

УДК 582.284:547.99

## МЕЛАНИН СТЕРИЛЬНОЙ ФОРМЫ *Laetiporus sulphureus*

© 2011 г. Д. Н. Оленников\*, С. В. Агафонова\*\*, А. В. Столбикова\*\*, А. В. Рохин\*\*\*

\*Институт общей и экспериментальной биологии СО РАН, Улан-Удэ, 670047  
e-mail: oldaniil@rambler.ru

\*\*Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, Иркутск, 664033

\*\*\*Иркутский государственный университет, Иркутск, 664033

Поступила в редакцию 23.03.2010 г.

Из мицелия базидиального вида *Laetiporus sulphureus* (Bull.: Fr.) Murr получен меланиновый комплекс (выход 2.49% от массы сырья). С применением УФ-, ИК-спектроскопии, гель-хроматографии и щелочного расщепления установлено, что выделенный меланин был гетерогенен и относился к дигидронафталиновому типу. Данные <sup>13</sup>C-ЯМР указывали на доминирование ароматических фрагментов в структуре меланина. В ходе исследования антиоксидантного действия методами *in vitro* установлено, что меланин *L. sulphureus* обладал антирадикальной активностью, а также обладал способностью к инактивации молекул пероксида водорода, оксида азота(II) и хелатированию ионов железа(II).

Меланины представляют собой широко распространенные в живом мире высокомолекулярные темноокрашенные пигменты, образующиеся в результате окислительной полимеризации фенольных соединений. В грибах меланины выполняют роль окислительно-восстановительных буферов, защищающих организм от воздействия УФ-радиации и свободных радикалов, вызывающих патологические последствия перекисного окисления липидов. Наличие данного вида активности у меланинов объясняется их способностью к связыванию и инактивации активных форм кислорода и хелатированию ионов переходных металлов, вызывающих процессы реакции Фентона, а также активизации ряда ферментов [1, 2].

Фармакологические исследования показали, что грибные меланины влияют на процессы клеточного метаболизма, регулируют окислительно-восстановительные процессы, гормональный обмен, а также защищают организм от воздействия агентов мутагенной и канцерогенной природы [3]. Для данного класса макромолекулярных соединений выявлено выраженное адаптогенное, стресс-протекторное и нейрорегуляторное действие при общей низкой токсичности [4]. Также установлено, что меланины, их предшественники и производные оказывают положительное влияние при лечении ряда нейродегенеративных заболеваний (болезнь Альцгеймера, слабоумие и др.) [5].

Наличие меланиноподобных соединений в базидиомицетах характерно для их стерильных форм, среди которых наиболее известным примером является чага – стерильная форма *Inonotus obliquus* (Fr.) Pil. [6]. Наряду с другими соединениями именно присутствие меланина в чаге обуславливает ее широкое использование в современной терапевти-

ческой практике для лечения желудочно-кишечных и онкологических заболеваний [7]. Учитывая факт недостаточной в пределах России сырьевой базы *I. obliquus*, перспективными являются исследования по изысканию новых источников меланиновых соединений базидиальной природы.

Нами продолжено исследование химического состава базидиального вида *Laetiporus sulphureus* (Bull.: Fr.) Murr, в ходе которого изучен состав низкомолекулярных соединений и полисахаридов [8–10], а также установлено, что наибольшее накопление экстрактивных компонентов грибной клетки приходится на стерильные стадии развития базидиомицета [11, 12]. Более того, для стерильной формы данного вида характерна интенсивная темная пигментация, обусловленная наличием меланиновых соединений, природа которых ранее не изучалась.

Цель работы – определение химической природы и антиоксидантной активности меланина стерильной формы *L. sulphureus*.

### МЕТОДИКА

**Получение мицелия.** Материалом для исследования являлся 21-суточный разросшийся мицелий *L. sulphureus* с зачатками плодовых тел (примордий). Мицелий выращивали в среде с сусло-агаром (8° по Баллингу) в чашках Петри при 23°C. На 18 сут проводили инокуляцию агаризированным мицелием древесных блоков *Larix sibirica* Ledb., которые термостатировали при 21°C. На 21 сут поверхностный мицелий с образовавшимися примордиями удаляли и высушивали.

**Таблица 1.** Характеристика фракций меланина *L. sulphureus*

Фракция	Содержание меланина, %	Молекулярная масса, кДа	E <sub>465</sub> /E <sub>665</sub>
ЛМ-1	6.9 ± 0.2	63	3.18
ЛМ-2	11.3 ± 0.4	34	3.36
ЛМ-3	80.8 ± 2.4	9.1	9.75

**Выделение меланина.** Высушенное и измельченное сырье *L. sulphureus* (300 г) экстрагировали в аппарате Сокслета последовательно гексаном, хлороформом, этилацетатом и ацетоном. Обезжиренное сырье высушивали до полного удаления растворителей, после чего экстрагировали водой на кипящей водяной бане (модуль 1 : 50; 4-кратная экстракция по 60 мин). Водные извлечения центрифугировали (30 мин, 6000 г) и после объединения супернатантов подкисляли 6 М HCl до значения pH 2.0. Через 2 ч выпавший осадок центрифугировали (20 мин, 6000 г), суспендировали в 20%-ной HCl и оставляли на 5 сут при 5°C. Полученную смесь центрифугировали (30 мин, 6000 г), осадок промывали водой до нейтральной реакции, высушивали в вакуум-сушильном шкафу ШСВ-65 (Россия) при -0.09 МПа в течение 6 ч и хранили в эксикаторе над P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>. Выход составил 7.47 г (2.49% от массы сырья).

Спектроскопические исследования проводили на спектрофотометре UV-Vis mini ("Shimadzu", Япония) в кварцевых кюветах 10 мм. Регрессионный анализ выполняли с применением пакета программ Advanced Grapher 2.11 ("Alentum Software Inc.", США). Элементный состав определяли на элементном анализаторе Flash EA 1112 ("Thermo Finnigan", Германия). Содержание карбоксильных и фенольных гидроксильных групп устанавливали потенциометрическим методом на pH-метре pH-410 ("Аквилон", Россия) [13]. Температуру плавления определяли на приборе IA-9100 ("Electrothermal", Великобритания).

**Гель-хроматография.** Использовали сефадекс G-100 ("Pharmacia", Швеция), элюент - 0.5%-ный NaHCO<sub>3</sub>, скорость потока - 200 мкл/мин, объем элюатов - 1 мл, температура колонки - 20°C. Колонку градуировали с использованием стандартов декстранов с молекулярными масса-

ми 100, 70, 50, 20, 10 кДа ("Fluka", Швейцария). Внешний объем колонки определяли по синему декстрану (2000 кДа, "Pharmacia", Швеция). Концентрация раствора меланина - 10 мг/мл, стандартов декстранов - 1 мг/мл, объем вводимой пробы - 1.5 мл. Объем выхода определяли спектрофотометрическим методом при 280 нм, количественный анализ гель-хроматограмм - с использованием программы Leonardo 1.01 ("Наука плюс", Россия). Дополнительно элюаты обрабатывали 0.01%-ным раствором 1,1-дифенил-2-пикрилгидразида ("MP Biomedicals Inc.", США) в метаноле в соотношении 1 : 1, после чего определяли оптическую плотность полученных растворов через 15 мин при 520 нм.

**ИК-спектроскопия.** Образцы для анализа растворяли в 1%-ном растворе KOH, раствор наносили на пластины из таллий-бром-йодного стекла (KPC-5) и высушивали в вакууме. ИК-спектры регистрировали на ИК-Фурье спектрометре Spectrum 100 ("Perkin-Elmer", США) в пленке в интервале 4000-450 см<sup>-1</sup>.

**Щелочное расщепление меланина.** Навеску меланина (20 мг) нагревали при 250°C в фарфоровом тигле со 100 мг тонко измельченного KOH в течение 4 мин. После охлаждения смесь растворяли в 5 мл воды, раствор нейтрализовали раствором 80%-ной H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> до pH 4.0-5.0 и подвергали полученную смесь жидкофазной экстракции этилацетатом (3-кратно по 2 мл). Экстракты объединяли, концентрировали в вакууме досуха, сухой остаток растворяли в 100 мкл метанола и анализировали методом высокоэффективной тонкослойной хроматографии (ВЭТСХ).

**Анализ ВЭТСХ.** Использовали пластины Сорбфил ПТСХ-АФ-В ("Имид Ltd.", Россия) 15 × 10 см. По 2 мкл исследуемого раствора и 0.5%-ных растворов стандартных веществ наносили микрошприцем на стартовую линию пластины полосами 8 мм. Далее образцы хроматографировали в системе растворителей толуол-метанол-уксусная кислота (45 : 8 : 4) при 20°C в вертикальной камере на высоту 70 мм, после чего пластины высушивали, обрабатывали методом погружения 1%-ным раствором KMnO<sub>4</sub> в 80%-ном этаноле и просушивали на термостойке при 60°C течение 10 с. Денситограммы получали с использованием планшетного сканера Bear Paw

**Таблица 2.** Относительная интенсивность различных участков <sup>13</sup>C-ЯМР-спектров грибных меланинов, % от общей интенсивности

Меланин	Участок спектра, м. д.						
	220-160	160-140	140-110	110-90	90-60	60-45	45-0
<i>L. sulphureus</i>	17	4	28	9	15	5	22
<i>Hendersonula toruloidea</i> [23]	15	8	16	9	18	11	20

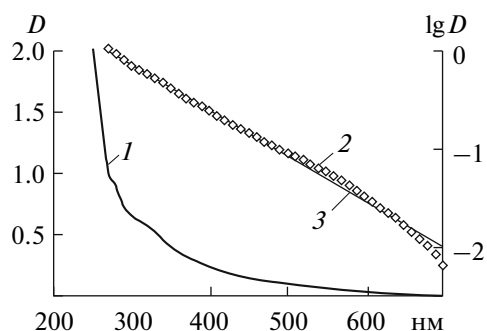


Рис. 1. Спектр поглощения 0.01%-ного раствора меланина *L. sulphureus* (1), зависимость логарифма оптической плотности от длины волны (2) и график линейной регрессии для зависимости  $\lambda$ -lg  $D$  (3).

2400CU Plus (“Mustek System Inc.”, Япония) и пакета программ Сорбфил ТСХ Видеоденситометр 2.0 (“Имид Ltd.”, Россия). В качестве стандартных образцов использовали пирогаллол, флороглюцин, бензойную, салициловую, вератровую, гентизиновую, ванилиновую, сиреневую, п-оксибензойную, протокатеховую и галловую кислоты (“Fluka”, Швейцария).

#### Продукты щелочного расщепления меланина.

Выделение продуктов проводили с применением препаративной тонкослойной хроматографии, для чего этилацетатные экстракты, полученные после щелочного расщепления меланина, хроматографировали в условиях, описанных выше. Зоны веществ вырезали, элюировали 80%-ным этанолом и перекристаллизовывали из метанола. Получено три вещества, идентифицированных с 4-гидроксибензойной ( $C_7H_6O_3$ , т. пл.  $215^\circ C$ ; УФ-спектр: 207, 252 нм), 3,4-диметоксибензойной ( $C_9H_{10}O_4$ , т. пл.  $180^\circ C$ ; УФ-спектр: 220, 271 нм) и 3,5-диметокси-4-гидроксибензойной кислотами ( $C_9H_{10}O_5$ , т. пл.  $207^\circ C$ ; УФ-спектр: 210, 264 нм).

**Спектроскопия ЯМР.** Спектры  $^{13}C$ -ЯМР регистрировали на ЯМР-спектрометре VXR 500S (“Varian”, США), рабочая частота 125.7 МГц. Спектры получены для 1%-ного раствора в 5%-ном NaOD.

**Антиоксидантная активность.** Антирадикальную активность меланина *L. sulphureus* определяли с использованием радикала 1,1-дифенил-2-пикрилгидразила [14], исследование связывания супероксидных радикалов проводили в неэнзиматической системе с использованием феназин метасульфата и НАДН [15], определение инактивации молекул пероксида водорода осуществляли с использованием фенолового красного [16], определение связывания молекул оксида азота(II) проводили по реакции с нитропруссидом натрия и реактивом Грисса [16], хелатирование ионов  $Fe^{2+}$  — фенантролиновым методом [17]. В

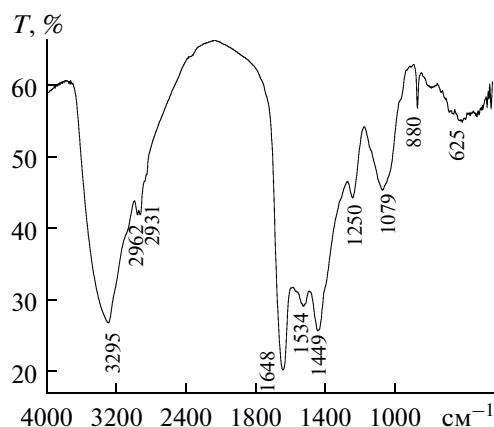


Рис. 2. ИК-спектр меланина *L. sulphureus*. Цифрами обозначены величины волновых чисел полос поглощения.

качестве стандартного соединения использовали галловую кислоту (“Fluka”, Швейцария).

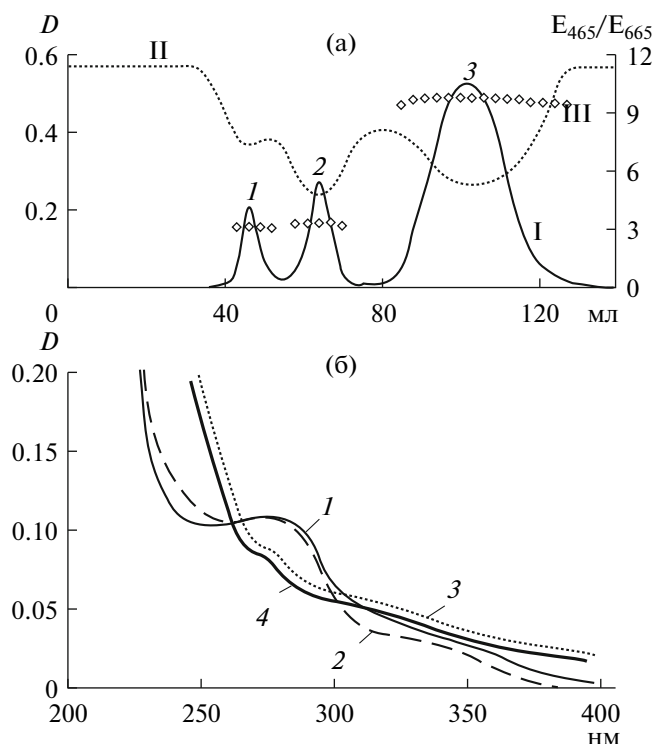
**Токсичность.** Острую токсичность меланина *L. sulphureus* определяли на крысах линии *Wistar* по стандартной методике [18].

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В результате выделения из мицелия *L. sulphureus* был получен препарат меланина, представлявший собой аморфное вещество, темно-коричневого цвета, нерастворимое в воде, кислотах и органических растворителях, но хорошо растворимое в водных растворах щелочей. Известно, что процесс синтеза меланогенных продуктов происходит с участием различных фенолаз, которые могут ковалентно связываться с полимерными продуктами реакции и загрязнять выделяемый препарат меланина [19]. Поэтому для очистки выделенный меланин обрабатывали 20%-ным раствором HCl, которая разрушает аминные связи, не затрагивая основной меланиновый каркас.

Раствор меланина *L. sulphureus* проявлял реакции, используемые для качественной идентификации данного класса биополимеров: осаждение под действием кислот,  $FeCl_3$ ,  $AgNO_3$ , обесцвечивание с  $H_2O_2$  и  $KMnO_4$ , дитионитферрицианидный тест [20]. Исследование элементного состава меланина показало, что в нем содержится 49.0% C, 6.3% H, 2.3% N и 42.4% O, экстинкция 0.001%-ного раствора меланина при 465 нм составляла 0.038, содержание карбоксильных и фенольных гидроксильных групп  $1.42 \pm 0.04$  и  $2.26 \pm 0.07\%$  соответственно.

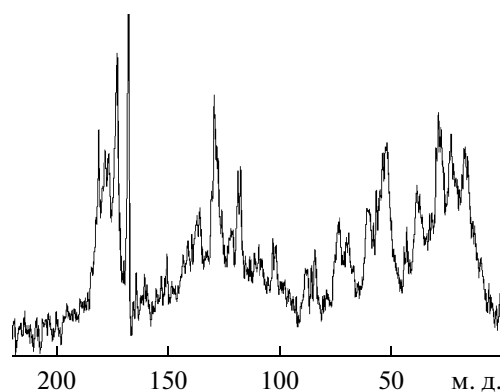
УФ-спектр щелочного раствора меланина *L. sulphureus* типичен для представителей данного класса соединений; в нем отсутствовали полосы поглощения в видимом диапазоне длин волн и



**Рис. 3.** Профиль элюции меланина *L. sulphureus* на сефадексе G-100 (а) и спектры поглощения в области 200–400 нм (б). I – при 280 нм, II – после обработки ДФПГ при 520 нм, III – хроматический коэффициент  $E_{465}/E_{665}$  элюатов. Фракции меланина: 1 – ЛМ-1, 2 – ЛМ-2, 3 – ЛМ-3, 4 – исходный препарат.

имелись два плеча в УФ-области (280 и 328 нм), обусловленные наличием в структуре комплекса конъюгированных фрагментов (рис. 1). В спектре поглощения обнаружена особенность, типичная для меланиновых пигментов: зависимость логарифма оптической плотности ( $\lg D$ ) от длины волны ( $\lambda$ ) носила линейный характер. Регрессионный анализ показал, что в уравнении данной зависимости ( $\lg D = -0.0046\lambda + 1.2239$ ) величина коэффициента детерминации ( $r^2$ ) составляла 0.993, а значение  $a$  в уравнении регрессии соответствовало ранее полученным данным [21]. Хроматический коэффициент  $E_{465}/E_{665}$  меланина *L. sulphureus* был равен 9.31, что свидетельствует о незначительном содержании в структуре алифатических фрагментов [13].

В ИК-спектре меланина присутствовали интенсивные полосы в области 1000–1800  $\text{см}^{-1}$ , обусловленные наличием различно замещенных С–О- и С–N-функциональных групп (рис. 2). Поглощение в области 1600  $\text{см}^{-1}$  появлялось вследствие влияния фенольных, аминных, амидных, высоко конъюгированных хиноидных и карбоксильных групп. Учитывая невысокое содержание азота в составе препарата, данная полоса вызвана, главным образом, влиянием системы ароматических колец



**Рис. 4.**  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектр меланина *L. sulphureus*.

и СООН-групп. Существование алифатических фрагментов подтверждалось полосами в области 2900 и 1449  $\text{см}^{-1}$ ; появлению колебаний при 1050–1250  $\text{см}^{-1}$  способствовали гидроксильные (спиртовые) и фенольные функциональные группы [22].

Гель-хроматография показала, что меланин *L. sulphureus* представляет собой смесь трех веществ: ЛМ-1, ЛМ-2 и ЛМ-3 с молекулярными массами 63, 34 и 9.1 кДа соответственно (рис. 3а). Доминирующим был низкомолекулярный компонент ЛМ-3, содержание которого составляло 80.8% (табл. 1). В УФ-спектрах ЛМ-1 и ЛМ-2 установлено наличие максимумов при 280 нм и плеча в области 340–360 нм, а величины хроматических коэффициентов  $E_{465}/E_{665}$  составляли 3.18 и 3.36 соответственно, что свидетельствует о значительном содержании алифатических фрагментов в структуре указанных компонентов (рис. 3б). Спектр ЛМ-3 повторял таковой исходного меланина, а значение  $E_{465}/E_{665} = 9.75$  указывало на доминирование конденсированных фенольных остатков.

В продуктах щелочной деструкции меланина *L. sulphureus* методом ВЭТСХ обнаружено пять веществ, три из которых были выделены и идентифицированы по данным хроматографической подвижности, температуры плавления и УФ-спектрам с 4-гидроксibenзойной (85% от массы продуктов гидролиза), 3,4-диметоксибензойной (5%) и 3,5-диметокси-4-гидроксibenзойной кислотами (7%). Характер щелочного расщепления свидетельствует о том, что меланин *L. sulphureus* содержал в составе преимущественно фрагменты дигидронафталинового типа, дающие при щелочном расщеплении 4-гидроксibenзойную кислоту, с небольшими включениями остатков пирокатехинового и пирогаллового типов, распадающихся до 3,4-диметоксибензойной и 3,5-диметокси-4-гидроксibenзойной кислот соответственно.

Дальнейшее изучение меланина *L. sulphureus* проводилось с применением  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектроскопии;  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектр приведен на рис. 4.

Таблица 3. Антиоксидантная активность меланина *L. sulphureus*

Препарат	IC <sub>50</sub> , мкг/мл				
	ДФПГ*	O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	NO	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Fe <sup>2+</sup>
Меланин <i>L. sulphureus</i>	57.8 ± 1.5	50.4 ± 1.5	311.8 ± 9.4	21.3 ± 0.6	32.4 ± 0.9
Галловая кислота	4.4 ± 0.1	11.8 ± 0.3	192.4 ± 5.4	52.4 ± 1.1	> 5000

\* ДФПГ – 1,1-дифенил-2-пикрилгидразил.

Исследования в области <sup>13</sup>C-ЯМР-спектроскопии грибных меланинов немногочисленны и были проведены для небольшого числа полимеров. Наличие сложной нерегулярной структуры у меланинов приводит к тому, что их <sup>13</sup>C-ЯМР-спектры содержат набор сложно идентифицируемых сигналов. Общая методология <sup>13</sup>C-ЯМР-анализа заключается в определении вида спектра и интегральных интенсивностей определенных его участков [23]. В <sup>13</sup>C-ЯМР-спектре меланина *L. sulphureus* наблюдалась большая интенсивность участков ароматических фрагментов (область 160–110 м. д., 32%) и меньшая для алифатических структур (60–0 м. д., 27%), что обусловлено содержанием компонента ЛМ-3 в составе препарата (табл. 2). Наличие максимумов в области спектра 220–160 м. д. (~17%) подтверждало присутствие карбоксильных групп.

При изучении антирадикальной активности меланина *L. sulphureus* с использованием свободного радикала 1,1-дифенил-2-пикрилгидразила установлено, что величина 50%-ного связывания (IC<sub>50</sub>) равна 57.8 мкг/мл, подтверждающая выраженное радикал-связывающее действие (табл. 3). В пересчете на доминирующий компонент ЛМ-3 это означает, что 1 молекула меланина может связывать до 6–7 молекул 1,1-дифенил-2-пикрилгидразила. С применением постхроматографического проявления элюатов при гель-хроматографическом исследовании меланина *L. sulphureus* установлено, что наиболее эффективным компонентом был ЛМ-2 (рис. 3а). Процесс инактивации супероксидных радикалов происходил более активно, т.к. IC<sub>50</sub> = 50.4 мкг/мл. Связывание 50% молекул оксида азота(II) происходило при концентрации препарата 311.8 мкг/мл, т.е. исследуемый меланин является менее активным по отношению к данной молекуле. Наибольшие показатели эффективности отмечены при исследовании процессов инактивации молекул пероксида водорода и хелатирования ионов железа(II), величины IC<sub>50</sub> для которых составляли 21.3 и 32.4 мкг/мл соответственно. Полученные результаты свидетельствуют о наличии у меланинового комплекса *L. sulphureus* выраженной антиоксидантной активности.

На модели острой токсичности у крыс показало, что меланин *L. sulphureus* являлся малотоксичным (LD<sub>50</sub> > 5000 мг/кг).

Таким образом, в результате проведенных исследований изучен меланиновый комплекс стерильной формы *L. sulphureus*, представляющий собой смесь трех полимеров фенольной природы ЛМ-1, ЛМ-2 и ЛМ-3 с молекулярными массами 63, 34 и 9.1 кДа соответственно; компонент ЛМ-3 был доминирующим. С применением химических и спектральных методов установлено, что меланин *L. sulphureus* относится к дигидронафталиновому типу и характеризуется доминированием конденсированных фенольных фрагментов.

К настоящему времени меланины дигидронафталинового типа были обнаружены в микромицетах классов дейтеромицетов (*Aspergillus carbonarius*, *Alternaria alternata*, *Paecilomyces variotti*) [24], аскомицетов (*Asperisporium caricae*, *Pleurophragmium* sp., *Tuber melanosporum*) [25], дотидеомицетов (*Phyllosticta capitata*) [26], леотиомицетов (*Sclerotinia sclerotiorum*) [27] и других. Следует отметить, что исследования меланинов базидиомицетов немногочисленны: известно, что они отличаются высокой степенью ароматичности (*Cerrena maxima*) [21] и могут принадлежать к пирокатехиновому (*Inonotus obliquus*, *Phellinus robustus*) [28] и γ-глутаминил-п-оксибензольному типам [1]. Присутствие меланина дигидронафталинового типа в базидиальном виде установлено впервые.

Результаты изучения биологической активности меланина *L. sulphureus* показали, что его можно рекомендовать для использования в качестве эффективного и безопасного пищевого или фармацевтического антиоксиданта.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант РФФИ 08-04-98045) и Лаврентьевского конкурса молодых ученых СО РАН.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bell A.A., Wheeler M.H. // Annu. Rev. Phytopathol. 1986. V. 24. № 3. P. 411–451.
2. Jacobson E.S. // Clin. Microbiol. Rev. 2000. V. 13. № 4. P. 708–717.
3. Борщевская М.И., Васильева С.М. // Вопросы мед. химии. 1999. Т. 45. № 1. С. 13–23.
4. Жеребин Ю.А. // Докл. АН УССР. Серия Б. 1984. № 3. С. 64–68.

5. Григорян Э.Н., Миташов В.И. // Онкогенез. 1979. Т. 10. № 2. С. 137–144.
6. Бабицкая В.Г., Шерба В.В., Иконникова Н.В. // Прикл. биохимия и микробиология. 2000. Т. 36. № 4. С. 439–444.
7. Shashkina M.Ya., Shashkin P.N., Sergeev A.V. // Pharm. Chem. J. 2006. V. 40. № 10. P. 560–568.
8. Agafonova S.V., Olennikov D.N., Borovskii G.B., Penzina T.A. // Chem. Natural Comp. 2007. V. 43. № 6. P. 687–688.
9. Оленников Д.Н., Агафонова С.В., Боровский Г.Б., Пензина Т.А., Рохин А.В. // Прикл. биохимия и микробиология. 2009. Т. 45. № 5. С. 597–605.
10. Оленников Д.Н., Агафонова С.В., Боровский Г.Б., Пензина Т.А., Рохин А.В. // Прикл. биохимия и микробиология. 2009. Т. 45. № 6. С. 693–697.
11. Агафонова С.В., Боровский Г.Б., Пензина Т.А., Оленников Д.Н. // Успехи мед. микологии. 2007. Т. 9. С. 208–209.
12. Olennikov D.N., Agafonova S.V., Nazarova A.V., Borovskii G.B., Penzina T.A. // Chem. Natural Comp. 2008. V. 44. № 6. P. 762–763.
13. Королева О.В., Куликова Н.А., Алексеева Т.Н., Степанова Е.В., Давидчук В.Н., Беляева Е.Ю., Цветкова Е.А. // Прикл. биохимия и микробиология. 2007. Т. 43. № 1. С. 61–67.
14. Seyoum A., Asres K., El-Fiky F.K. // Phytochemistry. 2006. V. 67. № 18. P. 2058–2070.
15. Chen A.-S., Taguchi T., Sakai K., Kikuchi K., Wang M.-W., Miwa I. // Biol. Pharm. Bull. 2003. V. 26. № 9. P. 1326–1330.
16. Govindarajan R., Rastogi S., Vijayakumar M. // Biol. Pharm. Bull. 2003. V. 26. № 10. P. 1424–1427.
17. Оленников Д.Н., Зилфикаров И.Н., Торопова А.А., Ибрагимов Т.А. // Химия растит. сырья. 2008. № 4. С. 95–100.
18. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / Ред. Р.У. Хабриев. М.: Медицина, 2000. С. 18–24.
19. Metter J.M., Townsel M.E., Moore C.L., Williamson G.D., Soteres B.J., Fisher M.S., Willis I. // Pigm. Cell Res. 1990. V. 3. № 2. P. 90–97.
20. Modern Methods of Plant Analysis / Eds. K. Paech, M.V. Tracey. Berlin: Springer-Verlag, 1955. V. 4. P. 661–675.
21. Suryanarayanan T.S., Ravishankar J.P., Venkatesan G., Murali Th.S. // Mycol. Res. 2004. V. 108. № 8. P. 974–978.
22. Pierce J.H., Rast D.M. // Phytochemistry. 1995. V. 39. № 1. P. 49–55.
23. Knicker H., Almendros G., Gonzalez-Vila F.J., Lodemann H.-D., Martin F. // Org. Geochem. 1995. V. 23. № 11–12. P. 1023–1028.
24. Бабицкая В.Г., Шерба В.В., Филимонова Т.В., Григорчук Е.А. // Прикл. биохимия и микробиология. 2000. Т. 36. № 2. С. 153–159.
25. Paim S., Linhares L.F., Mangrich A.S., Martin J.P. // Biol. Fertil. Soils. 1990. V. 10. № 1. P. 72–76.
26. De Angelis F., Arcadi A., Marinelli F., Paci M., Botti D., Pacioni G., Miranda M. // Phytochemistry. 1996. V. 43. № 5. P. 1103–1106.
27. Butler M.J., Gardiner R.B., Day A.W. // Mycologia. 2009. V. 101. № 3. P. 296–304.
28. Бабицкая В.Г., Шерба В.В. // Прикл. биохимия и микробиология. 2002. Т. 38. № 3. С. 286–291.

## Melanin of *Laetiporus sulphureus* (Bull.: Fr.) Murr Sterile Form

D. N. Olennikov<sup>a</sup>, S. V. Agafonova<sup>b</sup>, A. V. Stolbikova<sup>b</sup>, and A. V. Rokhin<sup>c</sup>

<sup>a</sup> Institute of General and Experimental Biology, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Ulan-Ude, 670047 Russia  
e-mail: oldaniil@rambler.ru

<sup>b</sup> Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Irkutsk, 664033 Russia

<sup>c</sup> Irkutsk State University, Irkutsk, 664033

Received March 23, 2010

**Abstract**—Melanin complex was isolated from mycelium of the basidiomycete *Laetiporus sulphureus* (Bull.: Fr.) Murr (with a yield of 2.49% of the fresh weight). UV and IR spectroscopies, gel chromatography, and alkaline cleavage assay demonstrated that the isolated melanin was heterogeneous and belonged to the dihydronaphthalene type. <sup>13</sup>C-NMR data suggested that aromatic fragments were dominant in the melanin structure. In vitro study of the antioxidant action demonstrated that the *L. sulphureus* melanin displayed a radical-scavenging activity and the ability to inactivate hydrogen peroxide and nitrogen(II) oxide molecules and to chelate iron(II) ions.