

УДК 573.6.086.83;663.1

В.П.Курченко, в.н.с.;
 В.В.Сенчук, доцент;
 Т.А.Кукулянская, аспирант;
 Д.А.Новиков, аспирант;
 В.Н.Леонтьев, доцент;
 О.И.Борисик, студентка

СТРУКТУРА И ФУНКЦИИ ПРИРОДНЫХ МЕЛАНИНОВЫХ ПИГМЕНТОВ

Melanines from macro- and micromycetes, black tea and grapes were isolated and purified. The comparative investigation of physico-chemical properties of this pigments has done. It was found that antioxidant activity of fungous melanines as inhibitors peroxydase oxidation of aminobiphenils correlates with the concentration of paramagnetic centers in pigments.

Термин "меланины" применяют для описания нерастворимых или малорастворимых гетерополимерных пигментов с высокой молекулярной массой. Меланины делят на три основные группы: эумеланины, феомеланины и алломеланины.

Эумеланины представляют собой черные азотсодержащие гетерополимеры, синтезируемые животными, грибами и некоторыми растениями. Эумеланины могут образовываться в результате повреждения клубней картофеля, кожуры бананов. В результате технологического процесса получения черного чая в ходе скручивания и ферментации чайного листа также идет процесс окисления катехинов, аминокислот, спиртов до хинонов, способных к полимеризации и образованию высокомолекулярных окрашенных биополимеров, экстрагируемых из чая щелочными растворами. Пигменты, сходные с эумеланинами, образуются из дигидроксифенилаланина (ДОФА) под действием растительных и грибных ферментов (пероксидаз, полифенолоксидаз, тирозиназы и др.). Считается, что эумеланины представляют собой линейные биополимеры индолил-5,6-хинона с включениями пиррольных и ДОФА-хиноновых фрагментов. В эумеланинах присутствует небольшое количество свободных радикалов, возможно, полухиноновой природы, определяемых с помощью ЭПР. В условиях *in vitro* эумеланины способны связывать тяжелые металлы, некоторые ароматические органические вещества, белки и ферменты. Будучи чрезвычайно инертными и стабильными, они вместе с тем могут обесцвечиваться перекисью водорода. Эумеланины поглощают свет в УФ и во всем видимом диапазоне, что является следствием высокосопряженной системы.

Феомеланины имеют желтую, красную и коричневую окраску и также, как и эумеланины, содержат азот. Они определяют окраску перьев

птиц, рыжих волос, веснушек и т.д. Красные феомеланины, известные как галофеомеланины, представляют собой сложные серусодержащие гетерополимеры, образованные из дофахинона и цистеина. Феомеланины лучше растворяются в щелочных растворах, но также, как и эумеланины, нерастворимы в органических и других растворителях, химически стабильны, содержат свободные радикалы и способны связывать металлы и ароматические вещества.

Алломеланины являются продуктами биосинтеза высших растений и грибов. Характерной особенностью алломеланинов является то, что они содержат мало или вообще не содержат азота. Многие из них представляют собой полимеры простых фенолов, таких, как пирокатехин, и их хинонов. Они также нерастворимы в органических растворителях и химически стабильны; поглощают свет во всем видимом диапазоне, однако иногда наблюдается максимум поглощения при ~ 450 нм.

Биосинтез всех групп меланинов характеризуется двумя общими особенностями: 1) начальные стадии включают ферментативное окисление фенолов или полифенольных предшественников с образованием хинонов, и 2) высокореакционноспособные хиноны подвергаются полимеризации, приводящей к образованию окрашенных меланиновых макромолекул. Эти два процесса приводят к образованию огромного числа продуктов, которые могут выглядеть сходными, но иметь совершенно разные структуры [1,2,3].

Функции меланинов связывают с их антиоксидантными, фото- и радиопротекторными свойствами. Эти качества меланиновых пигментов обусловлены присутствием большого количества стабильных парамагнитных центров (ПМЦ), которые обеспечивают большую электронно-абсорбционную емкость и позволяют им дезактивировать природные радикалы, образующиеся в ряде химических и физических процессов. В связи с этим меланины являются перспективными объектами исследования для фармацевтики и косметики [2,3].

Целью нашей работы являлось выделение меланина из ряда грибов (макро- и микромицетов) и растений; сравнительное исследование их физико-химических свойств и биологической активности.

Полученные пигментные препараты из макромицетов *Phellinus gobustus*, *Inonotus obliquus*, микромицетов *Cladosporium cladosporoides*, *Aspergillus carbonarius*, *Rass. variotii* и черного чая были очищены методом гель-фильтрации, лиофильно высушены и исследованы с целью их идентификации и отнесению к группе меланиновых пигментов. Лиофильно высушенные исследуемые пигменты представляют собой темно-коричневый порошок, они нерастворимы в воде и органических растворителях, но рас-

творяются в щелочных растворах и обладают свойствами, присущими всем природным меланиновым пигментам [2,3].

Исходные 0,1%-ные растворы пигментных препаратов в 0,1 М NaOH окислялись KMnO_4 и H_2O_2 . При добавлении незначительных количеств FeCl_3 меланины выпадали из щелочных растворов в осадок.

Спектры поглощения меланинов в видимой области спектра в диапазоне 400-600 нм имеют сходную для всех исследуемых образцов форму наклонных линий, характерных для изученных меланинов [1]. Значения тангенсов углов наклона спектров являются величинами, характерными для конкретных меланинов (табл.1). Однако наклон линий может варьировать при изменении степени окисленности пигментов [2, 3].

Для темноокрашенных меланиновых пигментов характерна высокая интенсивность светопоглощения. Коэффициенты экстинкции 0,001%-ных растворов пигментов в 0,5 н NaOH при 465 нм приведены в табл. По мнению многих авторов [2], темная окраска пигментов обусловлена наличием кислородосодержащих групп, а окисление OH-групп до карбоксильных увеличивает интенсивность окраски за счет появления двойной $\text{C}=\text{O}$ связи и увеличения цепи сопряжения. Это заключение объясняет наличие корреляции между коэффициентами экстинкции и содержанием COOH-групп у грибных меланиновых пигментов (табл.). Меланин с наиболее высоким содержанием COOH-групп характеризуется большей величиной коэффициента экстинкции.

Важной идентификационной спектральной характеристикой меланиновых пигментов являются ИК-спектры поглощения. В ИК-спектрах исследуемых нами меланиновых пигментов имеется ряд полос, характерных для меланинов. Широкие полосы в области $3300\text{-}3000\text{ см}^{-1}$, присутствующие в ИК-спектрах всех образцов, и их сложный характер свидетельствуют о наличии OH-групп, связанных водородными связями, а также =N-H-групп, имеющих валентные колебания при $3500\text{-}3300\text{ см}^{-1}$ в виде широкой полосы. Наиболее интенсивная полоса во всех спектрах в области $1710\text{-}1580\text{ см}^{-1}$ является характерной и принадлежит валентным колебаниям $\text{C}=\text{O}$ группы. Наличие в спектрах широких полос не позволяет получить более подробную информацию, однако они свидетельствуют о наличии кетонных, альдегидных карбониллов, а также карбониллов карбоксильных групп.

Основной отличительной особенностью меланизированных структур является интенсивное парамагнитное поглощение в районе g-фактора свободного электрона. Нами на спектрах ЭПР меланинов зафиксированы сигналы без сверхтонкой структуры с величиной g-фактора, отличающейся не только от значения 2,0023, но и меняющейся в зависимости от процента меланинового пигмента. В таблице приведены значения концен-

траций ПМЦ в изученных меланинах. Для меланина *Cl.cladosporoides* помимо центрального относительно узкого сигнала с $g = 2,0061$ выявлено наличие дополнительной широкой линии с низкой интенсивностью и $g = 2,0095$.

Табл. Характеристика меланиновых пигментов грибного и растительного происхождения

Источник меланина	$E^{0,001\%}$ 465 нм	tg угла наклона спектра поглощения (400-600 нм)	Содержание СО-ОН-групп (%)	Концентрация ПМЦ (спин/г)	Элементный состав (%) N C H	М.м. (кДа)
<i>I.obliquus</i>	0,020	0,0025	0,93	$2,93 \cdot 10^{18}$	6,8 38,2 5,54	44-56
<i>Ph.robustus</i>	0,014	0,0024	0,1	$2,30 \cdot 10^{17}$	5,07 37,05 5,05	52-60
<i>Cl.cladosporoides</i>	0,031	0,0025	1,18	$1,12 \cdot 10^{17}$	4,36 32,87 4,37	48-56
<i>Asp.carbonarius</i>	0,085	0,0021	1,6			44-54
Расс. <i>varioti</i>	0,030	0,002	0,53			42-54
<i>Thea sinensis</i> (чай)	0,033	0,0029	4,07	$3,80 \cdot 10^{19}$	4,8 50,0 5,89	46-58
(виноград)	0,028	0,002	0,80			

Поскольку устойчивость темноокрашенных грибов к неблагоприятным физическим воздействиям связывается с наличием у них меланиновых пигментов, нами было изучено влияние УФ-облучения и повышенной температуры на парамагнитные свойства грибных меланиновых пигментов.

Облучение меланина УФ-светом вызывает обратимое увеличение сигналов ЭПР в 1,5 раза для пигментного препарата *Ph.robustus*. Для всех образцов характерно насыщение интенсивности сигнала в течение 30 минут облучения. Увеличение интенсивности в 1,5 раза через 10 минут регистрировали для пигмента *Ph.robustus*. Значительное изменение g -факторов обоих сигналов после 30 минут УФ-облучения было выявлено у меланина из *Cl.cladosporoides*.

Нагревание меланиновых пигментов до 150°C приводило к росту интенсивности сигнала и увеличению концентрации парамагнитных центров в 2,2 раза только в меланиновом пигменте, выделенном из *Cl.cladosporoides*. Для меланина *I.obliquus* эти показатели снижались в 2

раза, а для пигмента *Ph.lobustus* оставались неизменными. Влияние температуры на парамагнитные свойства меланинов становились заметными при нагревании выше 90⁰С. В отличие от влияния УФ-облучения на величину g-фактора меланинового пигмента *Cl.cladosporoides* повышенная температура не оказывала такого действия.

В нашей работе были исследованы антиоксидантные свойства меланиновых пигментов грибного происхождения в реакции пероксидазного окисления аминобифенилов, являющейся радикальным процессом. В качестве окисляемых субстратов были использованы бензидин (БД) и его метильные производные 3,3'-диметилбензидин (ДМБД) и 3,3',5,5'-тетраметилбензидин (ТМБД). Эти соединения являются канцерогенами непрямого действия, т.е. для превращения их в высокореакционные метаболиты требуется метаболическая активация. В результате пероксидазного окисления аминобифенилов образуются электрофильные продукты, которые могут взаимодействовать с нуклеофильными группами ДНК и белков.

Ингибирование изучаемыми нами меланиновыми пигментами процесса пероксидазного окисления бензидина и его метильных производных происходит с различной эффективностью. Для всех меланинов наблюдается снижение эффективности ингибирования процесса пероксидазного окисления аминобифенилов в ряду БД - ДМБД - ТМБД, т.е. с увеличением числа метильных заместителей.

Электрофильные продукты, образующиеся в процессе метаболической активации аминобифенилов, способны взаимодействовать с нуклеофильными группами биополимеров, в частности ДНК, приводя к образованию межмолекулярных сшивок ДНК-ДНК. Влияние меланиновых пигментов на этот процесс исследовалось нами в системе пероксидазного окисления о-дианизидина (о-ДА, 3,3'-диметоксибензидина). Концентрации пигментов, уменьшающие число перекрестных сшивок ДНК-ДНК в 2 раза, составляют 2-10 мкг/мл, а в концентрации 15-25 мкг/мл - полностью предотвращают повреждение ДНК.

Меланин *Ph.ignogius* более эффективно ингибирует собственно процесс пероксидазного окисления о-ДА, чем повреждение ДНК продуктами окисления. Меланиновый пигмент *Inonotus* sp., напротив, в меньшей концентрации ингибирует образование сшивок ДНК-ДНК, чем окисление о-ДА. Такое различие в поведении пигментов может быть связано с механизмом их ингибирующего действия.

Возможно несколько путей ингибирования меланинами процесса пероксидазного окисления аминобифенилов: меланин может взаимодействовать с перекисью водорода, разлагая ее, или связываться с ферментом, инактивируя его. Меланиновые пигменты могут также взаимодействовать с промежуточными радикальными продуктами окисления аминобифени-

лов, препятствуя их превращению в конечные продукты реакции - диимины.

Было установлено, что H_2O_2 не взаимодействует с меланином в концентрациях, используемых в реакции.

Наиболее вероятным механизмом ингибирующего действия меланинов является взаимодействие пигментов с промежуточными радикальными продуктами окисления аминобифенилов. Такая активность, по мнению ряда авторов [2,3], обусловлена высокими спиновыми состояниями меланиновых пигментов. Концентрация ПМЦ в меланине *Inopodus sp.*, например, в 10 раз больше, чем в *Ph.ignozius*. Активность меланина *Inopodus sp.* как ингибитора процесса пероксидазного окисления аминобифенилов также выше, чем *Ph.ignozius*.

Таким образом, нами были выделены и очищены меланины из макро- и микромицетов, черного чая и винограда и проведено сравнительное изучение физико-химических, антиоксидантных свойств этих пигментов. Показана корреляция активности грибных меланинов, как ингибиторов пероксидазного окисления аминобифенилов, с концентрацией парамагнитных центров в пигментах.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бриттон Г. Биохимия природных пигментов. - М.: Мир, 1986.
2. Жданова Н.Н., Василевская А.И. Меланинсодержащие грибы в экстремальных условиях. - Киев : Наук. думка, 1988.
3. Лях С.П. Микробный меланиногенез и его функции. - М.: Наука, 1981.

УДК 676.15

А.А. Губарев, аспирант;
М.Н. Копылович, ассистент;
Г.М. Горский, профессор;
А.К. Баев, профессор

ВЛИЯНИЕ PH И КОНЦЕНТРАЦИИ ИОНОВ АЛЮМИНИЯ НА РАЗЛИЧНЫЕ ВИДЫ КАНИФОЛЬНОГО КЛЕЯ

The influence of pH-value and concentration of aluminium ions on various kinds of glue was studied.

Для придания бумаге гидрофобных свойств, таких, как водостойкость, повышенная сомкнутость листа, механическая прочность в сухом и влажном состояниях, применяют проклеивающие вещества [1]. Наиболее распространены клеи на основе канифоли, которые находят применение для проклейки практически всего ассортимента бумаги и картона.