

А.Е. АГАДЖАНЯН, Э.В. МИНАСЯН

**РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ ВОДОРАСТВОРИМОГО
МЕЛАНИНА ИЗ ОТХОДОВ РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ И ИЗУЧЕНИЕ
ЕГО ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ**

В последнее время наблюдается повышенное внимание к использованию природных пигментов в разных областях промышленности. С этой точки зрения большой интерес представляет получение меланинов из отходов растительного сырья. В работе в качестве исходного сырья для получения водорастворимого меланина были использованы отходы винного производства – выжимки винограда, а также выжимки семечки, каштановой скорлупы и т.д.

Идентификацию полученного пигмента проводили спектроскопическими методами. Термической обработкой установлено, что аморфный осадок меланина устойчив при температурах до 120 °С, а кислотоустойчивость раствора полученного меланина находится в области pH > 4,0. Гель-фильтрацией, электрофорезом и методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) установлено, что полученный пигмент содержит четыре фракции. Определены их молекулярная масса и количество в аморфном осадке. Качественными реакциями и спектроскопическим методом показано, что эти фракции похожи на типичные меланины. Определены элементный состав полученного меланина и его антиоксидантные свойства. Установлены аминокислотный состав белка меланина и степень растворимости.

Исходя из физико-химических свойств полученного меланина, показано, что его можно использовать в качестве эффективного природного пищевого красителя и стимулятора роста растений, а также в качестве антиоксиданта.

Ключевые слова: меланин, выделение, очистка, свойство, растительное сырье.

Меланины - темноокрашенные высокомолекулярные нерегулярные биополимеры, образующиеся в организмах при ферментативном окислении азотсодержащих и безазотистых дифенолов [1]. Они проявляют многофункциональные свойства, что обусловлено наличием неспаренных электронов в молекуле, составляющих до $10^{18} \dots 10^{19}$ спин/г.

Меланины используются в медицине, фармакологии, сельском хозяйстве и других областях [2]. Их получают химическим [3] и микробиологическим синтезом [4], а также экстракцией из животного и растительного материала [5].

Из-за высокой стоимости исходных материалов и сложности технологического процесса химический синтез меланинов в промышленном масштабе трудно осуществим, что в значительной степени сказывается на стоимости конечного продукта.

Вследствие того, что микробиологический способ получения меланина осуществляется с использованием дефицитных реагентов, кроме того, в технологии образуются большие объемы жидких и твердых отходов, процесс

протекает с большим расходом энергии, а концентрация меланина в полученной культуральной жидкости низкая, то себестоимость меланина получается высокой.

Получение меланина из отходов животного происхождения из-за многокомпонентности исходного сырья связано со значительными сложностями, и потому конечный продукт получается с низким выходом.

Исходя из вышесказанного, для получения меланина в качестве исходного сырья использованы отходы растительного происхождения, экстракты которых содержат сравнительно меньше примесей, и выделить целевой продукт из экстракта сравнительно несложно.

Целью данной работы является разработка эффективной технологии получения водорастворимого меланина из отходов винного производства (виноградной выжимки) и определение его физико-химических свойств и областей применения.

Материалы и методы. Выжимки винограда были приобретены на местном (Армавирском, Армения) винном заводе. Используемые химические вещества были аналитической чистоты.

Выделение и очистка меланина. Для удаления углеводов и остальных водорастворимых примесей отходы виноделия (виноградную выжимку) подвергали водной промывке при температуре 50 °С в течение 60 мин. Фильтрованную массу высушивали при 50 °С, косточки винограда отделяли от кожуры. Из полученной косточки известным методом выделяли витамин Е.

Отделенную кожуру винограда подвергали обработке 0,3 мол/л раствором HCl. После фильтрации и водной промывки до отсутствия ионов Cl⁻ в выходящем фильтрате кожуру использовали в качестве источника получения меланина.

Экстракцию меланина из кожуры осуществляли раствором NaOH при температуре 65 °С в течение 3 часов. Отделение экстракта от нерастворенной массы проводили центрифугированием экстракционной массы при 5000 г в течение 20 мин.

Выделение меланина из щелочного экстракта проводили снижением рН экстракта раствором HCl до 2,0, и далее после 60-минутного перемешивания при 25 °С образовавшийся аморфный осадок меланина из жидкой фазы отделяли центрифугированием при 5000 г в течение 20 мин.

Для очистки аморфного осадка меланина от примесей полученный осадок подвергали переосаждению растворением его в растворе NaOH с последующей фильтрацией щелочного раствора и осаждением меланина из фильтрата снижением рН раствора до 2,0. Процедуру кислотного переосаждения проводили второй раз. Для освобождения от хлорида натрия и водорастворимых других примесей полученный аморфный осадок высушивали с продувкой горячего воздуха (50...55 °С), осадок меланина при непрерывном перемешивании обрабатывали обессоленной водой. Для перевода полученного водо-

нерастворимого меланина в водорастворимую форму промытый осадок меланина растворяли в аммиачной воде и подвергли вакуумпариванию при 40 °С и остаточном давлении 0,01 МПа до получения густой массы. Полученную массу высушивали в сушилке с продувкой горячего воздуха (45...50 °С). В результате высушивания получали аморфный осадок меланина темно-коричневого цвета с металлическим блеском [6].

Суть кислотного процесса обработки кожицы винограда заключалась в том, что так как меланин в биологических объектах находится в составе комплексов с другими биополимерами - белками, липидами, полисахаридами и полифенолами [7], то кислотной обработкой удастся разрушить указанные комплексы и в определенной степени очистить меланин от этих соединений.

Исследования показали, что при обработке выжимки винограда 0,3 моль/л раствором HCl в раствор переходят окрашенные в красный цвет компоненты. После снижения pH фильтрата до 7 в растворе образуется большое количество хлопьевидной массы, которая коагулируется. Выделенный хлопьевидный осадок не растворяется в щелочном растворе, т.к. он не является меланоподобным веществом.

Вес исходной кожуры после кислотной обработки и водной промывки снижается на 36 %.

Исследования по экстракции меланина из полученной кожуры раствором NaOH в интервале концентрации 0,2...0,6 моль/л, показало, что концентрация меланина в полученном щелочном экстракте увеличивается в 2,1 раза.

Установлено, что при экстракции повышение концентрации NaOH с 0,6 до 0,8 моль/л приводит к повышению количества меланина в экстракте примерно на 5...7%. Показано, что увеличение концентрации гидроксида натрия выше 0,6 моль/л нецелесообразно, так как это приводит к совместному частичному экстрагированию трудно отделяемых от меланинов примесей.

Исходя из вышесказанного, экстракцию меланина из обработанной кислотным раствором кожуры винограда осуществляли 0,6 моль/л раствором NaOH при температуре 65 °С в течение 3 часов. Отделение экстракта от нерастворенной массы проводили центрифугированием экстракционной массы при 5000 g в течение 20 мин.

Для установления принадлежности полученного пигмента к меланинам использовали качественные реакции с окислителями (H₂O₂, KMnO₄, FeCl₃). опыты показали, что при наличии небольшого количества FeCl₃ из водного раствора пигмента выпадает коричневый хлопьевидный осадок, который исчезает при добавлении избытка FeCl₃, что показывает наличие полифенолов в растворе меланина. При добавлении к водному раствору меланина раствор KMnO₄ происходит обесцвечивание раствора и выделение коричнево-черного осадка. Обесцвечивание раствора меланина происходит также при добавлении к раствору меланина раствора H₂O₂. Эти реакции показывают присутствие в молекуле полученного пигмента хиноидных структур [1].

Поглощение света природными пигментами имеет фундаментальное значение и определяет основную функцию меланинов.

Спектрофотометрирование полученного пигмента осуществляли в водных растворах.

Спектры поглощения меланинов имеют вид пологих кривых с постепенным уменьшением оптической плотности по мере возрастания длин волны от 200 до 600 нм, что характерно для всех меланинов независимо от происхождения [8]. Максимальная абсорбция наблюдается при длине волны 200 нм.

Аммонийную соль меланина подвергали анализу с использованием метода ВЭЖХ.

Установлено, что в полученном образце содержатся четыре фракции меланина, что подтверждают результаты гель-фильтрации. Все фракции представляли собой меланиноподобные пигменты, которые дали положительные реакции, характерные для выявления меланинов.

Инфракрасный спектр (ИК) поглощения является одной из важных спектральных характеристик меланина.

При сопоставлении ИК спектров меланиновых пигментов выделенного из *Auricularia polytricha* гриба [9], синтетического и микробного [10], и полученного нами меланина из растительного сырья обнаруживается сходство в отношении основных полос поглощения.

Выводы

Получение водорастворимых препаратов меланина имеет важное практическое значение, поскольку в таком виде они доступны для исследований на живых организмах.

На основании проведенных исследований разработана доступная дешевая эффективная технология промышленного производства водорастворимого меланина из отходов растительного сырья с целью его широкого практического использования.

Вследствие того, что полученный меланин проявляет антиоксидантное и радиопротекторное свойства, является термо- и светостойчивым, а пигмент водорастворим, то его можно использовать в качестве природного антиоксиданта в пищевой промышленности, в медицине и в других областях.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. **Prota G.** Melanins and Melanogenesis. -N-Y.: Acad. Press, 1992- 290 p.
2. **Borshchevskaya M.I. and Vasilieva SM.** The development of knowledge of biochemistry and armacology of melanin pigments // *Voprosi medicinskoj khimii.*- 1999.- 1.- P. 24-35.
3. US Patent N 5227459A .- 1993.
4. ՀՀ Արտոնագիր N 1385 A2. Մանրէաբանական սինթետիկ ջրալուծ մելանինի ստացման եղանակ.- 2003:

5. Пат России N 2278163. Способ получения меланина.- 2006.
6. ՀՀ Արտոնագիր N 3397A. Մելանինի ստացման եղանակ.- 2020:
7. **Zengyu Yao, Jianhua Qi, and Lihua Wang.** Isolation, fractionation and characterization of melanin-like pigments from chestnut (*Castanea mollissima*) shells //J. Food Science.- 2012.- 77 (6).- P. 671-676.
8. **Harki E., Talou T., Dargent R.** Purification, characterisation and analysis of melanin extracted from *Tuber melanosporum* Vitt //Food Chem.- 1997.- 58 (1-2).- P. 69-73.
9. Physicochemical properties and the extraction process of natural melanin from *Auricularia polytricha* /**Xin Liu, Ruolin Hou, Yiping Huang, Kaiqiang Xu, et al** //SDRP Journal of Food Science & Technology.- 2019.- 4; issue1.-P.539-552.
10. Isolation, purification and physicochemical characterization of water-soluble *Bacillus thuringiensis* melanin/**A. Aghajanyan, A. Hambardzumyan, A. Hovsepyan, et al** // Pigment Cell Res.2005. - 18.- P.130-135.

Ա.Ե. ԱՂԱԶԱՆՅԱՆ, Է.Վ. ՄԻՆԱՍՅԱՆ

ԲՈՒՍԱԿԱՆ ՀՈՒՄՔԻ ԹԱՓՈՆՆԵՐԻՑ ԶՐԱԼՈՒՅԾ ՄԵԼԱՆԻՆԻ ՍՏԱՑՄԱՆ ՏԵԽՆՈԼՈԳԻԱՅԻ ՄՇԱԿՈՒՄԸ ՈՒ ՆՐԱ ՖԻԶԻԿԱՔԻՄԻԱԿԱՆ ՀԱՏԿՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ ՈՒՍՈՒՄՆԱՍԻՐՈՒԹՅՈՒՆԸ

Վերջին շրջանում մեծ ուշադրություն է դարձվում արտադրության տարբեր բնագավառներում բնական պիգմենտների կիրառմանը: Այդ տեսանկյունից մեծ հետաքրքրություն է ներկայացնում բուսական հումքի թափոններից մելանինի ստացմանը:

Աշխատանքում ջրալուծ մելանինի ստացման համար որպես ելանյութ օգտագործվել է գինիների արտադրությունում ստացվող խաղողի թափոնի մզվածքը, ինչպես նաև արևածաղկի և շագանակի մզվածքը և այլն:

Ստացված պիգմենտի նույնականացումը իրականացվել է սպեկտրոսկոպիկ եղանակներով: Զերմային մշակմամբ պարզվել է, որ մելանինի ամորֆ նստվածքը կայուն է մինչև 120 °C, իսկ մելանինի լուծույթի թթվակայունությունը ընկած է pH>4,0 տիրույթում:

Հել-ֆիլտրման, էլեկտրաֆորեզի և բարձր արդյունավետությամբ հեղուկ քրոմատոգրաֆիական անալիզի եղանակներով պարզվել է, որ ստացված պիգմենտը կազմված է չորս ֆրակցիաներից: Ամորֆ նստվածքում որոշվել են ֆրակցիաների մոլեկուլային կշիռները և քանակը: Որակական անալիզով և սպեկտրոսկոպիկ եղանակով պարզվել է, որ այդ ֆրակցիաները նման են տիպիկ մելանիններին:

Որոշվել է ստացված մելանինի տարրային կազմը և հակաօքսիդանտային հատկությունը: Պարզվել է մելանինի սպիտակուցի ամինաթթվային կազմը և լուծելիությունը:

Ելնելով ստացված մելանինի ֆիզիկաքիմիական հատկություններից՝ ցույց է տրվել, որ այն կարելի է կիրառել որպես արդյունավետ բնական սննդային ներկանյութ ու բույսերի աճի կենսախթանիչ, ինչպես նաև որպես հակաօքսիդանտ:

Առանցքային բառերը. մելանին, անջատում, մաքրում, հատկություն, բուսական հումք:

A.E. AGHAJANYAN, E.V. MINASYAN

DEVELOPING THE TECHNOLOGY FOR PRODUCING WATER-SOLUBLE MELANIN FROM THE WASTE OF PLANT RAW MATERIALS AND STUDYING ITS PHYSICOCHEMICAL PROPERTIES

Recently, an increased attention to the use of natural pigments in various areas of industry is observed. From this viewpoint, the production of melanins from plant waste is of great interest. In the work, the waste of winery production – grape squeezes, as well as squeezers of seeds, chestnut shells, etc were used as a raw material.

The identification of the resulting pigment was carried out by spectroscopic methods. Heat treatment established that the amorphous precipitate of melanin was stable at temperatures up to 120 ° C, and the acid resistance of the obtained melanin solution was in the range of pH > 4.0. By gel filtration, electrophoresis and high performance liquid chromatography (HPLC), it was found that the obtained pigment contained four fractions. Their molecular weights and the amount in the amorphous precipitate were determined. Qualitative reactions and spectroscopic methods have shown that those reactions were similar to typical melanins. The elemental composition of the obtained melanin and its antioxidant properties were determined. The amino acid composition of melanin protein and the degree of solubility were determined.

Based on the physicochemical properties of the resulting melanin, it has been shown that it can be used as an efficient natural food coloring and plant growth stimulant, as well as an antioxidant.

Keywords: melanin, isolation, purification, property, plant material.