

Сорбция тяжёлых металлов меланиновыми пигментами ряда дереворазрушающих грибов

© 2019. Н. В. Сушинская, н. с.,

В. П. Курченко, к. б. н., доцент, зав. лабораторией,

Белорусский государственный университет,

220030, Республика Беларусь, г. Минск, пр. Независимости, д. 4,

e-mail: kurchenko@tut.by

Объектом исследования являлись меланиновые пигменты, полученные из различных видов дереворазрушающих грибов. В результате потенциометрического титрования полученных меланинов ацетатом свинца, установлено, что эффективность связывания Pb^{2+} убывает в ряду меланинов из трутовика ложного дубового (*Phellinus robustus* (P. Karst.) Bourdotet Galzin); трутовика ложного (*Phellinus igniarius* (L.) Quel.); трутовика окаймлённого (*Fomitopsis pinicola* (Sw.) P. Karst.); трутовика плоского (*Ganoderma applanatum* (Pers.) Pat.); трутовика настоящего (*Fomes fomentarius* (L.) J.J. Kickx); трутовика скошенного, чаги (*Inonotus obliquus* (Pers.: Fr.) и изменяется от 0,170 до 0,103 мг Pb^{2+} /мг меланина. Взаимодействие исследуемых меланинов с ионами Pb^{2+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} в точке эквивалентности приводит к агрегации комплексов и выпадению их в осадок. Агрегированные хелатные комплексы ионов Cu^{2+} , Pb^{2+} , Cd^{2+} , Zn^{2+} с меланином из чаги, растворяются в присутствии различных концентраций конкурентного комплексообразователя ионов металлов – ЭДТА. При этом его концентрация, необходимая для растворения вышеуказанных комплексов, убывает от $4,5 \cdot 10^{-4}$ до $1,8 \cdot 10^{-4}$ моль/л. По данным термогравиметрии энергия активации комплекса Pb^{2+} -меланин составляет 357 кДж/моль, тогда как их механической смеси – 80–82 кДж/моль, что свидетельствует о стабилизации этого хелатного комплекса. Показано, что в молекуле меланина из чаги имеется 25 центров связывания различных металлов. Результаты ЭПР-спектроскопии хелатных комплексов, исследованных меланинов с Pb^{2+} показали увеличение количества парамагнитных центров с 10^{17} до $6,5 \cdot 10^{18}$ спин/г, что свидетельствует об участии свободнорадикальных мономеров феноксильной и бензосемихинонной природы меланинов во взаимодействии. При внутрижелудочном введении мышам хлорида меди в дозе 200 мг/кг (LD_{50}) и меланина из чаги в дозе 360 мг/кг массы, выживаемость животных возрастала до 100%, а при введении хлорида кадмия 94 мг/кг (LD_{50}) и меланина (1000 мг/кг) выживаемость достигала 80%. Полученные результаты сорбции тяжёлых металлов меланинами ряда дереворазрушающих грибов создают предпосылки их практического использования в качестве энтеросорбентов.

Ключевые слова: дереворазрушающие грибы, меланин, тяжёлые металлы, комплексообразование, токсичность.

Sorption of heavy metals by melanin pigments of wood-destroying fungi

© 2019. N. V. Sushinskaya ORCID: 0000-0003-4036-9825

V. P. Kurchenko ORCID: 0000-0002-4859-2389

Belarusian State University,

4, Prospekt Nezavisimosti, Minsk, Republic of Belarus, 220030,

e-mail: kurchenko@tut.by

The object of the study was the melanin pigments obtained from various types of wood-destroying fungi. Using the potentiometric titration lead acetate it was found that binding efficiency of Pb^{2+} decreases in the series of melanins from the *Phellinus robustus* (P. Karst.) Bourdotet Galzin; *Phellinus igniarius* (L.) Quel.; *Fomitopsis pinicola* (Sw.) P. Karst.; *Ganoderma applanatum* (Pers.) Pat.; *Fomes fomentarius* (L.) J.J. Kickx; *Inonotus obliquus* (Pers.: Fr.) – chaga and varies from 0.170 to 0.103 mg Pb^{2+} /mg melanin.

The interaction of the studied melanins with Pb^{2+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} ions in the equivalence point leads to aggregation of the complexes and their deposition in the sediment. Aggregated chelate complexes of Cu^{2+} ions, Pb^{2+} , Cd^{2+} , Zn^{2+} with chaga melanin dissolves in the presence the chelating agent EDTA. Moreover, EDTA concentration necessary for dissolving the above complexes decreases from $4,5 \cdot 10^{-4}$ to $1,8 \cdot 10^{-4}$ mol/L.

According to thermogravimetry the activation energy of the Pb^{2+} melanin complex was 357 kJ/mol. Their mechanical mixture had the activation energy of 80–82 kJ/mol, which indicates stabilization of this chelate complex. It was shown that molecule of melanin from chaga contains 25 binding sites of various metals. The results of EPR spectroscopy of chelate complexes of melanins with Pb^{2+} led to an increase in the number of paramagnetic centers from 10^{17} to $6,5 \cdot 10^{18}$ spin/g, which indicates the participation of free radical monomers of the phenoxyl and benzosemiquinone

nature of melanins in the interaction. In the process of intragastric administration to mice of copper chloride at a dose of 200 mg/kg (LD_{50}) and melanin from chaga at a dose of 360 mg/kg of weight, animal survival increased by 100%, and with the introduction of cadmium chloride at a dose of 94 mg/kg (LD_{50}) and melanin (1000 mg/kg) survival rate reached by 80%. The results of sorption of heavy metals create the prerequisites for practical use of melanins from wood-destroying fungi as enterosorbents.

Keywords: wood-destroying fungi, melanin, heavy metals, complexation, toxicity.

Известна способность базидиомицетов накапливать в плодовых телах значительные количества тяжёлых металлов (ТМ) [1]. Это связано с особенностями их строения и высоким содержанием хитина и меланина, которые способны эффективно сорбировать различные поллютанты [1–3]. Среди дереворазрушающих грибов важное место занимают трутовики, вызывающие белую и бурую гниль древесины [4]. Они широко распространены в средней полосе и являются перспективным возобновляемым источником для получения биологически активных веществ: меланинов, гликанов, хитина и других [5–8]. Меланиновые пигменты являются высокомолекулярными гетерополимерами нерегулярного химического строения [9, 10]. Эти биополимеры в зависимости от источников их получения обладают уникальными физико-химическими свойствами, которые обуславливают их фотопротекторную, генопротекторную, сорбционную и другие активности [5, 6, 9, 10]. Меланины относятся к 5 классу опасности и являются неопасными соединениями. Способность меланинов связывать ионы ТМ объясняется наличием большого количества функциональных групп, способных к комплексообразованию [3, 10, 11]. К ТМ относят металлы с плотностью более 8 г/см³. Среди них V, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Mo, Cd, Hg, Pb, Bi и др. Многие из них обладают высокой токсичностью для живых организмов в относительно низких концентрациях [3]. Для снижения их токсического действия можно использовать меланины грибного происхождения.

В связи с этим, представлялось целесообразным выделить меланиновые пигменты из плодовых тел ряда дереворазрушающих грибов, вызывающих белую и бурую гниль, исследовать их структурно-функциональные свойства, определить сорбционную ёмкость по отношению к ионам Pb^{2+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} и Zn^{2+} , и определить возможность их использования в качестве энтеросорбентов.

Материалы и методы

Объектом исследования являлись меланиновые пигменты, полученные из плодовых тел

грибов, вызывающих бурую гниль древесины – трутовика окаймлённого (*Fomitopsis pinicola* (Sw.) P. Karst.), и белую гниль – трутовиков настоящего (*Fomes fomentarius* (L.) J.J. Kickx), плоского (*Ganoderma applanatum* (Pers.) Pat.), ложного (*Phellinus igniarius* (L.) Quel.) дубового ложного (*Phellinus robustus* (P. Karst.) Bourdotet Galzin), а также стерильной формы трутовика скошенного, чаги (*Inonotus obliquus* (Pers.: Fr.). Меланиновые пигменты получали по ранее описанной методике [6, 7].

Спектрофотометрические измерения проводили на «Cary 50 Bio» (Австралия). Исследования электронного парамагнетизма осуществляли на спектрометре «Varian E-112» (США). Для расчёта g-факторов использовали в качестве эталона Mn^{2+} в порошке MgO [3, 6].

Термогравиметрический анализ (ДСК) проводили на «ТА – 4000 Mettler Toledo» (Швейцария). Измерения выполняли в интервале температур 25–600 °С в атмосфере воздуха при скорости нагрева 5 °С/мин. Энергию активации определяли по уравнению Бройдо [12].

Связывание ионов ТМ ацетата Pb^{2+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} меланинами проводили потенциометрическим титрованием в трёх повторностях. Определение количества центров связывания меланинами ионов различных металлов проводили по методу Скетчарда [3, 11].

Исследование *in vivo* энтеросорбционных свойств меланинов проводили на белых беспородных мышах средней массой 15 г. В каждом опыте использовали 40 животных. Контрольным животным внутрижелудочно вводили раствор $CdCl_2$ в дозе $LD_{50} = 94$ мг/кг или $CuCl_2$ в дозе $LD_{50} = 200$ мг/кг. Опытным животным после введения растворов ионов металлов, внутрижелудочно вводили раствор меланина из *I. obliquus* в различных дозах. Статистическую обработку результатов проводили стандартными методами с использованием программы EXCEL.

Результаты и обсуждение

Получение меланиновых пигментов.

Меланины грибов прочно связаны с хитином и белками, что делает невозможным их полное извлечение из клетки без изменения

структурно-функциональных свойств [6, 9, 10]. Использование предложенной методики выделения меланинов позволило получить природные пигменты с сохранением их нативной структуры. Выходы меланинов, полученные вышеописанным способом, составили: *Ph. igniarius* (собранные с маньчжурского ореха) – 1,6–1,7%, *Ph. robustus* (дуб) – 1,0%, *G. applanatum* (осина) – 5–6%, *F. fomentarius* (берёза) – 7–8%, *F. pinicola* (ель) – 9–13%, *I. obliquus* (берёза) – 12–17%. Идентификацию выделенных пигментов проводили по традиционной схеме, включающей комплексное исследование их растворимости, качественных реакций на хиноны и фенолы, элементного состава, спектральных свойств [2].

Сорбционная ёмкость исследованных меланинов по отношению к ионам свинца. В результате потенциометрического титрования полученных меланинов ацетатом свинца показано, что 1 мг меланина из трутовика ложного дубового связывает $0,17 \pm 0,07$ мг Pb^{2+} ; из трутовика ложного – $0,17 \pm 0,07$ мг; из трутовика окаймлённого – $0,12 \pm 0,06$ мг; из трутовика плоского – $0,11 \pm 0,04$ мг; из трутовика настоящего – $0,11 \pm 0,03$ мг; из трутовика скошенного, чаги – $0,10 \pm 0,03$ мг. Эффективность комплексообразования ионов Pb^{2+} с меланинами различного происхождения связана с особенностями их физико-химических свойств: молекулярной массой, элементным составом, содержанием карбоксильных и кар-

бонильных групп, наличием парамагнитных центров (ПМЦ) [6, 7].

Парамагнитные свойства хелатных комплексов меланинов. Характерной особенностью меланиновых пигментов является парамагнетизм [13]. Комплексообразование исследованных меланинов с ионами ТМ приводит к росту количества ПМЦ (табл. 1). В результате такого взаимодействия в молекулах меланиновых пигментов происходит перераспределение электронной плотности и образование более стабильных структур [14]. Наиболее прочное взаимодействие с ионами Pb^{2+} характерно для меланинов из трутовика настоящего, чаги и трутовика ложного.

Количество центров связывания металлов в меланине чаги. По результатам потенциометрического титрования методом Скетчарда определено количество центров связывания меланином из чаги ионов Cd^{2+} и Zn^{2+} , которое составило 25 центров (рис.).

Термогравиметрический анализ хелатных комплексов меланина с Pb^{2+} . При пиролизе от 20 °С до 600 °С хелатных комплексов меланинов с Pb^{2+} происходит сдвиг максимума термического разложения с 410 °С для меланина до 470 °С их комплексов. Взаимодействие меланинов с ионами ТМ приводит к увеличению энергии активации этих комплексов, которая для Pb^{2+} -меланин составляет 357 кДж/моль, а для их механической смеси – 80–82 кДж/моль. Это свидетельствует об

Таблица 1 / Table 1
Характеристика ЭПР сигналов комплексов меланинов из трутовиков со свинцом
Characterization of the EPR signals of melanin complexes from tinder fungi with plumbum

Источник меланина, субстрат произрастания гриба, комплекс с Pb^{2+} Source of melanin, substrate for supporting fungal growth, complex with Pb^{2+}	ΔH , Гс ΔH , G	g-фактор g-factor	ПМЦ, 10^{17} спин/г PMS, 10^{17} spin/g
<i>I. obliquus</i> , берёза / birchtree Pb^{2+} -меланин / Pb^{2+} -melanin	5,5	2,0042	4,0
	12,0	2,0010	102,0
<i>Ph. igniarius</i> , орех маньчжурский / Manchurian walnut Pb^{2+} -меланин / Pb^{2+} -melanin	5,5	2,0043	16,0
	12,0	2,0016	43,0
<i>G. applanatum</i> , осина / aspen Pb^{2+} -меланин / Pb^{2+} -melanin	6,3	2,0045	9,0
	11,0	2,0021	19,3
<i>Ph. robustus</i> , дуб / oaktree Pb^{2+} -меланин / Pb^{2+} -melanin	6,0	2,0043	5,0
	13,5	2,0004	14,9
<i>F. fomentarius</i> , берёза / birchtree Pb^{2+} -меланин / Pb^{2+} -melanin	6,0	2,0043	6,0
	10,3	2,0009	9,7
<i>F. pinicola</i> , ель / spruce Pb^{2+} -меланин / Pb^{2+} -melanin	6,0	2,0042	3,0
	11,0	2,0028	4,1

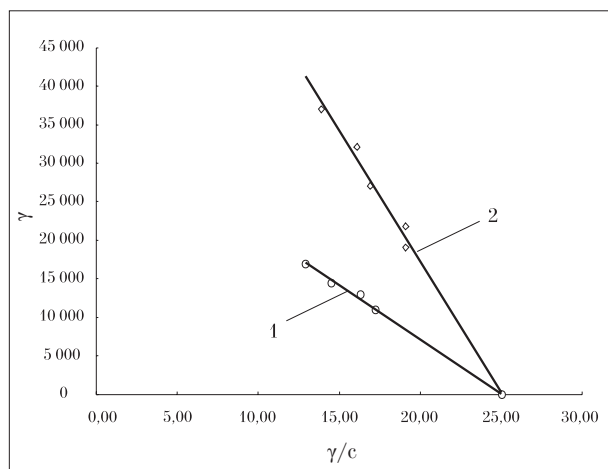


Рис. Зависимость γ от γ/c : 1 – $ZnSO_4$; 2 – $CdSO_4$
 Fig. The dependence of γ on γ/c : 1 – $ZnSO_4$; 2 – $CdSO_4$

эффективном процессе взаимодействия меланинов с ТМ и образовании термостабильного комплекса.

Растворение хелатных комплексов меланинов с металлами. При взаимодействии исследуемых меланинов с ионами Pb^{2+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} в точке эквивалентности происходит агрегация комплексов и их соосаждение. Агрегация меланина в комплексе с металлом и выпадение его в осадок начинается на конечной стадии титрования, когда значение pH не меняется. По способности ЭДТА растворять полученный осадок была исследована устойчивость образующихся комплексов меланин-металл [15]. Добавление ЭДТА в конечной концентрации $1 \cdot 10^{-3}$ моль/л к суспензии хелатного комплекса меланина из чаги с Zn^{2+} происходит его растворение; для комплексов Cd^{2+} -меланин его концентрация составляет $2,3 \cdot 10^{-4}$ моль/л; для Pb^{2+} -меланин – $3,0 \cdot 10^{-4}$ моль/л; для Cu^{2+} -меланин –

$4,5 \cdot 10^{-4}$ моль/л. Для разрушения комплекса металл-меланин необходимо различное количество ЭДТА, которое в 10–30 раз превышает количество меланина и возрастает в ряду ионов $Zn^{2+} - Cd^{2+} - Pb^{2+} - Cu^{2+}$.

Энтеросорбционные свойства меланина.

Способность меланиновых пигментов связывать различные ТМ создаёт предпосылки их практического использования в качестве энтеросорбента. Меланин из чаги образует прочные комплексы с ионами Cd^{2+} и Cu^{2+} и способен снижать их токсическое действие. Как видно из таблицы 2, при совместном введении $CdCl_2$ в дозе, равной LD_{50} и меланина из чаги в дозе 1000 мг/кг выживаемость мышей увеличивалась на 30%.

Для снижения токсического действия $CdCl_2$ до 80% выживаемости требовалось введение значительно большего количества меланина, чем при интоксикации $CuCl_2$. При внутрижелудочном введении мышам хлорида меди в дозе 200 мг/кг (LD_{50}) и меланина из чаги в дозе 180 мг/кг массы через сутки погибло не более 10% животных, а при введении хлорида кадмия (100 мг/кг) и меланина (200 мг/кг) – 20%.

Заключение

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что взаимодействие меланинов с различными металлами приводит к агрегации пигментов и выпадению их в осадок. Образовавшиеся хелатные комплексы меланинов с металлами могут быть разрушены путём добавления известного хелатора металлов – ЭДТА. Для разрушения комплекса металл-меланин необходимо различное количество ЭДТА, которое в 10–30 раз превышает коли-

Таблица 2 / Table 2

Выживаемость мышей при совместном внутрижелудочном введении солей металлов и меланина из чаги / The survival rate of mice with the joint intragastric administration of metal salts and melanin from the chaga mushroom

Вводимая доза / Administered dose	Выживаемость мышей, % The survival rate of mice, %
$CdCl_2$ 94 мг/кг (LD_{50}) / $CdCl_2$ 94 mg/kg (LD_{50})	50±2
$CdCl_2$ 94 мг/кг + меланин 200 мг/кг $CdCl_2$ 94 mg/kg + melanin 200 mg/kg	60±3
$CdCl_2$ 94 мг/кг + меланин 1000 мг/кг $CdCl_2$ 94 mg/kg + melanin 1000 mg/kg	80±4
$CuCl_2$ 200 мг/кг (LD_{50}) / $CuCl_2$ 200 mg/kg (LD_{50})	50±1
$CuCl_2$ 200 мг/кг + меланин 90 мг/кг $CuCl_2$ 200 mg/kg + melanin 90 mg/kg	70±3
$CuCl_2$ 200 мг/кг + меланин 360 мг/кг $CuCl_2$ 200 mg/kg + melanin 360 mg/kg	100

чество меланина и возрастает в ряду ионов $Zn^{2+} - Cd^{2+} - Pb^{2+} - Cu^{2+}$. На основании полученных результатов было определено, что в молекуле меланинов имеется 25 центров связывания с металлами. При взаимодействии меланиновых пигментов с ионами тяжелых металлов принимают участие свободнорадикальные мономеры феноксильной и бензосемихинонной природы [11]. Проведённые исследования механизма сорбции ТМ меланинами ряда дереворазрушающих грибов создают предпосылки для их практического использования в качестве энтеросорбентов.

References

1. Sazanova K.V., Velikova V.D., Stolyarova N.V. Accumulation of heavy metals by mushrooms. Ecological and species specificity, accumulation mechanisms, potential danger to humans // *Toxicologiya*. 2017. V. 18. P. 336–361 (in Russian).
2. Shirokikh A.A., Popyvanov D.V., Shirokikh I.G. Biosorption of Pb(II), Zn(II) and Cu(II) from aqueous solutions by *Trametes versicolor* mycelium // *Theoretical and Applied Ecology*. 2017. No. 2. P. 98–105 (in Russian). doi: 10.25750/1995-4301-2017-2-098-105
3. Felix C.C., Hyde J.S., Sarna T., Sealy R.C. Interactions of melanin with metal ions. Electron spin resonance evidence for chelate complexes of metal ions with free radicals // *Journal of the American Chemical Society*. 1978. V. 100. No. 12. P. 3922–3926.
4. Pandey K.K., Pitman A.J. FTIR studies of the changes in wood chemistry following decay by brown-rot and white-rot fungi // *International biodeterioration & biodegradation*. 2003. V. 52. No. 3. P. 151–160. doi: 10.1016/S0964-8305(03)00052-0
5. Zjawiony J.K. Biologically active compounds from Aphyllophorales (polypore) fungi // *Journal of natural products*. 2004. V. 67. No. 2. P. 300–310.
6. Sushinskaya N.V., Kukulyanskaya T.A., Kurchenko V.P., Shostak L.M. Physico-chemical properties and the production of melanins from basidiomycetes // *Trudy BGTU*. 2004. No. 12. P. 193–196 (in Russian).
7. Bakulin A.V., Kurchenko V.P., Sushinskaya N.V., Azarko I.I., Varlamov V.P. Physical and chemical characteristics of chitosan-melanin complexes // *Trudy BGU*. 2009. V. 4. No. 2. P. 290–297 (in Russian).
8. Cui Y., Kim D.S., Park K.C. Antioxidant effect of *Ononotus obliquus* // *Journal of Ethnopharmacology*. 2005. V. 96. No. 1–2. P. 79–85.
9. Nosanchuk J.D., Stark R.E., Casadevall A. Fungal melanin: what do we know about structure // *Frontiers in Microbiology* 2015. V. 6. P. 1463. doi: 10.3389/fmicb.2015.01463
10. Kadri T., Rouissi T., Brar S.K., Cledon M., Sarma S., Verma M. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by fungal enzymes: A review // *J. Environ. Sci.* 2017. V. 51(1). P. 52–74. doi: 10.1016/j.jes.2016.08.023
11. Senyuk O., Gorovoj L., Zhidkov A., Kovalyov V., Palamar L., Kurchenko V., Kurchenko N., Schroeder H.-Ch. Genome protection properties of the chitin-containing preparation Micoton // *Advances in chitin science*. 2005. V. 8. P. 430–434.
12. Sushinskaya N.V., Kurchenko V.P., Shostak L.M. The use of thermal analysis in the study of melanins // *Biokhimiya: sb. nauch. trudov BGTU*. Minsk: Izd-vo RIVSH, 2004. P. 111–115 (in Russian).
13. Enochs W.S., Nilges M.J., Swartz H.M. A standardized test for the identification and characterization of melanins using electron paramagnetic resonance (EPR) spectroscopy // *Pigment Cell. Res.* 1993. No. 6. P. 91–99.
14. Buszman E., Pilawa B., Zdybel M. EPR examination of Zn^{2+} and Cu^{2+} effect on free radicals in DOPA-melanin-netilmicin complexes // *Chemical Physics Letters*. 2005. V. 403. No. 1–3. P. 22–28.
15. Liu Y., Hong L., Kempf V.R. Ion-exchange and adsorption of Fe(III) by *Sepia melanin* // *Pigment cell research*. 2004. V. 17. No. 3. P. 262–269.