

УДК 638.4:633.865

ПОЛУЧЕНИЕ МЕЛАНИНА И ИССЛЕДОВАНИЕ ЕГО БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ

Е.А. Прутенская, Э.М. Сульман, М.Г. Сульман, М.Д. Мельничук

Тверской государственный технический университет, г. Тверь, Россия

В современных исследованиях приоритетным считается поиск и получение природных биологически активных соединений, которые являются отличными эффекторами для лечения различных заболеваний и не осуществляют сбой работы клеточного метаболизма, а также обладают специфичностью действия. В России ученые вновь обратили свой взгляд на низкомолекулярные полифенольные соединения. Были продолжены исследования меланинов С.П. Лях в области медицины и фармакологи [1]. Было показано, что меланины участвуют в клеточной регуляции, способствуют заживлению язв, снижают негативные воздействия стресса [2–4].

Наличие у меланиновых веществ различных реакционных группировок, сопряженной системы двойных связей способствует проявлению у них полифункциональных свойств, что позволяет защищать клетки от канцерогенных и мутагенных факторов [5,6]. Меланин является хорошим антиоксидантом. Он частично усваивается микроорганизмами кишечника, способствует нормализации микрофлоры желудочно-кишечного тракта. В связи с этим, меланиновые вещества можно использовать как энтеросорбенты, которые способны выводить токсины, при острых отравлениях [5].

Меланин рекомендуют при профилактике и лечении болезней людей, а также в пищевой, парфюмерной промышленности. Простейшим является вариант использования меланина в качестве добавок к солнцезащитным кремам. Присутствие меланина в пищевых и кормовых продуктах способствует их длительному хранению [2]. Поэтому получение меланина из различного сырья и определение его биологической активности является актуальным.

В настоящее время источником меланиновых вещества могут быть различные организмы от микроорганизмов до высших организмов, например насекомых.

Насекомые-источник меланиновых веществ.

В связи с поиском альтернативного материала для выделения меланиновых веществ многие ученые предлагают использовать насекомых в качестве быстрого воспроизводимого сырья. Их можно выращивать в промышленных масштабах не только в климатических камерах, но и в пластиковых контейнерах. При этом многие насекомые являются источником белка, который используют для кормления крупного рогатого скота, аквакультур,

Ученые из России и Казахстана [2] изучают перспективность культивирования мухи *Hermetia illucens* для получения меланиновых веществ, хитина и кормовых добавок. Было обнаружено, что максимальное количество меланина образуется на последнем этапе развития куколки, непосредственно перед окукливанием насекомых. Выявлено, что у имаго и куколки меланин проявляет широкий спектр противомикробной активности и способствует защите насекомых от бактериальных и грибковых инфекций. Экспериментальным путем были подобраны оптимальные сырьевые субстраты для выращивания личинок. Была разработана технология переработки их биомассы в полноценные кормовые и пищевые ингредиенты. Из 1 кг кормового субстрата можно получить 2,5–3,0 граммов меланина и до 9,0 граммов хитина. Получение меланина включает экстракцию сухой биомассы 3–5М раствором гидроксида калия, осаждение концентрированной соляной кислотой, центрифугирование, гидролиз соляной кислотой, центрифугирование, промывание дистиллированной соляной кислотой и сушку над безводным хлоридом кальция [2].

Известно получение меланина из подмора пчёл и возможность его использования при экологически неблагоприятных воздействиях. Разработанный способ получения меланина из подмора пчёл является заключительной стадией технологии получения хитозан-меланинового комплекса из подмора пчёл [3]. Меланин получали из гидролизата после дезацетилирования подмора пчёл, который проводили двумя способами: «горячим» и «холодным». При «горячем» дезацетилировании выход меланина из исходного сырья в 1,7 раза больше, чем при «холодном». Исследования авторов показывают, что хитозан-меланиновый комплекс в животноводстве, в качестве кормовой добавки, более эффективен, чем чистый меланин, в следствии синергетического эффекта компонентов.

На кафедре БТиХ ТвГТУ совместно с компанией ООО «Жива» был разработан способ получения меланина из продуктов жизнедеятельности большой пчелиной моли [7]. Для выращивания огнёвки используются отходы пчеловодства. Получение меланина состоит из следующих стадий: обработка органическим растворителем, экстракция щелочным раствором, центрифугирование, осаждение соляной кислотой, сушка. Количество меланина составляло от 6 до 12 % от массы сырья. Выход меланина зависит от типа используемого органического растворителя. В качестве побочного продукта был получен воск, который соответствует требованиям, предъявляемые к пчелиному воску.

Растения – источник меланина.

Меланиновые вещества в растительном сырье содержатся в небольшом количестве. Их содержание колеблется от 1 до 15 % от массы сырья. В качестве сырья используют лозу подсолнечника, виноградные косточки т. д. Например, существует способ, который предусматривает предварительную обработку лозы гречихи целлюлолитическим ферментом целлюбранин ГЗХ в течение 48 часов, экстракцию, осаждение меланина кислотой, разделение фаз фильтрацией. Выход меланина из лозы гречихи составляет 8–10 % [8]. Однако применение в технологии дорогостоящего фермента делает данный способ экономически не эффективным и требует дополнительной стадии очистки от белкового компонента.

В настоящее время разработаны способы получения меланина из редких видов сырья. Так, например, компания «Олигофарм» в качестве сырья для получения меланина использует элитные сорта чая. Китайскими учеными также был описан метод получения меланина из листьев черного чая, который включает экстракцию меланина из листьев проточной водой, центрифугирование, растворение осадка в воде, доведение рН раствора до 12 М гидроксидом натрия, центрифугирование и получение супернатанта, содержащего меланин и дальнейшее хранение полученного раствора в темноте при температуре 4°C [9]. Скорбина Е.А. получала меланин из кожуры бананов [10].

Польскими учеными предложен способ получения меланина из косточек *Citrullus lanatus* (арбуз), который включает в себя экстрагирование щелочью, центрифугирование, удаление осадка, осаждение

меланиновых веществ из супернатанта 1М хлороводородной кислотой, центрифугирование, гидролиз осадка 6М хлороводородной кислотой, центрифугирование, промывание дистиллированной водой, промывание хлороформом, этилацетатом и этанолом 3 раза, сушки и хранение чистого меланина при температуре -20°C [11]. Однако, объемы данного сырья небольшие и получать меланин в промышленном масштабе не возможно.

Китайскими учеными был предложен метод получения меланиновых фракций из стенок плодов *Castanea mollissima* (каштана). Такой способ содержит в себе несколько стадий: экстрагирование раствором гидроксида натрия в течение 36 часов при температуре 40°C, центрифугирование, удаление свободных белков из супернатанта по методу Севага, подкисление раствора до pH2, центрифугирование, растворение полученного осадка в воде, повторное подкисление, центрифугирование до обесцвечивания супернатанта, отделение осадка с помощью центрифугирования, промывание полученного осадка этилацетатом и ацетоном, сушку при температуре 60°C [12].

Китайскими учеными был предложен способ выделения меланина из отходов пищевой промышленности, из пальмового волокна, включающий экстракцию его этанолом, кислотный гидролиз и осаждение [13].

Комплексные технологии переработки растительного сырья являются актуальными в современном мире, так как позволяют получать не только биологически активные вещества, но и решают экологическую сторону проблемы утилизации отходов.

Технология переработки лузги подсолнечника, разработанная сотрудниками ТвГТУ, является практически экологически безопасной (за исключением образования щелочных и кислотных сточных вод). Основными этапами технологии являются: измельчение лузги подсолнечника, экстракция меланиновых веществ щелочным раствором в ультразвуковом поле, отделение шрота, осаждение целевого продукта, центрифугирование, лиофильная сушка. Вторичное сырье (шрот) смешивают с торфом и формируют пеллеты методом горячего прессования. В результате исследований были подобраны оптимальные условия экстракции меланинов с использованием ультразвука, соотношения торфа и шрота при производстве пеллет [14].

При горячем прессовании происходит интенсификация химических, массообменных процессов, а также увеличение реакционной способности и пластификации лигнина лузги подсолнечника, в результате увеличивается прочность конечного продукта.

Таким образом, разработанный нами комплексный способ переработки лузги подсолнечника позволяет производить биотопливо с теплотворной способностью 20.5 МДж/кг и меланин, практически не содержащий белок и жиры. Выход БАВ составлял до 8 % от абсолютно сухого вещества сырья. Методом РФЭС было определено, что азота в меланине содержится 1,2 %, в отличие от препаратов, полученных без обработки ультразвуком, до 3 % [15]. Полученный меланин использовали в качестве стимулятора роста семян льна. Прирост биомассы по сравнению с контролем увеличивался на 10 %. Меланин также подавлял развитие микрофлоры обсемененного посадочного материала.

Микроорганизмы – продуценты меланина.

Бактериальные меланины также широко распространены, и они обнаружены у многих видов бактерий. Их культуры имеют черные или темно-коричневые цвета. Тем не менее, важно отметить, что не все темные пигменты в бактериальных культурах являются меланинами.

Бактериальные меланины впервые хорошо изучены и охарактеризованы на примере культуральной жидкости *Streptomyces*, так как эти виды активно исследовались для поиска антибиотиков. Образование меланина у этих бактерий послужило в качестве подходящего метода для классификации стрептомицетов. Эти виды использовались для исследования фермента тирозиназы, его структуры, механизма действия и регулирования его экспрессии. У *S. antibioticus* или *S. lividans*, пигмент меланин является побочным продуктом, который затрудняет выделение наиболее важных веществ из этих видов – антибиотиков.

Marinomonas mediterranea и *Bacillus thuringiensis* также содержат активные тиразиназные комплексы и культуральные жидкости становятся сильно пигментированы в присутствии L-тирозина. Все бактериальные меланины содержат азот, и их структура похожа на эумеланин. Меланин из *B. thuringiensis* был подробно изучен, на предмет меланизации бактериальной клетки как механизма защиты от действия пестицидов. Этот вид меланина оказался более легко растворим, в связи с чем было предложено его использование для альтернативных биотехнических применений.

Существует и бактериальный алломеланин из катехиновых предшественников. Таким образом, образование алломеланина который формируется у вида *Rhizobium* представляет собой механизм детоксикации фенольных соединений, которые накапливаются в стареющих узелках корней растений. Некоторые виды бактерий, такие как *Azotobacter*, могут также образовывать меланин из катехинов, чтобы обеспечивать высокий уровень дыхания, необходимый для защиты нитрогеназной системы при фиксации азота. Некоторые бактерии способны осуществлять пентакетидный путь биосинтеза, который ведет к образованию дигидроксинафталенмеланина, хотя бактериальные поликетидсинтазы имеют различные особенности, отличающие их от грибковых и растительных ферментов и, возможно, могут включать другие небольшие ароматические метаболиты к меланину. В связи с этим в последних случаях, существует ряд почвенных микроорганизмов (бактерий и грибов), которые образуют темные полимеры названные гуминовые кислоты, которые являются фенольными полимерами кислотного типа, подобные алломеланину, а также лигнин. Все эти полимеры имеют весьма сходные спектры и физико-химические свойства и очень устойчивы к разложению и обладают длительным сроком благотворного воздействия на почвы.

Другие виды, такие как *S. marcescens* образуют коричневый пигмент путем окисления и полимеризации промежуточных продуктов катаболических путей. У этих видов, предшественником меланина является 3,4-дигидроксифенилацетат. Когда ферменты этого катаболического пути индуцируются и 3,4-дигидроксифенилацетат-2,3-диоксигеназа остается низко активной; накопление дифенольных промежуточных продуктов приводит к формированию пигмента в качестве ликвидации избытка фенола. В настоящее время, получаемый полимер считается алломеланином, хотя первоначальные статьи ставили под сомнение образование меланина, так как синтезируемый продукт образовывался без участия полифенолоксидазы. Аналогичные данные были получены с изучением некоторых видов *Pseudomonas* за счет уменьшения 4-гидроксифенилпируватдиоксигеназной активности.

При выборе биологического агента и постановке его на производство прежде всего следует соблюдать принцип технологичности штаммов. Это значит, что микробная клетка, популяция или сообщество особей должны сохранять свои основные физиолого-биохимические свойства в процессе длительного ведения ферментации. Промышленные продуценты также должны обладать устойчивостью к мутационным воздействиям, фагам, заражению посторонней микрофлорой (контаминации); характеризоваться безвредностью для людей и окружающей среды, не иметь при выращивании побочных токсичных продуктов обмена и отходов, иметь высокие выходы продукта и приемлемые технико-экономические показатели.

Белорусскими исследователями был изобретен способ получения меланина с помощью штамма гриба *Aspergillus niger* БМП-97/2 (Белоруссия 5057). Однако, как утверждают авторы, штамм имеет ряд недостатков: длительный процесс получения посевного спорового материала (28 суток), длительная ферментация культуры (20 суток), анаэробное условия культивирования при повышенных температурах (37°С) [16].

Микробиологическим способом можно получить меланин из дрожжей. Авторы патента (РФ 2278163) сообщают, что из штамма дрожжей *Nadsoniella nigra* Б-3, который при глубинном выращивании на питательной среде определенного состава через 96 часов от начала культивирования накапливает до 25 г./л биомассы дрожжей. Меланин выделяют экстракцией раствором щелочи и / или этилового спирта с последующим осаждением пигмента соляной кислотой. Предлагаемый авторами способ является время затратным и предусматривает использование легковоспламеняющихся веществ. Кроме того, выращивание арктических дрожжей необходимо вести при конкретных определенных условиях, что создает трудности при аппаратурном оформлении метода [17].

В патенте (RU 2186105) говорится о том, что возможно сократить время синтеза меланина путем проведения культивирования штамма дрожжей *Saccharomyces neoformans* var. *nigricans* ГСП – ТБ 17 Д на углесодержащих средах. Процесс проводят при 27–35°С и pH культуральной жидкости 4.5–5.5 в условиях аэрации и перемешивании. Полученную биомассу отделяют от культуральной жидкости с последующим выделением целевого продукта [18].

Бактерия *Bacillus thuringiensis* является продуцентом меланина. Оптимальная температура при культивировании 30–32°С. Оптимум значений pH колеблется в диапазоне от 7.3 до 7.8. При изменении температуры и кислотности среды, даже на небольшие значения, наблюдается заметное снижение выхода целевого продукта.

В Тверском государственном техническом университете были проведены исследования процесса синтеза меланина штаммом *Bacillus subtilis* ВКПМ В-10040. Произведен выбор среды и оптимизированы условия культивирования, влияющие на выход меланиновых веществ. Выявлено, что меланиновые вещества образуются в присутствии кислорода, при температуре культивирования микроорганизмов 30 °С. В образовании меланина участвует изомер L-тирозин, оптимальной концентрацией L-тирозина для максимального выхода меланина служит концентрация 9 г/л. Максимальный выход меланина происходит на 3 сутки роста культуры и составляет 2г/л. Были проведены физико-химические методы исследования меланина, полученного с помощью штамма *Bacillus subtilis* ВКПМ В-10040. При спектрофотометрическом анализе наблюдалось поглощение света в ультрафиолете и видимом диапазоне длин волн, являющейся характеристикой меланинов. По результатам рентгенофотоэлектронной спектроскопии и ЯМР установлено, что выделенный микробный меланин относится к эумеланинам.

Таким образом, меланин можно получать различными способами и из различных природных источников. При этом свойства полученного продукта зависят от ферментативной активности объекта, синтезирующего меланин.

ЛИТЕРАТУРА

1. Лях, С.П. Астромеланин / С.П. Лях, М.Л. Булгак, А.Г. Исаев // М. – 2007. – 167 с.
2. Некрасов Р.В. Меланиновая белково-энергетическая добавка из личинок *Hermetia illucens* в питании телят / Р.В. Некрасов, А.А. Зеленченкова, М.Г. Чабаев, Н.А. Ушакова // Современная биология. -2018. – Т.53. – № 2. – С. 374–384.
3. Погарская Н.В. Технология получения хитозан-меланинового комплекса из подмора пчел и его применение в ветеринарии и медицине. – Ставрополь: АГРУС. – 2013. – 120 с.
4. Сухомлин А.А. Влияние меланина на активность NO-эргической системы в слюнных железах в условиях гипергастринемии // А.А. Сухомлин, К.С. Непорада, Т.В. Береговая // Мир медицины и биологии. – 2014. – 1(43). – 149–152 с.
5. Борщевская М.И., Васильева С.М. Развитие представлений о биохимии и фармакологии меланиновых пигментов // Вопросы медицинской химии. – 1999. – 45, № 1. – С. 47–53.
6. Тугай Т.И. Влияние пролонгированного действия ионизирующего излучения на активность полифенолоксидазы и тирозиназы и на синтез меланина у *Hormoconis resinae* / Т.И. Тунай и др. // ЯДЕРНА ФІЗИКА ТА ЕНЕРГЕТИКА – № 2 (18). – 2006.-с. 82–87.
7. Заявка на патент № 2019108130/04(015692) Способ комплексной переработки продуктов жизнедеятельности *Galleria mellonella*, заявл. 21.03.2019
8. Пат. 2215761 РФ, МПК C09 B 61/00. Способ получения пигмента-красителя из растительного сырья / Б.Н. Огарков, Л.В. Самусенок, заявл. 10.06.2002, опубл. 10.11.2003.
9. Zou, Y. Optimization of extraction conditions of melanin from black tea leaves using response surface methodology / Y. Zou*, Y. Wu, M. Tian // BioTechnology: An Indian Journal. – 2015. – № 7. – С. 269–273
10. Скорбина Е.А. Разработка технологии получения и исследование биологической активности меланинсодержащих препаратов: канд. дисс. на соиск. учен. степ. канд. биол. наук. – Ставрополь, 2005. – 137 с.
11. Łopusiewicz, Ł. Antioxidant, antibacterial properties and the light barrier assessment of raw and purified melanins isolated from *Citrullus lanatus* (watermelon) seeds / Ł. Łopusiewicz // Herba Polonica. – 2018. – № 2. – С. 25–36
12. Zeng-Yu, Yao Comparison of Antioxidant Activities of Melanin Fractions from Chestnut Shell [Электронный ресурс] / Yao Zeng-Yu, Qi Jian-Hua – Molecule – 2016. – Режим доступа: <https://www.mdpi.com/1420-3049/21/4/487/htm#B21-molecules-21-00487>
13. Xiuyun, X. Isolation and characterization of melanin from palm fiber [Электронный ресурс] / X. Xiuyun, J. Zhang, L. Cheng, L. Xingxing – Journal of Natural Fibers – 2018. – Режим доступа: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/15440478.2018.1434850>
14. Патент 2017142514/05.12.2017 Способ получения меланиновых веществ из лузги подсолнечника // Патент России № 2665166, 2018, Бюл. № 25 / Е.А. Прутенская, М.Г. Сульман, А.С. Васильев, Б.Б. Тихонов, М.Д. Мельничук, В.П. Молчанов
15. Грачева Н.В. Физико-химические свойства меланинов лузги подсолнечника / Н.В. Грачева, В.Ф. Желтобрюхов, В.Ф. Каблов // Сборник материалов второй Всероссийской научно-практической Интернет-конференции с международным участием «Структура и физико-химические свойства целлюлоз и нанокompозитов на их основе». – 2016.-с. 19–22.
16. Пат. 5057 ВU, МПК C12N 1/14. Штамм гриба *Aspergillus niger* для производства меланина / В.М. Царенков. – № 19990980/99, заявл. 1999.11.01, опубл. 2003.03.30.
17. Пат. 2278163 РФ, МПК C12P 17/10, C12N 1/16. Способ получения меланина / А.Ч. Бабаевна. – № 2004127970/13, заявл. 22.09.2004, опубл. 10.03.06, Бюл. № 17
18. Пат. 2186105 РФ, МПК C12N 1/14, C12P 13/00, C12N 1/14, C12R 1/85. Способ микробиологического получения меланина / З.Н. Робышева. – № 2000124690/13, заявл. 02.10.2000, опубл. 27.07.2002 Бюл. № 21