ см, $\lambda=465$ нм	Элементный состав, %			Содержание (COOH) групп, %	Содержание (C=O) групп, %	М. м., кДа
		N	C	H			
<i>Phellinus igniarius</i>	0,014	5,1	37	5,0	0,1	2,8	54
<i>Inonotus sp.</i>	0,020	6,8	38	5,5	0,9	1,3	50
<i>Inonotus obliquus</i>	0,04	0,7	42	5,0	0,9	3,0	57

Одним из свойств меланинов, свидетельствующих о сложности их полимерной структуры, является генерализованное поглощение света в ультрафиолете и видимом диапазоне длин волн (рис. 1). По мнению многих авторов [5, 6], высокая интенсивность светопоглощения обусловлена наличием кислородсодержащих групп, а появление C=O связи за счет окисления OH-групп увеличивает ее значения. Наличие такой корреляции подтвердилось при сопоставлении ИК-спектров и количественного определения C=O и -COOH групп.

Одной из наиболее часто используемых характеристик меланиновых пигментов являются ИК-спектры поглощения. Хотя они не позволяют получить данные о структуре меланинов, однако выявляют присутствие характерных функциональных групп и наличие определенных связей в молекуле. В спектрах пигментов присутствуют полосы, которые являются идентификационными для меланинов [7]. Полосы в области $1650-1590$ см^{-1} подтверждают наличие большого количества сопряженных систем в исследуемых препаратах меланина. Широкая полоса в области $3430-3370$ см^{-1} обусловлена, по-видимому, валентными колебаниями OH-групп.

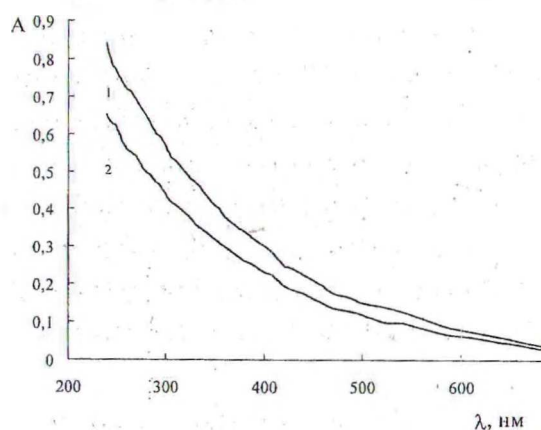


Рис. 1. Спектры поглощения 0,005% растворов меланиновых пигментов (в 0,1 н NaOH, $l=1$ см): 1 – *Phellinus igniarius*; 2 – *Inonotus sp.*

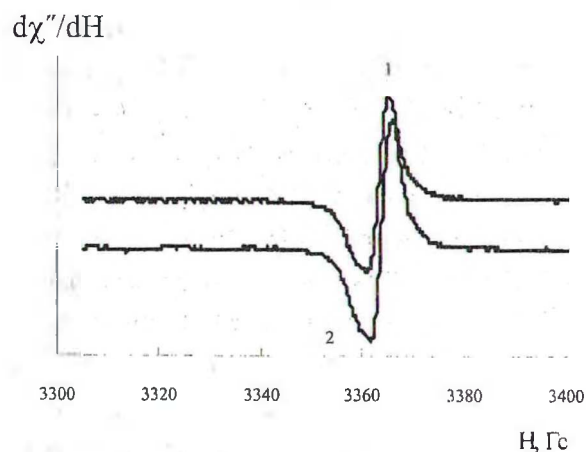


Рис. 2. Спектры ЭПР меланиновых пигментов ($SR=100$ Гс): 1 – *Phellinus igniarius*; 2 – *Inonotus sp.*

Меланиновые пигменты, независимо от своего происхождения и структурных особенностей, характеризуются стабильным парамагнитным поглощением, близким по своим качественным характеристикам к поглощению свободного электрона [8]. Это является показателем присутствия в меланинах структур с неспаренными свободными электронами. В исследованных нами образцах было зарегистрировано несколько ЭПР-сигналов (табл. 2).

Наряду с наиболее интенсивным, ранее описанным в литературе [5, 8, 9] центральным идентификационным сигналом ЭПР бензосемихинонной природы с g-фактором, близким к g-фактору свободного электрона, и шириной линии 4–7 Гс (рис. 2) были зарегистрированы дополнительные широкие сигналы ЭПР низкой интенсивностью и g-фактором $2,05 \pm 0,005$ (при $SR = 1000$ Гс).

Таблица 2

Характеристика ЭПР-сигналов меланиновых пигментов

Источник меланина	g-фактор	ΔH^{**} , Гс	ПМЦ*, 10^{17} спин/г
<i>Ph. igniarius</i>	2,0043	7,0	5,1
	2,0500	100	
	2,0500	20	
	2,0660	15	
<i>Inonotus sp.</i>	2,0043	7,2	5,3
	2,0520	100	
<i>Inonotus obliquus</i>	2,0044	5,7	7,4

*ПМЦ, спин/г – количество неспаренных электронов (содержание парамагнитных центров) в 1 г сухого вещества.

** ΔH , Гс – ширина линии спектра электронного парамагнитного резонанса.

Одним из свойств меланиновых пигментов, обусловленных их структурными особенностями, является высокая сорбционная емкость в отношении тяжелых металлов [10]. При взаимодействии с $Cd(CH_3COO)_2$, $Pb(CH_3COO)_2$ и $Co(CH_3COO)_2$ происходило осаждение пигментов в комплексе с металлами. Для выяснения полноты осаждения металлов меланинами было определено содержание меланина и металла в осадке и надосадочной жидкости после их разделения центрифугированием. Мольные соотношения металл/меланин, необходимые для полного осаждения меланина из «Микотона», были следующими: Cd^{2+} /меланин – 8,5, Co^{2+} /меланин – 11,5, Pb^{2+} /меланин – 30, а соотношение Cd и Pb и меланина из чаги – 50.

Устойчивость образующихся комплексов меланин – металл определялась по способности ЭДТА разрушать образующийся комплекс. Нами было установлено, что в концентрации ЭДТА, в 25 раз превышающей концентрацию меланина в реакционной среде, не происходит разрушение комплекса металл – меланин из «Микотона». Разрушение комплексов металлов с меланином из чаги происходило при добавлении к реакционной смеси ЭДТА в количествах, превосходящих содержание меланина в 10 раз для Cd^{2+} и в 15 раз для Pb^{2+} . Полученные результаты свидетельствуют о том, что хелатирующая способность исследованных меланиновых пигментов значительно превышает свойства ЭДТА и зависит от свойств ионов металлов.

Таким образом, данные спектроскопии (электронной, ИК, электронного парамагнитного резонанса) и количественного анализа элементного состава и содержания функциональных групп свидетельствуют в пользу хиноидной структуры исследованных меланинов. Присутствие в ИК-спектрах пигментов интенсивных полос, принадлежащих колебаниям NH-групп, сохранение этих показателей после проведения кислотного гидролиза меланиновых полимеров и сравнительно высокое содержание азота (2–5%), говорит о включении в молекулу полимеров простых фенолов, их хинонов и азотсодержащих звеньев. Сравнение элементного состава меланинов с элементным составом синтетического ДОФА-меланина [5], структурой меланиновых пигментов нафталинового (пентакетидного) типа [6, 7] дают возможность предположить, что исследованные нами грибные меланины относятся к подклассу алломеланинов пентакетидной природы. Высокая сорбционная емкость меланинов в отношении тяжелых металлов позволяет рассматривать их как перспективные субстанции для

разработки биологически активных добавок и фармпрепаратов, обладающих энтеросорбционными свойствами.

ЛИТЕРАТУРА

1. Запрёмётова М.Н. Биохимия фенольных соединений. – М.: Наука, 1993. – 272 с.
2. Hill H. The function of melanin or 6 people examine an elephant // *BioEssays*. – 1992.
3. Борщевская М.И., Васильева С.И. Развитие представлений о биохимии и фармакологии меланиновых пигментов // *Вопр. мед. химии*. – 1998. – Т. 45. – № 1. – С.13–23.
4. Барабой В.А. Меланин: структура, биосинтез, биологические функции // *Укр. биохим. журн.* – 1999. – Т. 71. – № 4. – С. 5–12.
5. Лях С.П. Микробный меланиногенез и его функции. – М.: Наука, 1981. – 275 с.
6. Butler M.J., Day J. Fungal melanins // *Can. J. Microbiol.* – 1998. – Vol. 44. – P. 1115–1136.
7. Characterization of fungal melanins and soil humic acids by chemical analysis and IR spectroscopy / Paim S., Linhares L.F., Mangrich A.S., Manin J.P. // *Biol. Fertil. Soils*. – 1990. – N 10. – P. 72–76.
8. Enochs W.S., Nilges M.J., Swanz H.V. A standardized test for the identification and characterization of melanin using electron paramagnetic (EPR) spectroscopy // *Pigm.Cell Res.* – 1993. – Vol. 6. – N 1. – P. 91–99.
9. Saiz-Jimines C., Safizadeh F. Electron spin resonance spectroscopy of fungal melanins // *Soil Sci.* – 1985. – Vol. 139. – N 4. – P. 319–325.
10. Fogarty R.V., Tobin J.M. Fungal melanins and their interaction with metals // *Enzyme Microb. Technol.* – 1996. – Vol. 19. – N 2. – P. 311–317.