

УДК 582.29:577.117:543.054

## ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ И АНТИОКСИДАНТНЫЕ СВОЙСТВА МЕЛАНИНОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ЛИШАЙНИКА *LEPTOGIUM FURFURACEUM* (HARM.)\*

© В.Р. Хабибрахманова<sup>1\*\*</sup>, А.Е. Рассабина<sup>2</sup>, А.Ф. Хайруллина<sup>2</sup>, Ф.В. Минибаева<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Казанский национальный исследовательский технологический университет, ул. К. Маркса, 68, Казань, 420015 (Россия), e-mail: venha@rambler.ru

<sup>2</sup> Казанский институт биохимии и биофизики, ФИЦ КазНЦ РАН, ул. Лобачевского, 2/31, Казань, 420111 (Россия)

Меланины – универсальные биополимеры, основной биологической функцией которых является защита живых организмов от неблагоприятных воздействий. Интерес к этим темным пигментам обусловлен перспективами их использования в медицине, косметологии, биоремедиации, биоэлектронике и других областях. В настоящей работе по разработанной комплексной схеме выделены меланины из лишайника *Leptogium furfuraceum* (Harm.), являющегося симбиотическим организмом-экстремофилом. Подбор условий экстрагирования меланина, его последующего осаждения и очистки позволили выделить три образца меланина с суммарным выходом 7.5% от сухих веществ лишайника. Установлено, что все выделенные меланины имеют полиароматическую структуру, в них присутствуют углеводы и белки, содержание которых в зависимости от условий выделения меланинов составляет 7.3–9.9% и 13.5–32.7% соответственно. Среди выделенных меланинов наибольшей антиоксидантной активностью обладает меланин, представляющий собой водорастворимую фракцию кислотоосаждаемого меланина, который в отличие от других меланинов практически полностью растворяется в дистиллированной воде, 95% этаноле, 99% диметилсульфоксиде и фосфатном буфере (pH 7.4). Выявленные отличия выделенных меланинов лишайника по растворимости, антиоксидантной активности и хелатирующей способности позволяют определить потенциальные области для их практического использования.

*Ключевые слова:* лишайник, меланин, ИК-спектроскопия, антиоксидантная активность, хелатирующая способность.

*Исследование проводилось в рамках выполнения государственного задания ФИЦ КазНЦ РАН, а также при финансовой поддержке гранта РФФИ «Аспиранты» (№ 20-34-90044, антиоксидантные свойства) и гранта РНФ (№ 18-14-00198, спектральный анализ).*

### Введение

Меланины – это высокомолекулярные темные пигменты, основной биологической функцией которых является защита живых организмов от неблагоприятных воздействий, опосредованная их антиоксидантным и фотопротекторным действием. Меланины считаются древнейшими универсальными биополимерами, возникшими в период предбиологических систем [1], однако, несмотря на это, они являются менее

---

Хабибрахманова Венера Равильевна – кандидат химических наук, старший научный сотрудник, e-mail: venha@rambler.ru

Рассабина Анна Евгеньевна – младший научный сотрудник, e-mail: AERassabina@yandex.ru

Хайруллина Айсылу Фаридовна – студент, e-mail: a16280110@gmail.com

Минибаева Фарид Вилевна – главный научный сотрудник, заведующий лабораторией, e-mail: minibayeva@kibb.knc.ru

изученными по сравнению с такими биополимерами, как белки и полисахариды. Это обусловлено сложным химическим составом меланинов – их мономерными звеньями могут быть различные соединения фенол-хиноидной и/или индольной природы, прочные углерод-углеродные связи между ними затрудняют их идентификацию. Кроме того, в состав меланинов могут входить белки, полисахариды, липиды и др. [2].

---

\* Данная статья имеет электронный дополнительный материал (приложение), который доступен читателям на сайте журнала. DOI: 10.14258/jcprtm.20220411774s

\*\* Автор, с которым следует вести переписку.

В настоящее время интерес к меланинам значительно возрос, что обусловлено перспективами их использования в медицине, косметологии, биоремедиации, биоэлектронике и других областях [2–6]. Наиболее распространенными источниками получения меланинов для практического использования являются высшие грибы, микроорганизмы и растения [4, 5, 7]. Для расширения потенциальных областей применения меланинов актуальным является их выделение из организмов-экстремофилов, в том числе лишайников. Лишайники – одни из древнейших симбиотических организмов на Земле, которые в ходе эволюции выработали эффективные механизмы стрессовой устойчивости, в частности, за счет биосинтеза различных вторичных метаболитов – уникальных лишайниковых веществ и липидов [8, 9]. Наряду с этими соединениями важный вклад в экстремофильность лишайников вносят меланины. Согласно современным исследованиям, лишайники могут меланизироваться при абиотических стрессах, например, при UV-B облучении [10, 11]. Можно предположить, что симбиотические взаимоотношения в лишайнике между грибом (микобионтом) и водорослью/цианобактериями (фотобионтом) оказывают влияние на биосинтез меланина, обуславливая его отличительные физико-химические характеристики и биологическую активность. Состав, свойства и биологическая активность меланинов лишайников исследованы крайне недостаточно.

В настоящей работе объектом для выделения меланинов был выбран студенистый лишайник *Leptogium furfuraceum* (Harm.), симбионтами которого являются аскомицет *Leptogium* и цианобактерия *Nostoc*. Лишайник имеет выраженную темную пигментацию, однако он не содержит большинства типичных лишайниковых веществ [12], в связи с чем синтез меланина в нем приобретает большую значимость при действии неблагоприятных факторов среды.

Выделение меланинов из различных природных источников осуществляется путем их экстрагирования с применением растворов щелочей, главным образом, гидроксида натрия (NaOH). При этом условия экстрагирования (соотношение образец: экстрагент, концентрация экстрагента, время процесса, температура) могут существенно различаться [2, 13]. Надо отметить, что растворы щелочей не являются селективными для извлечения меланинов, в них также хорошо растворяются щелочерастворимые полисахариды (хитин, глюканы), белки, фенольные соединения различных классов. Как правило, осаждение меланинов из полученных щелочных экстрактов проводят путем их подкисления соляной кислотой (HCl) до pH 1–2 [2, 13]. Кроме того, осаждение меланинов из щелочных экстрактов может осуществляться с использованием органических растворителей (этанола и ацетона) [14, 15]. Можно предположить, что использование различных осаждающих агентов позволяет получить меланины, отличающиеся по содержанию в них сопутствующих соединений – белков, полисахаридов, липидов, зольных элементов, вследствие чего они могут иметь разные физико-химические свойства и биологическую активность. Например, в работе [16] было установлено, что добавление 1% этанольного раствора гидроксида калия к фильтрату, полученному после кислотного осаждения меланина из водного извлечения гриба *Inonotus obliquus* (чага), позволяет дополнительно получить меланин в количестве 5% от сырья. Отличительной характеристикой выделенного меланина являлась более высокая антиоксидантная активность, которая в 4 раза превышала таковую у меланина, осажденного HCl. Таким образом, при выделении меланинов с целью исследования их химической структуры и свойств необходимо применять комплексный подход, заключающийся в подборе условий экстрагирования и осаждения этих пигментов. При этом основными критериями эффективности применяемого подхода должны быть высокая биологическая активность и заданные функциональные свойства получаемых меланинов.

Цель настоящей работы – разработка комплексной схемы выделения меланинов из лишайника *L. furfuraceum* и исследование их физико-химических характеристик и антиоксидантных свойств. Полученная информация позволит выявить потенциальные области применения меланинов из организмов-экстремофилов.

### Экспериментальная часть

**Характеристика сырья.** В работе использовали лишайник *L. furfuraceum*, собранный с коры ветвей вечнозеленого кустарника *Leucosidea sericea*, в редколесье Fort Nottingham провинции КваЗулу-Натал, ЮАР (29.414° S, 29.913° E) в 2021 г. Этот вид лишайника относится к лишайникам рода *Leptogium*, семейства *Collemataceae*, класс *Lecanoromycetes*, порядок *Peltigerales*. Собранные образцы лишайника были идентифицированы до вида профессором ботаники Ричардом Бекетт, Университет КваЗулу-Натал, ЮАР. После предварительной очистки талломы лишайника высушивали при комнатной температуре в течение 2 сут, а затем хранили в индивидуальных контейнерах при минус 20 °С. Перед проведением экспериментов лишайник измельчали растиранием в фарфоровой ступке с добавлением жидкого азота.

*Комплексная схема выделения меланинов.* Порошок лишайника (5 г) заливали 50 мл 2 М NaOH, тщательно перемешивали и настаивали в течение 24 ч при комнатной температуре. После инкубации смесь центрифугировали (HermleZ 36HK, Германия) в течение 10 мин при 15000 g, полученный щелочной экстракт сливали в сухую чистую колбу. К шроту лишайника добавляли 50 мл 2 М NaOH, тщательно перемешивали и нагревали в течение 2 ч на кипящей водяной бане с обратным холодильником. Затем смесь центрифугировали в течение 10 мин при 15000 g, полученный щелочной экстракт сливали в сухую чистую колбу.

К щелочным экстрактам лишайника добавляли 5 М HCl до pH 1–2, тщательно перемешивали и выдерживали 12 ч для формирования осадка. Образование осадка наблюдалось только в щелочном экстракте лишайника, полученном при настаивании, его отделяли центрифугированием в течение 10 мин при 15000 g и далее обрабатывали последовательно дистиллированной водой, хлороформом, этилацетатом и ацетоном (2 раза по 10 мл соответствующего растворителя). После высушивания при температуре  $40 \pm 2$  °C выделенный меланин ( $M_{\text{HCl}}$ ) использовали для анализа. Водный раствор, полученный в результате обработки осадка, высушивали при температуре  $40 \pm 2$  °C, выделенный меланин ( $M_{\text{HClw}}$ ) использовали для анализа. Супернатанты после центрифугирования подкисленных щелочных экстрактов лишайника объединяли и добавляли 70% этанол в соотношении 1 : 2 (v/v). Смесь выдерживали в течение 12 ч для формирования осадка. Выпавший осадок отделяли центрифугированием в течение 10 мин при 15000 g, далее обрабатывали 70% этанолом (2 раза по 10 мл) и высушивали при температуре  $40 \pm 2$  °C, выделенный меланин ( $M_{\text{EtOH}}$ ) использовали для анализа. Выход  $M_{\text{HCl}}$ ,  $M_{\text{HClw}}$ ,  $M_{\text{EtOH}}$  определяли гравиметрическим методом [17].

*Приготовление растворов меланинов.* Для проведения экспериментов готовили растворы меланинов с концентрацией 0.4 и 1.0 мг/мл в дистиллированной воде с добавлением 10%  $\text{NH}_4\text{OH}$  до pH 7.0.

*Проведение качественных реакций с выделенными меланинами* [18]. К растворам меланинов добавляли в соотношении 1 : 1 (v/v): 10%  $\text{H}_2\text{O}_2$ , при положительной реакции должно наблюдаться обесцвечивание раствора; 0.5 М  $\text{KMnO}_4$ , при положительной реакции раствор должен изменить окраску с коричневой на зеленую с последующим выпадением осадка и обесцвечиванием раствора; 1%  $\text{FeCl}_3$ , при положительной реакции должно происходить выпадение осадка, который при дополнительном добавлении 3–5 объемов раствора соли будет растворяться.

*Элементный состав меланинов.* Определение C, H и N в образцах меланинов проводили на анализаторе Vario EL cube (Elementar Analysensysteme, Германия). По полученным данным рассчитывали содержание O в образцах.

*Адсорбционная спектроскопия.* Электронные спектры растворов меланинов (0.4 мг/мл) регистрировали на спектрофотометре UV-1900 (Shimadzu, Япония) в интервале  $\lambda=200\text{--}700$  нм.

*ИК-спектроскопия.* ИК-спектры образцов меланинов снимали на приборе IRS-113 (Bruker, Германия) в рабочем диапазоне  $4000\text{--}700$   $\text{cm}^{-1}$  в таблетках KBr.

*Количественное определение углеводов и белков.* С использованием спектрофотометрии в растворах меланинов (0.4 мг/мл) определяли количество углеводов антроновым методом в пересчете на глюкозу (Sigma-Aldrich, США) [19] и белков методом Флореса в пересчете на альбумин (Sigma-Aldrich, США) [20].

*Определение растворимости меланинов* [18, 21]. К образцам меланинов прибавляли определенное количество растворителя (дистиллированной воды, 95% этанола, 99% диметилсульфоксида, 0.5 М натрий-фосфатного буфера pH 7.4), перемешивали и проводили ультразвуковую (УЗ) обработку (УЗ-ванна «Сапфир», Россия) при 35 кГц и температуре 25 °C в течение 10 мин. Затем растворы перемешивали на шейкере OS-20 (Biosan, Латвия), 100 об./мин, 1 ч. Далее растворы фильтровали с использованием насадок «Chromafil Xtra CA-45/13» (Macherey-Nagel, Германия), оптическую плотность полученных фильтратов измеряли при  $\lambda=490$  нм.

*Определение антиоксидантной активности меланинов фосфорно-молибденовым методом* [22]. К 2 мл растворов меланинов (0.1–0.4 мг/мл) добавляли 2 мл фосфорномолибденового реактива (0.6 М  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , 28 мМ  $\text{Na}_3\text{PO}_4$  и 4 мМ  $(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4$ ). Пробирки с растворами инкубировали при 95 °C в течение 90 мин. После охлаждения растворов проводили измерение их оптической плотности при  $\lambda=695$  нм. Контрольный раствор готовили аналогичным образом, используя вместо растворов меланинов дистиллированную воду. Антиоксидантную активность меланинов выражали в мг аскорбиновой кислоты (эквивалент аскорбиновой кислоты) в г меланина, используя калибровочный график по аскорбиновой кислоте ( $y=4.8485x$ ;  $R^2=0.99$ ).

*Определение хелатирующей способности меланинов по отношению к ионам  $\text{Fe}^{2+}$*  [22]. К 1 мл растворов меланинов (0.1–1.5 мг/мл) добавляли 3.7 мл дистиллированной воды, 0.1 мл 2 мМ  $\text{FeCl}_2$  и 0.2 мл 5 мМ

водного раствора феррозина. Пробирки с растворами инкубировали при 25 °С в течение 10 мин, затем определяли оптическую плотность (ОД) при  $\lambda=562$  нм. Контрольный раствор готовили аналогичным образом, используя вместо растворов меланинов дистиллированную воду. Хелатирующую способность (%) меланинов по отношению к ионам  $\text{Fe}^{2+}$  рассчитывали по формуле:  $((\text{ОД}_{\text{конт.р-р}} - \text{ОД}_{\text{опыт.р-р}}) / \text{ОД}_{\text{конт.р-р}}) * 100$ , и по полученным данным (табл. в электронном приложении) определяли концентрацию меланинов ( $\text{IC}_{50}$ ), при которой связывается 50% ионов  $\text{Fe}^{2+}$  от общего их содержания в реакционной смеси.

*Статистическая обработка экспериментальных данных.* Экспериментальные данные были получены в трех-девяти повторностях, статистическая обработка данных проводилась с использованием пакета программ MS Excel. Оценка достоверности результатов проводилась с использованием *t*-критерия Стьюдента. Различие считали достоверным при вероятности 95% ( $p \leq 0.05$ ).

Часть экспериментальных данных получены с использованием оборудования Распределенного коллективного спектро-аналитического Центра изучения строения, состава и свойств веществ и материалов ФИЦ КазНЦ РАН.

### Обсуждение результатов

В работе осуществлена разработка комплексной схемы выделения меланинов из лишайника *L. furfuraceum* (рис. 1). Ее основой является стандартная методика выделения меланинов, включающая стадии: щелочное экстрагирование сырья; осаждение меланина из полученного экстракта добавлением HCl; очистка меланина от соосажденных с ним компонентов обработкой дистиллированной водой и органическими растворителями; высушивание [13]. Применение этой методики позволило выделить из лишайника *L. furfuraceum* меланин ( $M_{\text{HCl}}$ ) с выходом  $3.16 \pm 0.01\%$  от сухих веществ лишайника. Анализ продуктов, получаемых при выделении  $M_{\text{HCl}}$  из лишайника, позволил обосновать и разработать способы выделения еще двух меланинов  $M_{\text{HClw}}$  и  $M_{\text{EtOH}}$ .

Темно-коричневая окраска водного раствора, получаемого при обработке дистиллированной водой осадка меланина, выпавшего при добавлении HCl, указывала на то, что его часть способна переходить в воду с образованием устойчивой коллоидной системы (рис. 1). Установлено, что выход  $M_{\text{HClw}}$ , представляющего собой водорастворимую фракцию кислотоосаждаемого меланина, составил  $1.01 \pm 0.02\%$  от сухих веществ лишайника. Таким образом, по разработанной нами комплексной схеме суммарный выход меланинов, извлеченных из лишайника *L. furfuraceum* настаиванием с 2 М NaOH, увеличивается почти на 33% по сравнению со стандартной методикой.

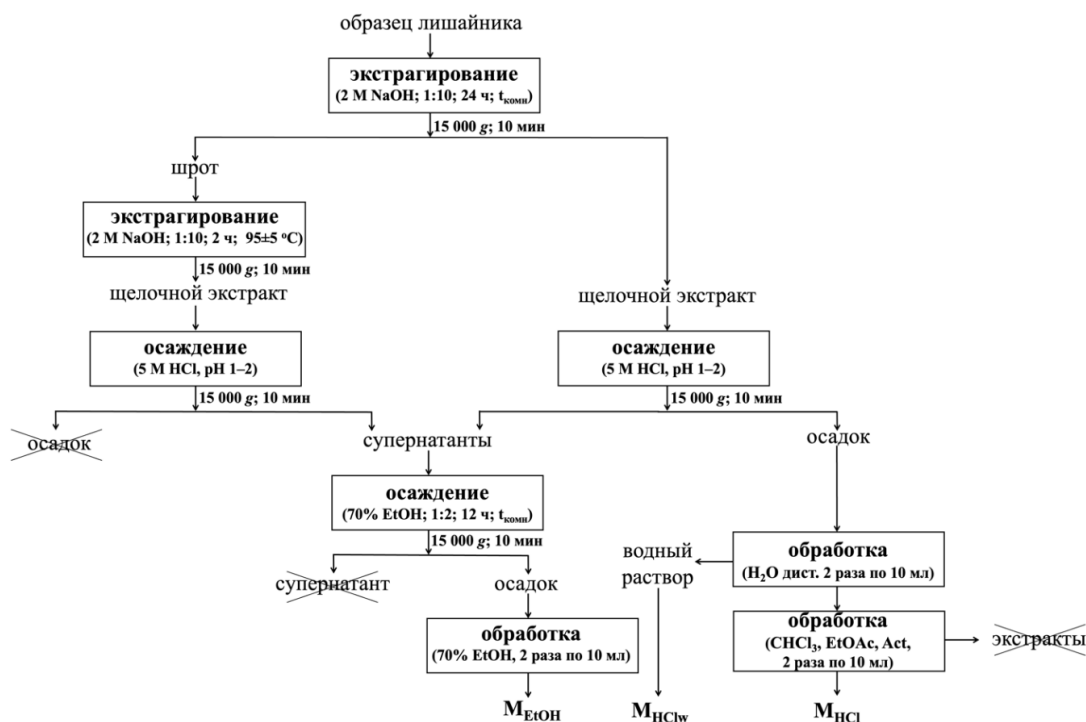


Рис. 1. Комплексная схема выделения меланинов из лишайника *L. furfuraceum*

Шрот лишайника после щелочного экстрагирования настаиванием имел интенсивный темно-коричневый цвет, что косвенно свидетельствует о неполном извлечении пигмента из сырья. В связи с этим шрот повторно экстрагировали 2 М NaOH в более жестких условиях – кипячением в течение 2 ч (рис. 1). Высокотемпературный нагрев, как предполагалось, будет интенсифицировать гидролиз связей между меланином и структурными компонентами таллома лишайника, что обеспечит увеличение его выхода. Полученный щелочной экстракт имел интенсивную темно-коричневую окраску, что позволяло сделать вывод о высоком содержании в нем меланина. Однако при подкислении щелочного экстракта HCl выпадение осадка меланина не наблюдалось. Можно предположить, что меланин, извлеченный при кипячении шрота, связан с щелочерастворимыми полисахаридами и белками, и наличие этих сопутствующих соединений препятствует его осаждению при добавлении HCl. Для подтверждения данного предположения в качестве другого осаждающего агента был применен этанол, часто используемый при выделении из растворов полисахаридов [19]. Супернатанты, полученные после центрифугирования подкисленных щелочных экстрактов (рис. 1), объединили и добавили 70% этанол в соотношении 1 : 2 (v/v). В результате наблюдали выпадение обильного осадка светло-коричневого цвета. Выход полученного осадка, обозначенного как  $M_{EtOH}$ , был равен  $3.33 \pm 0.04\%$  от сухих веществ лишайника, что сопоставимо с выходом  $M_{HCl}$ , выделенного по стандартной методике (рис. 1). Таким образом, суммарный выход меланинов, выделенных из лишайника *L. furfuraceum* по разработанной нами комплексной схеме, составил 7.5%, что в 2.4 раза больше по сравнению со стандартной методикой.

Все выделенные образцы меланинов дали положительные качественные реакции с  $H_2O_2$ ,  $KMnO_4$  и  $FeCl_3$ , что подтверждает их отнесение к меланинам. При этом можно полагать, что отличия в условиях получения меланинов будут определять их различия по химическому составу, структурной организации и биологической активности.

На следующем этапе работы нами было проведено исследование физико-химических характеристик меланинов, выделенных из лишайника *L. furfuraceum*. Важной характеристикой меланинов является элементный состав, на основании которого может быть установлен их тип и структурные особенности. В таблице 1 приведены данные анализа элементного состава меланинов, выделенных из лишайника *L. furfuraceum*.

Определено, что все исследуемые меланины содержат незначительное количество азота, что характерно для алломеланинов, или дигидроксинафталин (DHN) – меланинов [2, 13, 18]. Такой тип меланина синтезируется в различных грибах по ацетатно-малонатному пути на основе простых фенольных соединений [5]. Известно, что в лишайниках, являющихся симбиотическими организмами, именно гриб осуществляет биосинтез различных вторичных метаболитов [9, 10]. Кроме того, нельзя исключать и наличие в талломе лишайника зумеланина, синтезируемого по шикиматному пути [5] на основе соединений, образующихся в результате азотфиксирующей активности цианобактерий – фотобионта лишайника *L. furfuraceum*. По соотношению Н/С все выделенные меланины являются высокоароматичными. В  $M_{HClw}$  и  $M_{EtOH}$ , в отличие от  $M_{HCl}$ , содержание углерода увеличивается на 4.4 масс.%, тогда как содержание кислорода уменьшается на 5.5 масс.%. Это указывает на снижение в их структуре количества кислородсодержащих функциональных групп, имеющих важное значение в проявлении меланинами биологической активности [2, 18].

Качественной характеристикой меланинов является электронный спектр поглощения [2, 13, 18]. На рисунке 2 приведены электронные спектры меланинов, выделенных из лишайника *L. furfuraceum*. Спектры имеют вид пологих кривых с постепенным уменьшением значений оптической плотности при увеличении длины волны, что характерно и для других меланинов различного происхождения [5, 13]. Стоит отметить заметную разницу в интенсивности абсорбции исследуемых меланинов в УФ-области. По сравнению с  $M_{HCl}$ , выделенным по стандартной методике, у  $M_{HClw}$  и  $M_{EtOH}$ , выделенных по разработанной нами комплексной схеме, оптическая плотность в интервале 230–400 нм примерно в 3 раза выше. Это указывает на наличие в их составе большего количества сопряженных структур. Кроме того, отличительной характеристикой спектров  $M_{HClw}$  и  $M_{EtOH}$  является наличие пика при длине волны 400 нм, причем у  $M_{EtOH}$  он более интенсивный (рис. 2). Очевидно, это обусловлено включением в состав этих меланинов сопутствующих соединений, в частности, хинонов, относящихся к специфическим лишайниковым веществам фенольной природы, для которых характерно поглощение в видимой области [23]. В целом, спектральные характеристики меланинов, выделенных из лишайника *L. furfuraceum*, позволяют сделать вывод, что  $M_{HClw}$  и  $M_{EtOH}$ , в отличие от  $M_{HCl}$ , обладают более выраженными фотопротекторными свойствами.

Таблица 1. Содержание элементов в меланинах, выделенных из лишайника *L. furfuraceum*

Меланин	Содержание элементов, масс. %				Мольное отношение элементов		
	С	Н	N	O	C/N	H/C	O/C
М <sub>НСI</sub>	31.87±0.04	5.62±0.01	0.70±0.01	61.82±0.04	53.12	2.12	1.46
М <sub>НСIw</sub>	36.25±0.16	5.93±0.08	1.57±0.02	56.25±0.22	27.46	1.96	1.16
М <sub>ЕtOH</sub>	36.19±0.12	6.05±0.40	1.69±0.28	56.07±0.56	25.08	2.01	1.16

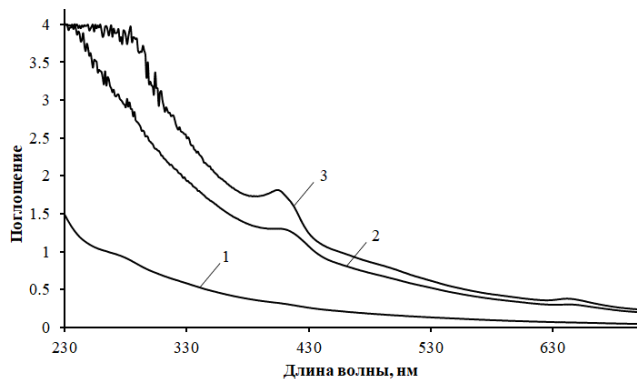


Рис. 2. Электронные спектры меланинов, выделенных из лишайника *L. furfuraceum*: 1 – М<sub>НСI</sub>, 2 – М<sub>НСIw</sub>, 3 – М<sub>ЕtOH</sub>

ИК-спектроскопия является еще одним основным спектральным методом исследования структурно-группового состава меланинов [2, 5, 13, 18]. ИК-спектры меланинов из лишайника *L. furfuraceum* (рис. в электронном приложении) сопоставимы с ИК-спектрами меланинов различного происхождения [5, 13]. В таблице 2 приведены основные полосы поглощения, наблюдаемые в ИК-спектрах исследуемых меланинов. В них присутствуют широкая полоса поглощения в интервале 3000–3600 см<sup>-1</sup>, обусловленная валентными колебаниями ОН-групп в спиртах и фенолах и NH-групп в свободном и ассоциированном виде. О наличии ароматических конденсированных структур в меланинах свидетельствуют полосы поглощения с частотами 1637–1638 см<sup>-1</sup> и 1420–1421 см<sup>-1</sup>, обусловленные валентными колебаниями С=С связи. Однако поглощение при частоте 1420–1421 см<sup>-1</sup> может перекрываться деформационными колебаниями СН<sub>2</sub> фрагментов, присутствие которых подтверждается наличием полосы поглощения при частотах 2920–2929 см<sup>-1</sup>. Эта полоса поглощения, а также полоса поглощения при частотах 1377–1384 см<sup>-1</sup> свидетельствует о наличии в меланинах СН<sub>3</sub>-групп. Полосы поглощения с частотами 1251–1260 см<sup>-1</sup> и 1069–1071 см<sup>-1</sup> обусловлены ассиметричными и симметричными валентными колебаниями =С–О связи в ароматических фрагментах меланинов.

Надо отметить, что в ИК-спектрах всех меланинов обнаруживается полоса поглощения с частотами 1034–1045 см<sup>-1</sup>, свидетельствующая о наличии в их составе полисахаридов [2, 13, 18]. Различие частот поглощения в области «отпечатков пальцев» позволяет предположить, что в составе М<sub>НСIw</sub> и М<sub>ЕtOH</sub>, выделенных по разработанной нами комплексной схеме, присутствуют полисахариды с α-гликозидной связью, тогда как в М<sub>НСI</sub>, выделенным по стандартной методике, содержатся полисахариды с β-связью [24]. В ИК-спектрах М<sub>НСIw</sub> и М<sub>ЕtOH</sub>, в отличие от М<sub>НСI</sub>, появляется полоса поглощения в области 1734 см<sup>-1</sup>, указывающая на наличие в них карбонилсодержащих структур. Кроме того, в спектрах появляются полосы поглощения в области 1545–1550 см<sup>-1</sup> и 1321 см<sup>-1</sup>, обусловленные деформационными колебаниями N–H связей и валентными колебаниями С–N связей, что может свидетельствовать о наличии в исследуемых меланинах индолсодержащих фрагментов и/или белков [2, 13, 24, 25]. Об этом также указывают данные элементного состава меланинов, выделенных из лишайников, согласно которым содержание азота в М<sub>НСIw</sub> и М<sub>ЕtOH</sub> в 2 раза выше по сравнению с М<sub>НСI</sub> (табл. 1).

С целью подтверждения наличия углеводов и белков в составе исследуемых меланинов был проведен их количественный анализ (рис. 3А). Установлено, что меланины, выделенные из лишайника *L. furfuraceum*, содержат до 10% углеводов и до 33% белков. В М<sub>НСIw</sub> и М<sub>ЕtOH</sub>, выделенных по разработанной нами комплексной схеме, по сравнению М<sub>НСI</sub>, выделенным по стандартной методике, количество углеводов увеличивается незначительно, тогда как количество белков возрастает в 1.6–2.4 раза. Таким образом, отличия в условиях выделения меланинов позволили выявить их различия по физико-химическим характеристикам и химическому составу. Это, в свою очередь, может обуславливать разные структурные организации и биологическую активность выделенных меланинов.

Таблица 2. Полосы поглощения в ИК-спектрах меланинов, выделенных из лишайника *L. furfuraceum*

Меланин	Полосы поглощения, см <sup>-1</sup>
M <sub>HCl</sub>	3435; 2920; 1637; 1421; 1384; 1251; 1070; 1045; 898
M <sub>HClw</sub>	3442; 2927; <b>1734</b> ; 1637; <b>1550</b> ; 1421; 1377; <b>1321</b> ; <b>1260</b> ; 1069; 1034; <b>807</b> ; <b>760</b>
M <sub>EtOH</sub>	3412; 2929; <b>1734</b> ; 1638; <b>1545</b> ; 1420; 1377; <b>1321</b> ; <b>1251</b> ; 1071; 1034; <b>808</b> ; <b>764</b>

Жирным шрифтом выделены отличительные полосы поглощения в ИК-спектрах M<sub>HClw</sub> и M<sub>EtOH</sub>.

На следующем этапе работы нами было проведено исследование растворимости и определение антиоксидантных свойств меланинов, выделенных из лишайника *L. furfuraceum*. Основным ограничением при исследованиях биологической активности меланинов является их нерастворимость в воде. Растворы щелочей и диметилсульфоксид, используемые для растворения меланинов, проявляют значительный токсический эффект на тест-объекты, а применение буферных растворов с pH выше 7 не всегда позволяет обеспечить полное растворение меланинов с получением устойчивых к седиментации коллоидных растворов. В связи с этим актуальным является получение водорастворимой формы меланинов [26]. Для меланинов, выделенных из лишайника *L. furfuraceum*, определена растворимость в различных растворителях. Как следует из рисунка 3Б, самую низкую растворимость во всех примененных растворителях имел M<sub>HCl</sub>, полученный по стандартной методике. Даже в 0.5 М натрий фосфатном буфере с pH 7.4 его растворимость была 2.8–8.6 раза ниже по сравнению с M<sub>HClw</sub> и M<sub>EtOH</sub>, выделенными по разработанной комплексной схеме (рис. 1). Надо отметить, что высокое содержание белков в M<sub>EtOH</sub> (рис. 3А) не обеспечило его хорошую растворимость в дистиллированной воде и других растворителях. Очевидно, это обусловлено процессами денатурации белков, входящих в состав M<sub>EtOH</sub>, под действием 70% этанола, используемого для выделения этого меланина. M<sub>HClw</sub>, представляющий собой водорастворимую фракцию кислотоосаждаемого меланина, хорошо растворялся во всех примененных растворителях. Можно предположить, что несмотря на схожие физико-химические характеристики M<sub>EtOH</sub> и M<sub>HClw</sub> (табл. 1 и 2, рис. 2), они существенно отличаются по своей структурной организации, что и повлияло на их растворимость.

Антиоксидантные свойства меланинов, выделенных из лишайника *L. furfuraceum*, определяли по их общей антиоксидантной активности и хелатирующей способности (табл. 4). Показано, что по сравнению с M<sub>HCl</sub>, полученным по стандартной методике, M<sub>HClw</sub> проявлял почти в 1.6 раза большую антиоксидантную активность, однако его хелатирующая способность была почти в 2 раза ниже.

Самыми слабыми антиоксидантными свойствами обладал M<sub>EtOH</sub>, что, как описано выше, может быть обусловлено существенными изменениями в его химическом составе и структурной организации. Кроме того, потеря активности M<sub>EtOH</sub> может быть обусловлена снижением количества доступных реакционноспособных групп в структуре меланина, вследствие их взаимодействия с белками и углеводами, обнаруженными в его составе. Таким образом, установлено, что отличия в условиях выделения меланинов, в частности, использование различных осаждающих агентов, оказывают существенное влияние на их антиоксидантные свойства.

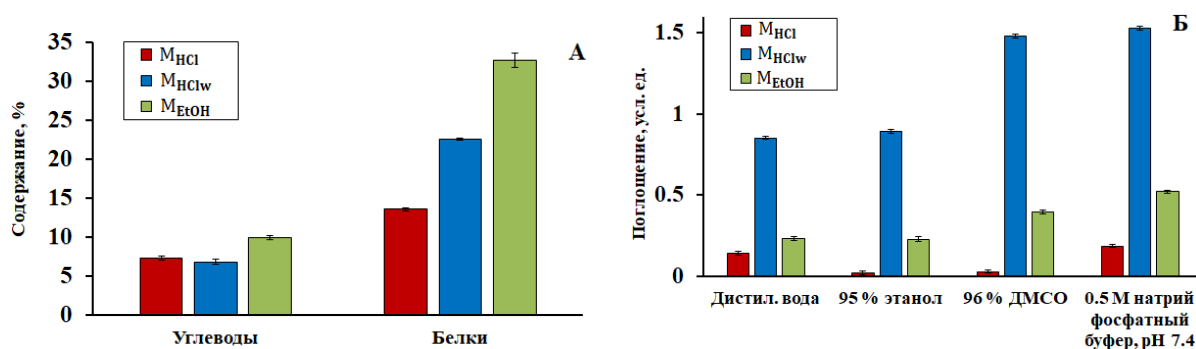


Рис. 3. Содержание углеводов и белков в составе исследуемых меланинов (А), растворимость меланинов, выделенных из лишайника *L. furfuraceum*, в различных растворителях (Б)

Таблица 4. Антиоксидантные свойства меланинов, выделенных из лишайника *L. furfuraceum*

Меланин	Общая антиоксидантная активность, мгАКЭ*/г меланина	Хелатирующая способность (IC <sub>50</sub> ), мкг/мл
M <sub>HCl</sub>	43±1	269±11
M <sub>HClw</sub>	66±2	593±24
M <sub>EtOH</sub>	9±3	1055±44

\* аскорбиновой кислоты эквивалент.

### Выводы

Сложность химического состава и структурной организации природных меланинов обуславливают актуальность разработки методических приемов их выделения и исследования. Особый интерес вызывает меланин лишайника *L. furfuraceum*, отличающегося от большинства лишайников отсутствием типичных лишайниковых веществ. Нами разработана комплексная схема выделения меланинов из лишайника *L. furfuraceum*. Ее отличиями от стандартной методики выделения меланина являются: (1) проведение дополнительной стадии щелочного экстрагирования сырья при высокотемпературном нагреве с целью максимально полного извлечения меланина; (2) использование 70% этанола для наиболее полного осаждения меланинов; (3) выделение водорастворимой фракции меланина при обработке дистиллированной водой осадка меланина, выпавшего из щелочного экстракта при добавлении HCl. В результате было выделено три образца меланинов: кислотоосаждаемый  $M_{HCl}$ , условия выделения которого полностью соответствуют стандартной методике; водорастворимая фракция кислотоосаждаемого меланина  $M_{HClw}$ ; спиртоосаждаемый  $M_{EtOH}$  из супернатантов, полученных после отделения кислотоосаждаемого меланина из щелочных экстрактов талломов лишайника. При этом два образца меланина ( $M_{HClw}$  и  $M_{EtOH}$ ) выделены впервые. Установлено, что суммарный выход меланинов из лишайника по разработанной схеме составил почти 7.5% от сухих веществ лишайника, что в 2.4 раза больше по сравнению с выходом меланина ( $M_{HCl}$ ) по стандартной методике.

Установлено, что условия выделения меланинов оказывают влияние на их элементный состав, спектральные характеристики, содержание сопутствующих компонентов в виде белков и углеводов, растворимость и антиоксидантные свойства. По сравнению с  $M_{HCl}$ , выделенным по стандартной методике,  $M_{HClw}$  и  $M_{EtOH}$ , выделенные по разработанной схеме, имеют более высокую степень ароматичности и содержат больше углеводов и белков. Это оказывает влияние на их фотопротекторные и антиоксидантные свойства. Наибольшей антиоксидантной активностью обладает  $M_{HClw}$ , который в отличие от других меланинов практически полностью растворяется в воде, 95% этаноле, 99% диметилсульфоксиде и фосфатном буфере (pH 7.4). Выявленные характеристики позволяют обосновать в дальнейшем использование этого меланина в фармацевтике для разработки высокоэффективных БАД и лекарственных препаратов.  $M_{HCl}$  проявляет наибольшую хелатирующую способность, что свидетельствует о его сорбционных свойствах. Высокое содержание белков и углеводов в  $M_{EtOH}$  может придать ему иммуномодулирующие и противоопухолевые свойства, однако для подтверждения этого требуется проведение дополнительных исследований.

Таким образом, результаты настоящего исследования углубляют фундаментальное знание о физико-химических характеристиках и структурной организации меланинов, показывают взаимосвязь между методикой их выделения и проявляемой ими биологической активностью. Это обосновывает и расширяет потенциал практического применения меланинов.

*Благодарим профессора Ричарда Бекетт (Университет КваЗулу-Натал, ЮАР) за полезную дискуссию полученных результатов.*

### Список литературы

1. d'Ischia M., Manini P., Martins Z., Remusat L., O'D Alexander C.M., Puzzarini C., Barone V., Saladino R. Insoluble organic matter in chondrites: Archetypal melanin-like PAH-based multifunctionality at the origin of life? // *Phys. Life Rev.* 2021. Vol. 37. Pp. 65–93. DOI: 10.1016/j.plrev.2021.03.002.
2. Грачева Н.В., Желтобрюхов В.Ф. Меланины. Перспективы и проблемы использования в промышленности. Волгоград, 2019. 92 с.
3. d'Ischia M. Melanin-based functional materials // *Int. J. Mol. Sci.* 2018. Vol. 19(1). 228. DOI: 10.3390/ijms19010228.
4. Mattoon E.R., Cordero R.J., Casadevall A. Fungal Melanins and Applications in Healthcare, Bioremediation and Industry // *Journal of fungi.* 2021. Vol. 7(6). 488. DOI: 10.3390/jof7060488.
5. Singh S., Nimse S.B., Mathew D.E., Dhimmara A., Sahastrabudhe H., Gajjar A., Shinde P.B. Microbial melanin: Recent advances in biosynthesis, extraction, characterization, and applications // *Biotechnol. Adv.* 2021. Vol. 53. 107773. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2021.107773.
6. Vahidzadeh E., Kalra A.P., Shankar K. Melanin-based electronics: From proton conductors to photovoltaics and beyond // *Biosens. Bioelectron.* 2018. Vol. 122. Pp. 127–139. DOI: 10.1016/j.bios.2018.09.026.
7. Иванова Л.А., Фоменко И.А., Сергеева Д.А., Чурмасова Л.А., Кенжетайулы К.Ж. Разработка технологии получения фитомеланинов из отходов масличного производства // *Health, Food and Biotechnology.* 2019. Vol. 1(2). Pp. 136–146. DOI: 10.36107/hfb.2019.i2.s245.
8. Yamamoto Y., Hara K., Kawakami H., Komine M. Lichen substances and their biological activities // *In Rec. Adv. in Lichenol.* 2015. Pp. 181–199. DOI: 10.1007/978-81-322-2235-4\_10.



9. Kosanić M., Ranković B. Lichen secondary metabolites as potential antibiotic agents // Lichen secondary metabolites. Springer, Cham, 2019. Pp. 99–127. DOI: 10.1007/978-3-030-16814-8\_3.
10. Wong H.J., Mohamad-Fauzi N., Rizman-Idid M., Convey P., Alias S.A. Protective mechanisms and responses of micro-fungi towards ultraviolet-induced cellular damage // Polar Science. 2018. Vol. 20. Pp. 19–34. DOI: 10.1016/j.polar.2018.10.001.
11. Gauslaa Y., Solhaug K.A. Fungal melanins as a sun screen for symbiotic green algae in the lichen *Lobaria pulmonaria* // Oecologia. 2001. Vol. 126(4). Pp. 462–471. DOI: 10.1007/s004420000541.
12. Otálora M.A., Jørgensen P.M., Wedin M. A revised generic classification of the jelly lichens, *Collembataceae* // Fungal diversity. 2014. Vol. 64(1). Pp. 275–293. DOI: 10.1007/s13225-013-0266-1.
13. Pralea I.E., Moldovan R.C., Petrache A.M., Iliș M., Hegheș S.C., Ielciu I., Iuga C.A. From extraction to advanced analytical methods: The challenges of melanin analysis // Int. J. Mol. Sci. 2019. Vol. 20(16). 3943. DOI: 10.3390/ijms20163943.
14. Скорбина Е.А. Разработка технологии получения и исследование биологической активности меланинсодержащих препаратов: дисс. ... канд. биол. наук. Ставрополь, 2005. 136 с.
15. Патент №2618397 (РФ). Способ получения меланина из чаги / Н.В. Грачева, В.Ф. Желтобрюхов. – 03.05.2017.
16. Сысоева М.А., Хабибрахманова В.Р., Гамаюрова В.С., Шаехова Н.К., Халитов Ф.Г. Исследование золя водных извлечений чаги. XII. Осаждение дисперсной фазы водного извлечения чаги при изменении рН среды // Химия растительного сырья. 2009. №1. С. 131–136.
17. ОФС 1.2.1.0010.15. Потеря в массе при высушивании. М., 2015.
18. Бухало А.С., Бабицкая В.Г., Бисько Н.А., Вассер С.П., Дудка И.А., Митропольская Н.Ю., Михайлова О.Б., Негрейко А.М., Поединок Н.Л., Соломко Э.Ф. Биологические свойства лекарственных макромицетов в культуре. Сборник научных трудов в двух томах. Киев, 2012. Т. 2. 459 с.
19. Оленников Д.Н., Танхаева Л.М. Методика количественного определения группового состава углеводного комплекса растительных объектов // Химия растительного сырья. 2006. №4. С. 29–33.
20. Государственная фармакопея СССР: 11-е изд. М., 1987. Вып. 2. 336 с.
21. ОФС.1.2.1.0005.15. Растворимость. М., 2015.
22. Thangaraj P. Isolation of Compounds // Pharmacological Assays of Plant-Based Natural Products. 2016. Pp. 177–180. DOI: 10.1007/978-3-319-26811-8\_31.
23. Nguyen K.H., Chollet-Krugler M., Gouault N., Tomasi S. UV-protectant metabolites from lichens and their symbiotic partners // Nat. Prod. Rep. 2013. Vol. 30(12). Pp. 1490–1508. DOI: 10.1039/c3np70064j.
24. Наканиси К. Инфракрасные спектры и строение органических соединений. М., 1965. 216 с.
25. Купцов А.Х., Жижин Г.Н. Фурье-КР и Фурье-ИК спектры полимеров. М., 2001. 657 с.
26. Патент №2480227 С2 (РФ). Противовирусное средство на основе меланина / Т.В. Теплякова, Л.И. Пучкова, Т.А. Косогова, Л.Е. Булычев, Л.Н. Шишкина, Н.А. Мазуркова, Н.М. Гашникова, С.М. Балахнин, А.С. Кабанов, Е.И. Казачинская, В.С. Афонина. – 27.04.2013.

Поступила в редакцию 24 августа 2022 г.

После переработки 6 октября 2022 г.

Принята к публикации 16 октября 2022 г.

**Для цитирования:** Хабибрахманова В.Р., Рассабина А.Е., Хайруллина А.Ф., Минибаева Ф.В. Физико-химические характеристики и антиоксидантные свойства меланинов, выделенных из лишайника *Leptogium furfuraceum* (Harm.) // Химия растительного сырья. 2022. №4. С. 115–125. DOI: 10.14258/jcrpm.20220411774.

Khabibrakhmanova V.R.<sup>1\*</sup>, Rassabina A.Ye.<sup>2</sup>, Khayrullina A.F.<sup>2</sup>, Minibayeva F.V.<sup>2</sup> PHYSICO-CHEMICAL CHARACTERISTICS AND ANTIOXIDANT PROPERTIES OF MELANINS EXTRACTED FROM *LEPTOGIUM FURFURACEUM* (HARM.)

<sup>1</sup> Kazan National Research Technological University, ul. K. Marxa, 68, Kazan, 420015 (Russia), e-mail: venha@rambler.ru

<sup>2</sup> Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics, FRC KazSC RAS, ul. Lobachevsky, 2/31, Kazan, 420111 (Russia)

Melanins are universal biopolymers, the main biological function of which is to protect living organisms from adverse factors. Interest in these dark pigments arises due to the prospects for their use in medicine, cosmeceuticals, bioremediation, bioelectronics, and other fields. In this work, a complex scheme was developed to isolate melanins from the lichen *Leptogium furfuraceum* (Harm.), which is a symbiotic extremophilic organism. Screening of the conditions for the extraction of melanin, its subsequent precipitation and purification made it possible to isolate three samples of melanin with a total yield of 7.5% of the dry matter of the lichen. It was established that all isolated melanins have a polyaromatic structure, they contain carbohydrates and proteins, the content of which, depending on the conditions for melanin isolation, is 7.3–9.9% and 13.5–32.7%, respectively. Among the isolated melanins, melanin, which is a water-soluble fraction of acid-precipitated melanin, displays the highest antioxidant activity. This melanin, unlike other melanins, is almost fully soluble in distilled water, 95% ethanol, 99% dimethyl sulfoxide, and phosphate buffer (pH 7.4). The differences in solubility, antioxidant activity, and chelating capacity of isolated lichen melanins make it possible to determine potential areas for their practical use.

**Keywords:** lichen, melanin, FTIR spectroscopy, antioxidant activity, chelating capacity.

## References

1. d'Ischia M., Manini P., Martins Z., Remusat L., O'D Alexander C.M., Puzzarini C., Barone V., Saladino R. *Phys. Life Rev.*, 2021, vol. 37, pp. 65–93. DOI: 10.1016/j.plrev.2021.03.002.
2. Gracheva N.V., Zheltobryukhov V.F. *Melaniny. Perspektivy i problemy ispol'zovaniya v promyshlennosti*. [Melanins. Prospects and problems of use in industry]. Volgograd, 2019, 92 p. (in Russ.).
3. d'Ischia M. *Int. J. Mol. Sci.*, 2018, vol. 19(1), 228. DOI: 10.3390/ijms19010228.
4. Mattoon E.R., Cordero R.J., Casadevall A. *Journal of fungi*, 2021, vol. 7(6), 488. DOI: 10.3390/jof7060488.
5. Singh S., Nimse S.B., Mathew D.E., Dhimmara A., Sahastrabudhe H., Gajjar A., Shinde P.B. *Biotechnol. Adv.*, 2021, vol. 53, 107773. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2021.107773.
6. Vahidzadeh E., Kalra A.P., Shankar K. *Biosens. Bioelectron.*, 2018, vol. 122, pp. 127–139. DOI: 10.1016/j.bios.2018.09.026.
7. Ivanova L.A., Fomenko I.A., Sergeyeva D.A., Churmasova L.A., Kenzhetayuly K.Zh. *Health, Food and Biotechnology*, 2019, vol. 1(2), pp. 136–146. DOI: 10.36107/hfb.2019.i2.s245. (in Russ.).
8. Yamamoto Y., Hara K., Kawakami H., Komine M. *In Rec. Adv. in Lichenol*, 2015, pp. 181–199. DOI: 10.1007/978-81-322-2235-4\_10.
9. Kosanić M., Ranković B. *Lichen secondary metabolites*. Springer, Cham, 2019, pp. 99–127. DOI: 10.1007/978-3-030-16814-8\_3.
10. Wong H.J., Mohamad-Fauzi N., Rizman-Idid M., Convey P., Alias S.A. *Polar Science*, 2018, vol. 20, pp. 19–34. DOI: 10.1016/j.polar.2018.10.001.
11. Gauslaa Y., Solhaug K.A. *Oecologia*, 2001, vol. 126(4), pp. 462–471. DOI: 10.1007/s004420000541.
12. Otálora M.A., Jørgensen P.M., Wedin M. *Fungal diversity*, 2014, vol. 64(1), pp. 275–293. DOI: 10.1007/s13225-013-0266-1.
13. Pralea I.E., Moldovan R.C., Petrache A.M., Iliș M., Hegheș S.C., Ielciu I., Iuga C.A. *Int. J. Mol. Sci.*, 2019, vol. 20(16), 3943. DOI: 10.3390/ijms20163943.
14. Skorbina Ye.A. *Razrabotka tekhnologii polucheniya i issledovaniye biologicheskoy aktivnosti melaninsoder-zhashchikh preparatov: diss. ... kand. biol. nauk*. [Development of production technology and study of the biological activity of melanin-containing drugs: diss. ... cand. biol. Sciences]. Stavropol', 2005, 136 p. (in Russ.).
15. Patent 2618397 (RU). 03.05.2017. (in Russ.).
16. Sysoyeva M.A., Khabibrakhmanova V.R., Gamayurova V.S., Shayekhova N.K., Khalitov F.G. *Khimiya rastitel'nogo syr'ya*, 2009, no. 1, pp. 131–136. (in Russ.).
17. *OFS 1.2.1.0010.15. Poterya v masse pri vysushivani. [OFS 1.2.1.0010.15. Weight loss on drying]*. Moscow, 2015. (in Russ.).
18. Bukhalo A.S., Babitskaya V.G., Bis'ko N.A., Vasser S.P., Dudka I.A., Mitropol'skaya N.Yu., Mikhaylova O.B., Negreyko A.M., Poyedinok N.L., Solomko E.F. *Biologicheskkiye svoystva lekarstvennykh makromitsetov v kul'ture. Sbornik nauchnykh trudov v dvukh tomakh*. [Biological properties of medicinal macromycetes in culture. Collection of scientific papers in two volumes]. Kiev, 2012, vol. 2, 459 p. (in Russ.).
19. Olennikov D.N., Tankhayeva L.M. *Khimiya rastitel'nogo syr'ya*, 2006, no. 4, pp. 29–33. (in Russ.).
20. *Gosudarstvennaya farmakopeya SSSR: 11-ye izd. [USSR State Pharmacopoeia: 11th ed.]*. Moscow, 1987, vol. 2, 336 p. (in Russ.).
21. *OFS.1.2.1.0005.15. Rastvorimost'. [OFS.1.2.1.0005.15. Solubility]*. Moscow, 2015. (in Russ.).
22. Thangaraj P. *Pharmacological Assays of Plant-Based Natural Products*, 2016, pp. 177–180. DOI: 10.1007/978-3-319-26811-8\_31.

\* Corresponding author.

23. Nguyen K.H., Chollet-Krugler M., Gouault N., Tomasi S. *Nat. Prod. Rep.*, 2013, vol. 30(12), pp. 1490–1508. DOI: 10.1039/c3np70064j.
24. Nakanisi K. *Infrakrasnyye spektry i stroyeniye organicheskikh soyedineniy*. [Infrared spectra and structure of organic compounds]. Moscow, 1965, 216 p. (in Russ.).
25. Kuptsov A.Kh., Zhizhin G.N. *Fur'ye-KR i Fur'ye-IR spektry polimerov*. [Fourier-Raman and Fourier-IR Spectra of Polymers]. Moscow, 2001, 657 p. (in Russ.).
26. Patent 2480227 C2 (RU). 27.04.2013. (in Russ.).

*Received August 24, 2022*

*Revised October 6, 2022*

*Accepted October 16, 2022*

**For citing:** Khabibrakhmanova V.R., Rassabina A.Ye., Khayrullina A.F., Minibayeva F.V. *Khimiya Rastitel'nogo Syr'ya*, 2022, no. 4, pp. 115–125. (in Russ.). DOI: 10.14258/jcprm.20220411774.

