

## БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

УДК 54.05:582.87

DOI 10.26456/vtchem2024.4.9

### ПОЛУЧЕНИЕ МЕЛАНИНОВЫХ ВЕЩЕСТВ ИЗ ПЛОДОВЫХ ОБОЛОЧЕК РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ

Е.А. Прутенская<sup>1</sup>, В.И. Ущাপовский<sup>2,3</sup>, А.Е. Филатова<sup>1,2</sup>,  
В.М. Фефилова<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ФГБОУ ВО «Тверской государственный университет», г. Тверь

<sup>2</sup>ФГБОУ ВО «Тверской государственный технический университет»,  
г. Тверь

<sup>3</sup>Федеральное государственное бюджетное научное учреждение (ФГБНУ)  
Федеральный научный центр лубяных культур, г. Тверь

В статье приведены результаты исследований по выделению и очистке от сопутствующих веществ меланина плодовых оболочек масличных культур: подсолнечника и технической конопли. Установлено, что оптимальная температура экстракции меланиновых веществ – 60<sup>0</sup>С, при более высокой температуре происходит увеличение количества примесей в конечном продукте, в результате процесса омыления жиров. Методом РФЭС в нативном меланине был обнаружен азот, что свидетельствует о наличии белковых веществ. Для удаления пептидов использовали ацетон. Значительное снижение концентрации сопутствующих веществ в меланине подтверждено УФ-спектроскопией.

**Ключевые слова:** плодовые оболочки, меланин, очистка.

Одним из направлений химической технологии является разработка способов получения высокоочищенных биологически активных веществ, в частности, меланинов, которые могут применены в медицине, фармакологии, биоэлектронике [1]. Меланины обладают высокой биологической активностью в частности антиоксидантной [2], геропротекторными [3], а также иммуномодулирующими свойствами, являются стимуляторами роста семян и др. [4]. Широкий спектр свойств меланинов обусловлен их строением и способом получения.

Специфическое строение молекул меланинов, способствует проявлению свойств, обеспечивающих защиту клеточных систем от факторов канцерогенной и мутагенной природы. В зависимости от способа получения меланиновые вещества могут содержать различные сопутствующие вещества, которые определяют биологическую активность, а также компоновку и размер молекулы меланина. Например, экстракты меланиновых веществ чаги, полученные после высокочастотной плазменной обработки исходного сырья, содержат

больше экстрактивных веществ, в том числе фенольных, углеводных и обладают большей интегральной антиоксидантной активностью, по сравнению экстрактами, полученными методами мацерации [5]. Считается, что антиоксидантная активность меланиновых веществ увеличивается не только за счет сопутствующих веществ, но и за счет увеличения количества парамагнитных центров частиц меланина [6-8]. На антиоксидантную активность меланинов чаги влияет также рН экстрагента, использование комплексонов и экстрагентов с разветвлённой химической структуры. Под действие химических и физических факторов происходит изменение размера молекулы, структурная перестановка группировка, все это приводит к изменению компоновки молекулы меланина [6,9]

Химический состав и свойства меланиновых веществ зависят не только от происхождения, но и от способа извлечения. Из-за большого разнообразия путей биосинтеза, точная структура и функции многих меланинов до сих пор не выяснены и приведенные в литературе данные об их физико-химических свойствах, в основном, относятся к меланинам растворимых в водных растворах щелочи. Трудности получения меланинов из биологических материалов и изучения их состава связаны с тем, что все меланиновые пигменты являются аморфными веществами.

Целью данной работы является получение меланинов из природного сырья, с минимальным количеством сопутствующих веществ.

#### **Экспериментальная часть**

Сырьем для выделения меланина являлись плодовые оболочки технической конопли и лузги подсолнечника. Лузга конопли была предоставлена Федеральным государственным бюджетным научным учреждением (ФГБНУ) Федеральным научным центром лубяных культур, год выращивания 2021.

Меланиновые вещества выделяли из растительного сырья, согласно ранее разработанному способу: измельчение сырья, экстракция пигментов 0.1 н раствором NaOH, отделение биомассы от экстракта, осаждение меланинов конц. HCl, центрифугирование, промывание водой, лиофильная сушка [10].

Для подтверждения наличия в структуре фенольных и хиноидных компонентов в меланине проводили качественные реакции с 10% раствором H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 0,5М KMnO<sub>4</sub> и 1% раствором FeCl<sub>3</sub> [11]. Выделенные меланины из растительного сырья продемонстрировали положительные качественные реакции с реагентами.

Для удаления жиров из растительного материала использовали экстракцию в аппарате Сокслета органическим растворителем - гексаном.

Спектры поглощения выделенных пигментов определяли на спектрофотометре «ЭКРОСХИМ» ПЭ-5400УФ в ультрафиолетовом спектральном диапазоне  $\lambda=200-400$  нм. Методом динамического светорассеяния с помощью спектрометра фотон-корреляционной спектроскопии 90Plus определяли размер меланиновых частиц. Количество азота на поверхности меланина определяли с помощью электронного спектрометра ЭС – 2403 СКБ АП РАН, оснащенного анализатором энергии PNOIBOS 100-5MCD (производство Specs GmbH, Германия) и рентгеновским источником MgK $\alpha$ /AlK $\alpha$  XR-50 (производство Specs GmbH, Германия).

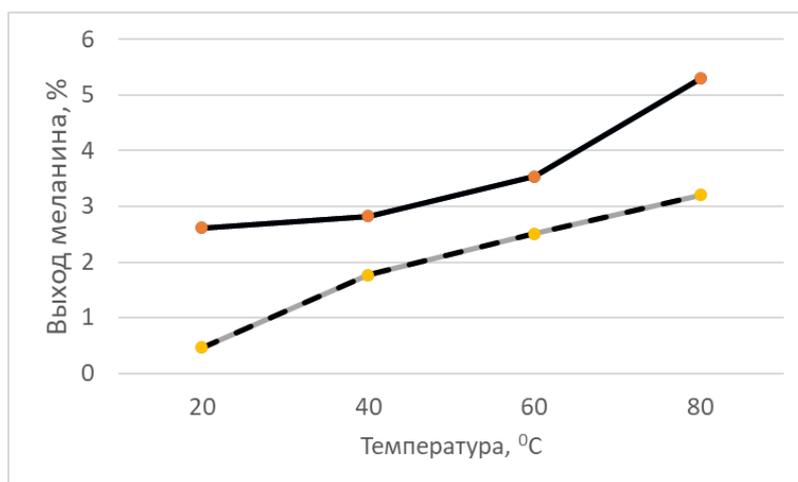
### **Обсуждение результатов**

На основании анализа литературных данных хочется отметить, что меланиновые вещества, полученные в результате экстракции водным раствором NaOH из растительного сырья, содержат различные сопутствующие вещества: белковые вещества, липиды, и др. [2,4-6]. Сложный химический состав меланинового комплекса влияет не только на биологическую активность, но и на физико-химические свойства конечного продукта. Например, удаление сопутствующих веществ или снижение их концентрации в меланиновом комплексе приводит к повышению хелатирующей способности меланина за счет увеличения сайтов связывания с металлами в молекуле [13]. Таким образом, варьируя способы очистки можно получать меланины с минимальным количеством примеси и со свойствами, не характерными для нативных меланинов.

Для выделения пигментов сырье измельчали, просеивали и использовали частицы размером от 1 мм до 10 мм. Затем экстрагировали раствором 0.1н NaOH. Осуществляли варьирование температуры экстракции. Остальные условия были оставлены согласно разработанной ранее методики [10,12]: время экстракции 30 минут, соотношении лузга/экстрагент 1:40.

В процессе экстракции меланиновых веществ из растительного сырья при повышении температуры экстракции происходит увеличение выхода меланиновых веществ (рис. 1). Наибольшее количество было получено из лузги подсолнечника.

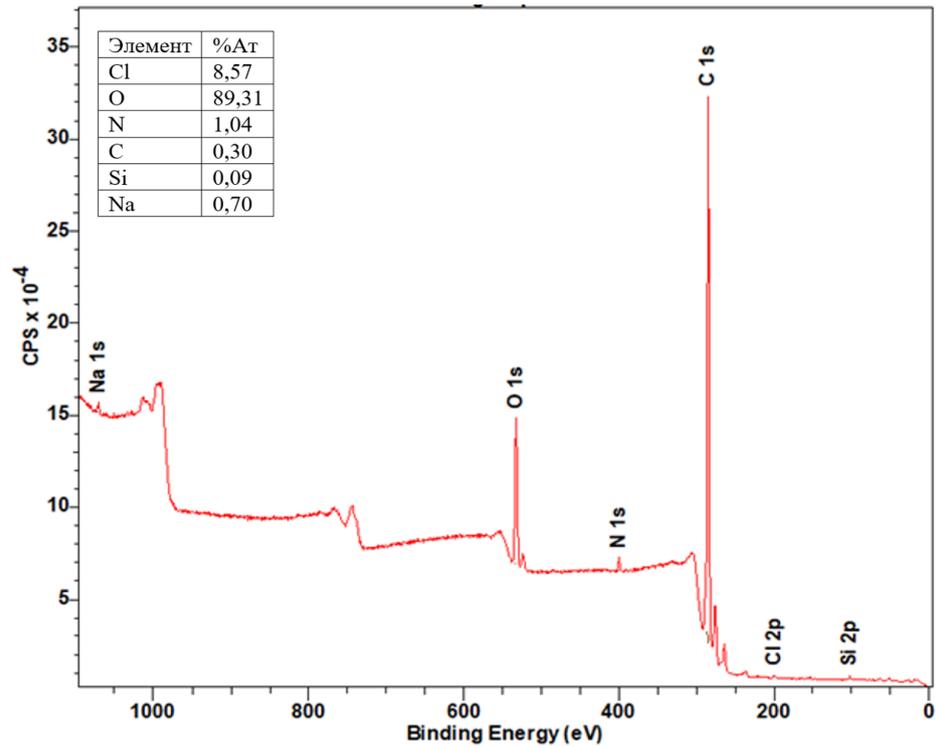
Однако, как показали исследования, при температуре 70<sup>0</sup>С происходит омыление жирных кислот, входящих состав плодовой оболочки масличных культур. Это подтверждается и образованием белого налета на поверхности меланинового осадка после центрифугирования. При этом выпадение в осадок мыла происходит при добавлении соляной кислоты в щелочной экстракт меланиновых веществ и образовании в растворе нейтральной соли хлорида натрия, а как известно в соленой воде мыло плохо растворяется.



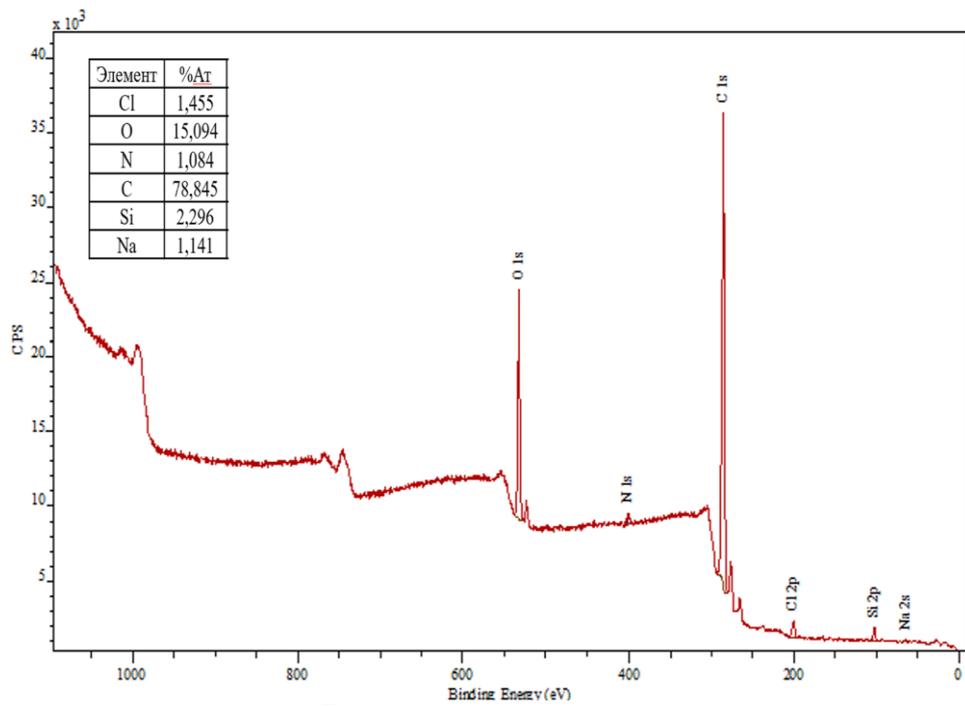
— - плодовая оболочка подсолнечника  
 - - - - - плодовая оболочка технической конопли  
 Рис. 1. Влияние температуры на выход меланиновых веществ

В связи с этим было решено произвести обезжиривание исходного сырья после процесса измельчения для удаления жировой фракции. Для этого использовали органический растворитель - гексан. Выход меланиновых веществ из плодовых оболочек составил 3,6 % и 2,6 % соответственно для лузги подсолнечника и конопли. Таким образом, при 60°C выход меланина из необезжиренного сырья сопоставим с полученными результатами. Затем определяли средний эффективный диаметр частиц у меланина, полученного при температурах 60°C и 80°C, а также у продукта, полученного при 60°C из обезжиренного сырья. Результаты получены с помощью функции расчета мультимодального распределения частиц 457,7 нм, 546,9 нм и 465,3 нм соответственно.

Однако, дальнейшие физико-химические исследования показали, что в составе меланина присутствуют азотсодержащие вещества, вероятнее всего белки и аминокислоты. Методом РФЭС в полученных образцах меланиновых веществ был обнаружен азот в количестве до 1,1% Ат (рис.2). Похожие результаты были получены при анализе меланинов, полученных из *Apiosporina morbosa*, где азот идентифицировался в виде аминогрупп [15]. Помимо этого, в процессе экстракции могут оставаться примеси или контаминанты, которые содержат азот. Это может быть причиной появления азотных пиков в спектре (рис.3А). Поэтому удаление азотсодержащих веществ осуществляли путем обработки экстракта ацетоном. Ацетон наиболее полно, в отличие от других органических растворителей денатурирует пептиды.



А – меланин конопли технической



Б – меланин подсолнечника

Рис. 2. Обзорный фотоэлектронный спектр поверхности меланина

Для этого на этапе фильтрации экстракта от плодовых оболочек семян конопли вводили раствор ацетона. В процессе введения ацетона, щелочной раствор помутнел. Далее белок отделяли центрифугированием. Экстракты меланиновых веществ до (рис. 2 А) и после обработки ацетоном (рис. 2Б) исследовали с помощью абсорбционной спектроскопии в УФ области. Вид полученных электронных спектров был в виде пологой кривой с монотонным увеличением поглощения излучения на более низких длинах волн. Пик спектра поглощения был отмечен при длине волны в 220 нм. Такой вид спектра является типичным для представителей данного класса соединений [13]. Отличительной характеристикой на спектре флуоресценции раствора меланина, выделенного из экстракта с осажденным белком (рисунок 2 Б), было отсутствие пика в диапазоне длин волн при 350-360 нм. Регистрируемое отсутствие пика, может быть, в результате изменения полимерной цепи меланина или удаления сопутствующих соединений путем их растворения в ацетоне.

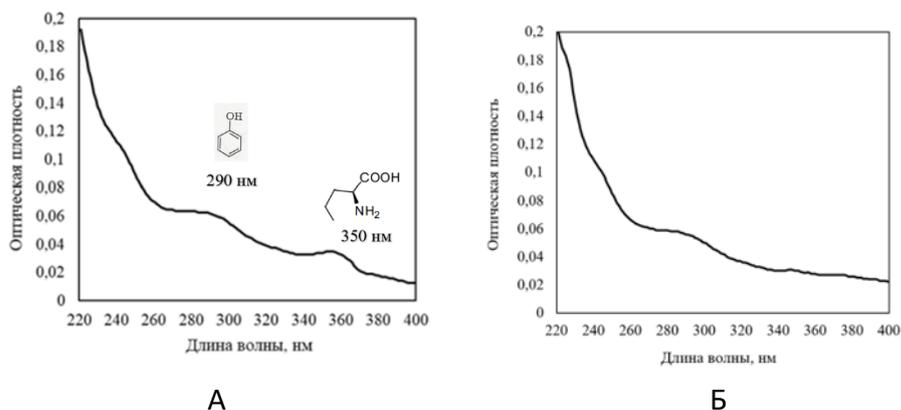


Рис. 3. Электронный спектр поглощения меланина, выделенного из оболочек семян посевной конопли А- без обработки ацетоном, Б- с обработкой ацетоном

Результаты рентгенофотоэлектронной спектроскопии также показало, что на поверхности полученных меланиновых веществ практически отсутствует азот, входящий в состав белков. Также при исследовании размера частиц меланина методом динамического светорассеяния было отмечено, что средний эффективный диаметр частиц меланина изменялся после обработки экстракта ацетоном с 465,3 нм до 370 нм. Следовательно, цель работы была достигнута путем последовательного извлечения сопутствующих веществ, сначала из сырья, затем из экстракта.

### Вывод

На основании проведенных исследований можно отметить, что авторами были получены меланиновые вещества, с минимальным содержанием сопутствующих веществ. Полученные вещества могут быть использованы для получения металло-меланиновых комплексов, для целенаправленного использования в радиоэлектронике или медицине.

### Список литературы

1. Abramov P.A. Analysis of Melanin Properties in Radio-Frequency Range Based on Distribution of Relaxation Times /P. A. Abramov, S. S. Zhukov, Z. V. Bedran, B. P. Gorshunov, and Konstantim A. Motovilov// In book: 5th International Conference on Nanotechnologies and Biomedical Engineering (January).-2022.- pp.515-521 DOI:10.1007/978-3-030-92328-0\_66
2. Иванова Л.А., Разработка технологий получения фитомеланинов на отходах масличного производства/ Л. А.Иванова, И. А.Фоменко, Д. А.Сергеева, Л. А.Чурмасова, Ж. К. Кабаржан// Health, Food & Biotechnology.-2019.-1(2).-С.245 <https://doi.org/10.36107/hfb.2019.i2.s245>
3. Усольцева О.Н. Меланины: функциональные свойства и возможности применения в медицинской практике/ Усольцева О.Н., Потупчик Т.В., Полотова А.А.//Фармация -2024.- Том 73.- № 6. - С.39-47 <https://doi.org/10.29296/25419218-2024-06-06>
4. Önder Özdemir, Yüksel Keleş, Extraction, purification, antioxidant properties and stability conditions of phytomelanin pigment on the sunflower seeds. International J. of Secondary Metabolite. Vol. 5, No. 2, 140–148 (2018) <https://doi.org/10.21448/ijsm.377470>
5. Кузнецова О.Ю. Экстракты и меланины чаги, полученные после плазменной обработки сырья/О.Ю. Кузнецова, М.Ф. Шаехов, Г.К. Зиятдинова, Г.К. Будников// Ученые записки Казанского университета. Серия Естественные науки.- 2019.- Т. 161(кн. 2).- С. 211-221 doi: 10.26907/2542-064X.2019.2.211-221
6. Сушинская Н.В. Меланины трутовых грибов/ Н.В. Сушинская, В.П.Курченко//Труды Белорусского государственного университета. Физиологические, биохимические и молекулярные основы функционирования биосистем.-2006.-Т.1. (Ч.1) – с.147-158
7. Лях С.П., Булгак М.Л., Исаев А.Г. Астромеланин. Лечебное средство для меланинотерапии (ЗАО «Тиссо», Москва, 2007), 167 с.
8. Сысоева, М. А. Высокодисперсные коллоидные системы и меланины чаги (Казанский национальный исследовательский технологический университет. – Казань : Казанский национальный исследовательский технологический университет (КНИТУ), 2013. – 228 с.
9. Иванова Г.А. Гепатопротекторные свойства меланинов чаги / Г.А. Иванова, М.А. Сысоева, В.В. Зобов // Бутлеровские сообщения. 2013. Т.35.- №9.-с. 84-89
10. Пат. 2 665 166 С1 Российская Федерация, МПК А61К 36/28:В01Д 11/02. Способ получения меланиновых веществ из лужги подсолнечника.- № 2017142514, заявл. 05.12.2017, опубл. 28.08.2018, Бюл. № 25. – 9 с.

11. Хабибрахманова В., Рассабина А., Хайруллина А., Минибаева Ф. Физико-химические характеристики и антиоксидантные свойства меланинов, выделенных из лишайника *Leptogium furfuraceum* (harm.) Химия растительного сырья. №. 4. - С. 115-125. (2022) <https://doi.org/10.14258/jcprm.20220411774>
12. Прутенская Е.А., Мисников О.С., Сульман М.Г., Косивцов Ю.Ю., Переработка лузги подсолнечника и торфа с получением меланиновых веществ и композиционных топливных брикетов. Горный журнал № 5. С. 36-41. (2022). <https://doi.org/10.17580/gzh.2022.05.04>
13. I. Pralea et al., From extraction to advanced analytical methods: The Challenges of Melanin Analysis. International Journal of Molecular Sciences. V. 20 (16). 38 p. (2019) doi: 10.3390/ijms20163943
14. Lian Hong I, John D Simon. Current Understanding of the Binding Sites, Capacity, Affinity, and Biological Significance of Metals in Melanin. J Phys Chem. B Jun 20;111(28):7938–7947. (2007) doi: 10.1021/jp071439.
15. S. Singla et al. Isolation and Characterization of Allomelanin from Pathogenic Black Knot Fungus—a Sustainable Source of Melanin. ACS Omega. V. 6 (51). P. 35514–35522. (2021). <https://doi.org/10.1021/acsomega.1c05030>

*Об авторах:*

ПРУТЕНСКАЯ Екатерина Анатольевна – кандидат биологических наук, доцент, заведующий кафедры биохимии и биотехнологии, ФГБОУ ВО «Тверской государственный университет» (170100, г. Тверь, ул. Желябова, 33); e-mail: Prutenskaya.EA.tversu.ru

УЩАПОВСКИЙ Валентин Игоревич – аспирант кафедры биотехнологии, химии и стандартизации, ФГБОУ ВО «Тверской государственный технический университет» (170026, г. Тверь, наб. Афанасия Никитина, 22); младший научный сотрудник лаборатории переработки лубяных культур, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение (ФГБНУ) Федеральный научный центр лубяных культур (170041, Россия, г. Тверь, Комсомольский проспект, 17/56); e-mail: v.uscharovsky@fncl.ru

ФИЛАТОВА Анастасия Евгеньевна – кандидат химических наук, доцент кафедры биотехнологии, химии и стандартизации, ФГБОУ ВО «Тверской государственный технический университет» (170026, г. Тверь, наб. Афанасия Никитина, 22); доцент кафедры биохимии и биотехнологии, ФГБОУ ВО «Тверской государственный университет» (170100, г. Тверь, ул. Желябова, 33); e-mail: afilatowa@mail.ru

ФЕФИЛОВА Валентина Михайловна – магистрант 1 курса, факультет природопользования и инженерной экологии, ФГБОУ ВО «Тверской государственный технический университет» (170026, г. Тверь, наб. А. Никитина, 22); e-mail: afilatowa@mail.ru

## OBTAINING MELANIN SUBSTANCES FROM FRUIT SHELLS OF PLANT RAW MATERIALS

**E.A. Prutenskaya<sup>1</sup>, V.I. Ushapovsky<sup>2,3</sup>, A.E. Filatova<sup>1,2</sup>, V.M. Fefilova<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>*Tver State University, Tver*

<sup>2</sup>*Tver State Technical University, Tver*

<sup>3</sup>*Federal Scientific Center of Bast Crops, Tver*

The article presents the results of studies on the isolation and purification of melanin from associated substances in the fruit coats of oil crops: sunflower and industrial hemp. It was found that the optimal temperature for the extraction of melanin substances is 60°C; at a higher temperature, the amount of impurities in the final product increases as a result of the saponification of fats. Nitrogen was detected in melanin using the XPS method, indicating the presence of protein substances. Acetone was used to remove peptides. A significant decrease in the concentration of associated substances in melanin was confirmed by UV spectroscopy.

**Key words:** *fruit coats, melanin, purification.*

Дата поступления в редакцию: 21.11.2024.  
Дата принятия в печать: 25.11.2024.