

УДК 579.66

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЕ ПОЛУЧЕНИЕ ВОДОРАСТВОРИМОГО МЕЛАНИНА И ИЗУЧЕНИЕ ЕГО ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ

© 2011 г. А. Е. Агаджанян, Р. А. Асатуриян, А. А. Амбарцумян, Л. Б. Саргисян, А. С. Овсепян, А. А. Варданян, А. С. Сагиян

Научно производственный центр “Армбиотехнология” ГНКО НАН РА, Ереван 0056, Армения

e-mail: aghajanyanarmen@yahoo.com

Поступила в редакцию 12.01.2011 г.

Разработан эффективный сорбционный метод выделения и очистки меланина из культуральной жидкости *Bacillus thuringiensis* serovar *galleriae* K1, представлена принципиальная технологическая схема получения. Идентификацию полученного пигмента с образцами природного и синтетического меланинов проводили методом ИК-спектроскопии, а соотношение интенсивностей оптического поглощения при 650 и 500 нм позволяет выделенный меланин отнести к классу эумеланинов. Термической обработкой установлено, что аморфный осадок меланина устойчив при температурах до 120°C, при этом концентрация парамагнитных центров изменяется с 0.053×10^{18} спин/г (48°C) до 0.25×10^{18} спин/г (120°C). Повышение температуры обработки до 210°C приводит к существенному увеличению концентрации неспаренных электронов, и при 280°C наблюдается ее резкий рост. При 350°C рост прекращался, а затем наблюдался спад. Полученные результаты подтверждены методами ИК-спектроскопии и дериватографии.

Меланины – темноокрашенные высокомолекулярные нерегулярные биополимеры, образующиеся в организмах при ферментативном окислении азотсодержащих и безазотистых полифенолов [1, 2]. Являясь ингибитором свободнорадикальных реакций, меланины способны подавлять рост злокачественных опухолей, оказывать защитное действие от летальных доз ионизирующего излучения, тормозить процессы перекисного окисления липидов, стимулировать рост растений. Меланины используются в медицине, фармакологии, сельском хозяйстве и в других областях [3].

Меланины получают химическим [4] и микробиологическим синтезом [5–8], а также экстракцией из животного и растительного материала [2, 9].

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

Трудности выделения и очистки меланинов из биологических материалов и изучения их структуры связаны с тем, что все меланиновые пигменты являются аморфными веществами [1, 2]. Вследствие этого, а также из-за большого разнообразия путей их биосинтеза, точная структура и функции многих меланинов до сих пор не выяснены [10] и приведенные в литературе данные об их физико-химических свойствах, в основном, относятся к водонерастворимым диоксифенилаланин-меланинам [1, 2, 11, 12].

Большое разнообразие биологического сырья для получения меланина послужило препятствием созданию стандартного метода выделения и очистки пигмента.

Основная проблема при микробиологическом способе получения меланина заключается в том, что использованные штаммы при ферментации синтезируют внутриклеточный меланин. Для получения меланина нами использовался штамм-продуцент, накапливающий в культуральной жидкости (КЖ) внеклеточный водорастворимый меланин, что значительно облегчает последующие процессы его выделения.

Цель исследования – разработка эффективного способа получения водорастворимого микробного меланина и изучение его физико-химических свойств.

МЕТОДИКА

Использовали штамм-продуцент *Bacillus thuringiensis* serovar *galleriae* K1 (депонированный номер ИНМИА 11212), полученный нами из производственного инсектицидного штамма *B. thuringiensis galleriae* 69-6 методом химического мутагенеза [13]. Ферментацию проводили в лабораторном ферментере Анкум-2М (Россия) с рабочим объемом 7 л, при следующих технологических параметрах: рН 7.3–7.8; температура 30–32°C, $KLa = 180–220 \text{ ч}^{-1}$; продолжительность ферментации 72–76 ч. Для ферментации использовали среду следующего со-

става (%): пшеничные отруби – 1.5–2.0; 20%-ный сернокислотный гидролизат рыбной муки – 2.5–3.0; NaCl – 0.2; $MnCl_2$ – 0.01; $CaCl_2$ – 0.05. Концентрация меланина в полученной культуральной жидкости составляла 7–8 г/л. Биомассу использовали в качестве основы для получения инсектицидного препарата.

Сорбцию меланина из супернатанта КЖ на низкоосновном пористом анионите ИА-1р конденсационного типа (Россия) обладающим хорошей поглотительной способностью пигментов [14, 15] в динамических условиях проводили при линейной скорости потока супернатанта по направлению снизу вверх, равной 0.034 см/с. Элюцию меланина со смолы проводили 3%-ным аммиачным раствором при скорости потока элюента по направлению сверху вниз, равной 0.015 см/с.

Контроль за ходом процесса осуществляли изменением оптической плотности (ОП) раствора при 315 нм и сравнением полученной величины со значением ОП стандартного раствора меланина.

ИК-спектры снимали на спектрометре Nexus Nicolet FT-IR (“Thermo Nicolet”, США) с призмой из ZnSe (4000–650 cm^{-1}) с однократным отражением, число сканирований 32, разрешение 4 cm^{-1} .

Спектры ЭПР регистрировали при 20°C на спектрометре типа SE/X-2543 (“Radiopan”, Польша) с высокочастотной модуляцией 100 кГц на частоте 9.4 ГГц.

Оптические спектры поглощения снимали на спектрометре 550S UV-VIS (“Perkin Elmer”, США).

Термогравиметрический анализ проводили на дериватографе марки Q-1500 (“MOM”, Венгрия) при скорости нагрева 5°C/мин в атмосфере воздуха.

Содержание белка в образцах меланина определяли по методу Брэдфорд.

Анализ элементного состава меланина осуществляли на анализаторе EURO EA 300 (Италия).

Для приготовления стандартных растворов использовали синтетический меланин фирмы “Sigma” (США), а также полученный нами очищенный препарат водорастворимого меланина.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Исследования показали, что наиболее эффективный способ выделения меланина из супернатанта КЖ – сорбционный [16, 17]. Сорбция меланина из супернатанта изучена в зависимости от типа применяемого сорбента или смолы, величины рН раствора и размера гранул смолы [17]. По совокупности параметров (доступность, прочность, большая емкость, легкость элюции) наиболее предпочтительным сорбентом для извлечения меланина из КЖ оказалась ионообменная смола ИА-1р (фракция –0.6 – +0.2 мм) в СГ-форма, с рН равновесного раствора при сорбции 3.5–4.0.

Несмотря на то, что при этом часть пигмента из раствора переходила в осадок, в случае соблюдения условий гидродинамического режима, образовавшийся осадок не мешал эффективной сорбции [17]. Нерастворенная часть меланина вместе с сорбированной при элюции аммиачной водой переходила в элюат. Собранный аммиачный элюат подвергали вакуум-упариванию до концентрации меланина 70–90 г/л. С целью освобождения от пирогенов и других микропримесей элюат подвергали ультрафильтрации с дальнейшим вакуум-упариванием до концентрации меланина в растворе 250–270 г/л. Из упаренного раствора высушиванием получали черно-коричневую аморфную массу с металлическим блеском [16, 17]. Разработанная принципиальная технологическая схема выделения меланина из КЖ представлена на рис. 1.

Для установления принадлежности полученного пигмента к меланинам использовали качественные реакции с окислителями (H_2O_2 , $KMnO_4$, $FeCl_3$). Результаты показали присутствие в молекуле полученного пигмента хиноидных и фенольных структур, что подтвердило его меланиновую природу [1, 2, 18].

Поглощение света природными пигментами имеет фундаментальное значение и определяет основную функцию меланинов. Спектрофотометрирование полученного пигмента осуществляли в водном и в щелочном растворах, а синтетического меланина – в щелочном растворе.

Величины ОП растворов синтетического и микробного меланинов в щелочной среде монотонно снижались с увеличением длины волны. У спектров обоих меланинов в области 300–340 нм наблюдалось плато, что, по-видимому, связано с наличием в молекуле меланинов группировок ароматической природы, поглощающих свет при вышеуказанной длине волны. Снижение рН раствора приводило к сдвигу пика спектра поглощения микробного меланина в сторону увеличения длины волны. Из рис. 2 видно также, что в области 220–300 нм при нейтральном рН раствора у микробного меланина наблюдалось снижение величины коэффициента экстинкции, что коррелировало с данными ЭПР-спектроскопии – уменьшение величины сигнала ЭПР с понижением значения рН раствора [16].

Исследована интенсивность спектра поглощения синтетического и микробного меланина в зависимости от времени выдержки растворов. Опыты показали независимость коэффициента экстинкции как синтетического, так и микробного меланина от времени выдержки их растворов в течение 15 сут при комнатной температуре в темноте.

В ряде работ для определения принадлежности пигментов к эумеланинам или феомеланинам предлагается использовать отношение интенсивностей поглощения при 650 и 500 нм. Так, у синтетических

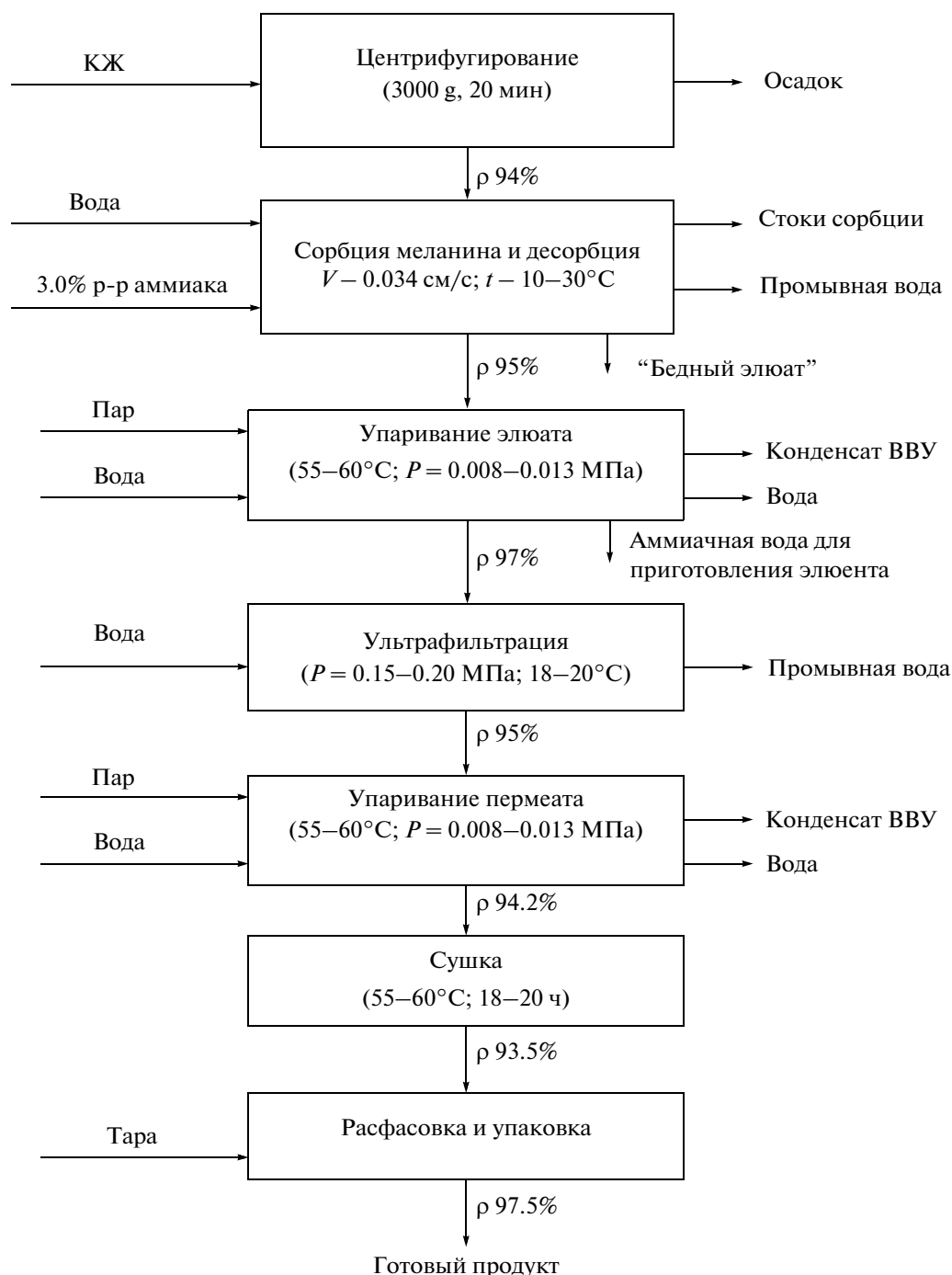


Рис. 1. Принципиальная технологическая схема выделения меланина из КЖ, ρ – выход на стадии, ВВУ – вакуум выпарная установка.

эумеланинов отношение D 650/500 колебалось в диапазоне 0.25–0.33, а у синтетических феомеланинов – диапазоне 0.10–0.14 [19, 20]. Проведенные нами эксперименты показали, что отношение интенсивностей поглощения микробного и синтетического меланина при 650 и 500 нм составляло 0.328 и 0.315 соответственно. Из полученных по вышеука-

занному способу данных следует, что оба меланина принадлежат к эумеланинам.

В ИК-спектре водорастворимого микробного меланина присутствовали полосы, характерные для меланинов [16, 17]. При сопоставлении ИК-спектров виноградных меланиновых пигментов [21], пигментов, выделенных из природной и

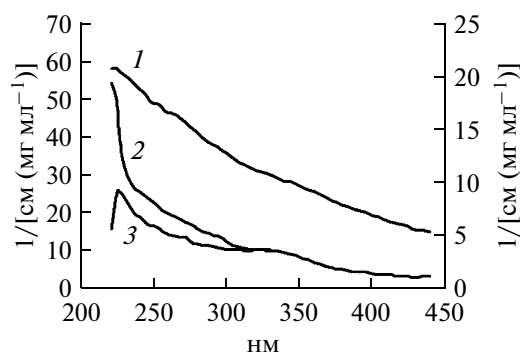


Рис. 2. Спектры поглощения меланина: 1 – синтетический меланин, рН 11.5 (левая шкала); 2 – микробный, рН 11.5 (правая шкала); 3 – микробный, рН 7.2 (правая шкала).

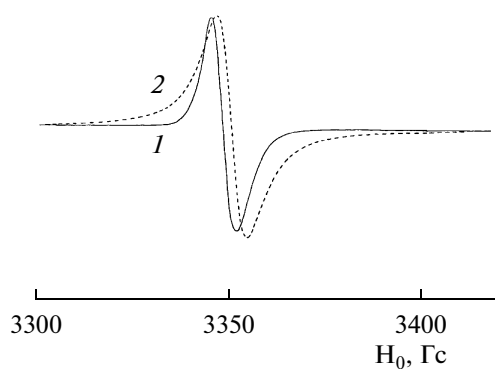


Рис. 3. Спектры ЭПР меланинов микробного (1) и синтетического (2) происхождения при 20°C.

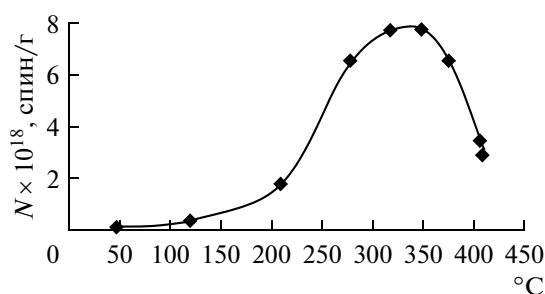


Рис. 4. Зависимость концентрации неспаренных электронов в микробном меланине от температуры обработки.

культивированной чаги [11], синтетического и полученного нами микробного меланина [16, 17] обнаруживается их сходство в отношении основных полос поглощения.

Особенностью меланинов, как природных полимеров, содержащих развитые системы сопряженных связей, является наличие неспаренных электронов. Все меланины без исключения имеют ЭПР-поглощение в виде слегка асиммет-

ричного синглетного сигнала без сверхтонкой структуры с величиной g -фактора, варьирующей в пределах 2.003–2.004 [22].

Парамагнетизм природных меланинов оказывает существенное влияние на многие важные свойства: электропроводность, обменную емкость, химическую реакционную способность, антиоксидантные свойства, биологическую активность и т.д. [11, 21–23].

Исходя из вышесказанного, для более полного исследования представлений о строении и свойствах исследуемых меланинов был применен метод ЭПР, который позволил получить информацию о парамагнитных центрах. Спектр микробного меланина представлял собой слегка асимметричный синглет без сверхтонкой структуры с шириной линии между точками максимальной крутизны около 7 гаусс и значением g -фактора, равным 2.003 (рис. 3).

Двойное интегрирование этого спектра показало, что в нем содержится 0.21×10^{18} спин/г парамагнитных центров. Спектр синтетического меланина был тоже синглетным, но линия поглощения представляла уже лоренцевую форму с g -фактором, равным 2,004 и шириной около 8 гаусс. Число неспаренных электронов в нем 0.37×10^{18} спин/г [16].

Полученный меланин хорошо растворим в воде, что позволило зарегистрировать его спектры ЭПР в растворе в зависимости от разбавления [16]. Показано, что в структуре меланина имелись два типа парамагнитных центров, один из которых являлся лабильным, а другой стабильным.

Исследование зависимости сигналов ЭПР от величины рН раствора показало, что в диапазоне рН от 3.0 до 7.6 наблюдалась почти линейная зависимость сигнала ЭПР от рН, а при рН выше 7.6 – ее резкий рост [16].

Изучено также влияние температурного воздействия на парамагнитные свойства микробного меланина и его растворимость. На рис. 4 представлена зависимость концентрации неспаренных электронов в 1 г микробного меланина от температуры обработки.

Контрольный образец, высушенный при 48°C, имел концентрацию 0.053×10^{18} спин/г. После прогрева до 120°C его концентрация увеличивалась до 0.25×10^{18} спин/г. Дальнейший рост температуры обработки до 210°C приводил к существенному увеличению концентрации неспаренных электронов и при 280°C наблюдался ее резкий рост. При 350°C рост прекращается, затем наблюдается спад.

Для понимания характера полученной кривой на этих же образцах меланина снимали ИК-спектры (рис. 5).

В спектре микробного меланина присутствуют полосы, которые являются идентификационными для меланинов [11, 16, 17]. Полосы в области 3400–

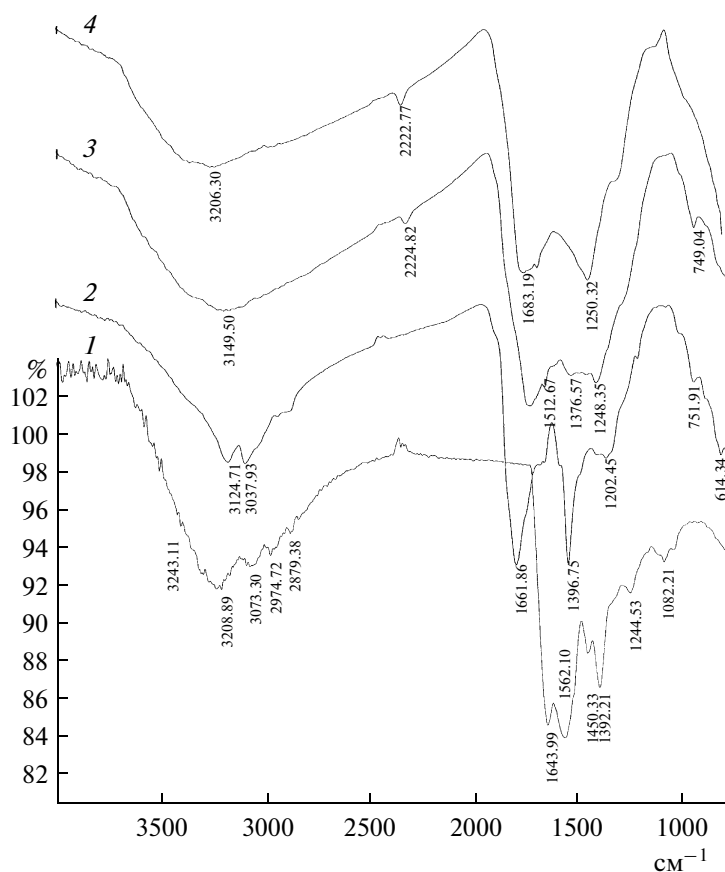


Рис. 5. ИК-спектры микробного меланина, обработанного при различных температурах: 1 – образец, высушенный при 48°C; 2 – 210°C; 3 – 280°C; 4 – 410°C.

3300 cm^{-1} обусловлены валентными колебаниями OH- и NH-групп; 2960–2870 cm^{-1} –CH₂-, –CH₃-групп; 1650–1600 cm^{-1} – колебаниями сопряженных двойных связей C=C и C=O, C=O в составе вторичных амидов; 1400 cm^{-1} – присутствием амидных и аминных групп, деформационными колебаниями NH-групп вторичных амидов, –CH₂ в составе алифатических радикалов, C=O хинонов; 1090 cm^{-1} – C–O-углеводных и спиртовых групп [24].

В исходном контрольном ИК-спектре (рис. 5, 1) наблюдалась полоса поглощения при 1644 cm^{-1} , которая относится к полосе сопряженных групп в меланине. В образце, обработанном при 210°C (рис. 5, 2), происходили резкие изменения в ИК-спектре: полоса, связанная с сопряженными связями, исчезала, и вместо нее появлялись 2 интенсивные полосы поглощения при 1662 и 1397 cm^{-1} . ИК-спектр образца меланина, прогретого при 280°C (рис. 5, 3), имел полосу, совершенно не связанную с сопряженными связями. Наконец, при 410°C (рис. 5, 4) наблюдался пик при 1683 cm^{-1} . По данным ИК-спектроскопии, наблюдалось соответствие между концентрацией спинов в меланине и температурой обработки образцов. Эти

данные подтверждены дериватографическим анализом (рис. 6).

Примерно с 80°C начиналось плавное уменьшение веса образца меланина. С 140°C наклон падения кривой изменения веса (рис. 6, 1) был более стремительным и это продолжалось до 320°C. Сравнительный анализ кривых дифференциально-термического анализа (рис. 6, 3) и дифференциально-термического изменения веса (рис. 6, 2) показывает, что появляющиеся эндотермические эффекты совпадали с изменением массы образца. На кривой выше 330°C, по-видимому, отражен процесс окисления углерода, который сопровождается дальнейшей потерей веса, и появление экзоэффекта. С 320°C меланин, по-видимому, начинал разлагаться, что подтверждается резким уменьшением концентрации свободнорадикальных состояний при температуре выше указанной. Эндотермические эффекты на кривых при низких температурах (менее 120°C), в основном, обусловлены удалением H₂O, а при высоких температурах – H₂O, CO₂ и NH₃ [25].

При высушивании образцов микробного меланина температуру можно поднимать до 120°C.

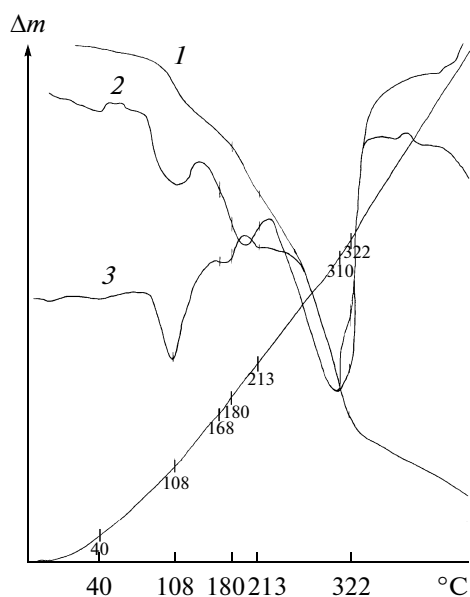


Рис. 6. Кривые дериватогаммы микробного меланина: 1 – изменение веса; 2 – дифференциально-термическое изменение веса; 3 – дифференциально-термический анализ.

Указанные данные были подтверждены биологической активностью полученных препаратов.

Исследовано также влияние температуры на растворимость микробного меланина. Для этого аморфный темно-коричневый осадок меланина подвергали термообработке при 45, 80, 120, 200, 350 и 500°C в течение 2 ч. Затем полученные образцы меланина растворяли в воде при различных величинах pH раствора. Опыты показали, что образцы, подвергнутые термообработке при 45, 80 и 120°C, хорошо растворялись в воде. Образцы меланина, высушенные при 200°C, не растворялись в воде, но растворялись при кипячении в 1 н. растворе едкого натра. Что касается образцов, высушенных при 350 и 500°C, то они не растворялись ни в растворе щелочи, ни в кислоте.

Анализируя полученные результаты, можно сделать следующее заключение. Аморфный осадок меланина устойчив при 120°C. При повышении температуры среды (до 200°C), по-видимому, началась деградация меланина, что приводило к частичному нарушению его структуры. В результате этого меланин терял способность растворяться в воде. При кипячении в щелочной среде меланин, по-видимому, восстанавливал первоначальную структуру и растворялся в воде. При температуре выше 350°C меланин подвергался разрушению и поэтому терял способность растворяться как в щелочной, так и кислой среде.

Молекулярная масса полученного микробного меланина составляла около 4 кДа [16].

Исследования показали, что в выделенных образцах меланина содержится примерно 25% белка [13]. Установлено, что в гидролизате доля кислых, нейтральных, ароматических и основных аминокислот была 44.0; 11.5; 37.3 и 7.3% соответственно. Это хорошо коррелирует как с данными экспериментов по изучению изоэлектрической точки ($pI = 3.0-3.2$), так и с данными экспериментов по растворимости (малая растворимость в диапазоне pH 2.6–4.3) [16].

Наличие пептида, по-видимому, придает меланину гидрофильные свойства, что обеспечивает хорошую растворимость в воде [3, 13]. В отдельных экспериментах было показано, что содержащийся в препарате меланина пептид не отделялся от пигмента в процессе гель-фильтрации.

Определен элементный состав полученного меланина: С (44.96–45.02%), Н (5.04–5.14%) и N (11.57–11.65%), сера (0.61%).

Исходя из данных гель-хроматографии и элементного анализа, водорастворимый меланин из культуры *Bacillus thuringiensis* serovar *galleriae* K1 имеет следующую эмпирическую формулу: $C_{185}H_{257}O_{62}N_{40}S$.

Препараты меланина были успешно использованы в сельском хозяйстве в качестве биостимулятора роста растений [26] и в медико-биологических исследованиях [27].

Работа выполнена при поддержке научного гранта А.Н.С.Е.Ф. (NS-2077), основанного в Нью-Йорке, США.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Лях С.П. Микробный меланогенез и его функция. М.: Наука, 1981. 274 с.
2. Prota G. Melanins and Melanogenesis. N.-Y.: Acad. Press, 1992. 290 p.
3. Барцевская М.И., Васильева С.М. // Вопросы мед. химии. 1999. № 1. С. 3–15.
4. Патент США. 1993. № 5227459А.
5. Патент России. 1998. № 2116036С1.
6. Патент США. 1998. № 5814495.
7. Патент России. 2002. № 2186105 С2.
8. Патент России. 2006. № 2278163 С2.
9. Жеребин Ю.Л., Макан С.Ю. // Докл. АН УССР. Сер. Б. 1978. № 7. С. 46–50.
10. Nosanchuk J.D., Casadevall A. // Cellular Microbiol. 2003. V. 5. № 4. P. 203–223.
11. Кукулянская Т.А., Курченко Н.В., Курченко В. Л., Бабицкая В.И. // Прикл. биохимия и микробиология. 2002. Т. 40. № 1. С. 68–72.
12. Голоунин А.В., Селютин Г.Е. // Журн. прикл. химии. 1996. Т. 69. № 4. С. 645–648.
13. Патент Армении. 2003. № 1385 А2.
14. Славинская Г.В., Зеленева Л.А., Кузнецова Н.С. // Теория и практика сорбционных процессов. 1983. Вып. 16. С. 101–105.

15. Жданович Ю.В., Насонова Л.И. // Антибиотики и химиотерапия. 1997. № 12. С. 33–40.
16. Aghajanyan A., Hambardzumyan A., Hovsepyan A., Asaturian R., Vardanyan A., Saghiyan A. // *Pigment Cell Res.* 2005. V. 18. P. 130–135.
17. Агаджанян А. // Биотехнология. 2006. № 1. С. 36–42.
18. Nicolaus R.A. *Melanins*. Paris: Herman, 1968. 247 p.
19. Ozeki H., Ito S., Wakamatsu K., Thody A.J. // *Pigment Cell Res.* 1996. V. 9. P. 265–270.
20. Wakamatsu K., Ito S. // *Pigment Cell Res.* 2002. V. 15. P. 174–183.
21. Богатский А.В., Жеребин Ю.Л., Макан С. Ю. // Виноделие и Виноградарство СССР. 1979. № 3. С. 52–54.
22. Макардий Ф.В., Венгер Л.А., Слюсаренко Л.И., Бараба И.Н. // Изв. ВУЗ. Химия и химическая технология. 1996. № 4–6. С. 3–10.
23. Рубан Е.Л., Лях С.П. // Изв. АН СССР. Сер. биол. 1968. № 4. С. 530–541.
24. Наканиси К. Инфракрасные спектроскопия и строение органических соединений. М.: Мир, 1965. 216 с.
25. Simonovic B., Vucelic V., Hadzi-Povlovic A., Stepien K., Wilczok T., Vucelic D. // *J. Thermal Analysis.* 1990. V. 36. P. 2475–2482.
26. Popov Yu. G., Azaryan K.G., Petrosyan M.T., Agadjanyan J.A., Sherbakova E.N. // *Rev. Cytol. Biol. Vegetales.* 2005. V. 28. P. 252–259.
27. Sarkisyan J.S., Galoyan A.A., Kamalyan R.G., Charushyan V.A., Meliksetyan I.B., Pogosyan M.V., Hovsepyan A.S. Avakyan Z.F. // *Neurochem. J.* 2007. V.1. № 3. P. 227–234.

Obtaining of Water Soluble Microbial Melanin and Study of Its Some Properties

A. E. Aghajanyan, R. A. Asaturian, A. A. Hambardzumyan, L. B. Sargsyan,
A. S. Hovsepyan, A. H. Vardanyan, and A. S. Saghiyan

SPC "Armbiotechnology" NAS RA 14 Gyurjyan Str., Yerevan, 0056, Armenia

e-mail: aghajanyanarmen@yahoo.com

Received January 12, 2011

Abstract—The effective sorption method for melanin isolation and purification from fermentation solutions of *Bacillus thuringiensis* serovar *galleriae* K1 has been elaborated, the principle process flowsheet is presented. The identification of obtained pigment with the samples of natural and synthetic melanin was done by IR-spectroscopy, and the intensity ratio of optical absorption at 650 and 500 nm allows to refer the isolated melanin to eumelanin class. By thermal treatment it was determined, that melanin's amorphous sediment is steady at up to 120°C temperatures, at that the concentration of paramagnetic centers is changed from 0.053×10^{18} spin/g (48°C) to 0.25×10^{18} spin/g (120°C). The rising of the temperature of treatment up to 210°C brings to substantial increase of the concentration of unpaired electrons, and at 280°C its sharp growth is observed. At 350°C growth stops, then sharp decrease is observed. The obtained results were confirmed by methods of IR spectroscopy and derivatographic analysis.