

ХИМИЧЕСКИЕ ТЕХНОЛОГИИ

УДК 577.19:602.4

РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ВЫДЕЛЕНИЯ И ОЧИСТКИ БИОИНГИБИРУЮЩЕГО ПРОДУКТА И МЕЛАНИНА ИЗ КУЛЬТУРАЛЬНЫХ ЖИДКОСТЕЙ И ИЗУЧЕНИЕ ИХ СВОЙСТВ

А. Е. АГАДЖАНЫАН*, Г. Ж. ОГАНЕСЯН, К. И. ЕГИЯН и С. В. АВЕТИСЯН

НПЦ "Армбиотехнология" НАН РА
Армения, Ереван, 0056
E-mail: aghajanyanarmen@yahoo.com

Исследован процесс сорбционного выделения и очистки биоингибирующего продукта из культуральных жидкостей (КЖ) молочнокислых бактерий и определены оптимальные параметры процесса. Для очистки целевого продукта от сопутствующих примесей из элюатов ионообменных колонн использован экстракционный способ. Опыты показали, что при этом биоингибирующую активность полученного продукта удается довести до 28000 ед/мл. Установлено, что эффективными экстрагентами являются ДМК, ДЭК и ацетонитрил. Выход целевого продукта из супернатанта с учетом возврата растворов в технологический цикл составляет ~64 %.

Суть разработанного комбинированного способа выделения и очистки биоингибирующего продукта из КЖ заключается в том, что с помощью ионного обмена из супернатанта выделяется частично очищенный раствор антимикробного продукта, из которого далее экстракционным способом удается получить целевой продукт с высокой биоингибирующей активностью.

Разработан сорбционный метод выделения меланина из супернатанта КЖ в зависимости от типа применяемого сорбента или смолы, pH раствора и размер гранул смолы. Лучшие результаты сорбции меланина из супернатанта и элюирование со смолы получены при использовании слабо-основного *анионита* ИА-1р в Cl⁻-форме.

Сняты ЭПР-спектры меланина и показано, что число неспаренных электронов в нем составляет 10^{18} - 10^{19} спин/г. Установлено, что в структуре меланина есть два типа парамагнитных центров, один из которых является лабильным, а другой – стабильным.

Изучено также влияние температурного воздействия на свойства меланина и его электропроводность.

Рис. 5, табл. 3, библи. ссылок 35.

Особое место в биотехнологическом производстве биологически активных веществ (БАВ) занимает выделение и очистка целевого продукта из КЖ.

Для микробиологических процессов характерно, как правило, образование КЖ, содержащих кроме целевого продукта большое количество сопутствующих примесей.

Поэтому в процессе выделения и очистки БАВ из КЖ часто приходится сложные и, как правило, нестандартные индивидуальные технологические подходы, позволяющие получить целевые продукты высокой степени чистоты.

Согласно оценкам экономистов себестоимость БАВ примерно на 60% определяется затратами на стадиях выделения и очистки из КЖ. Исходя из этого, разработка эффективных методов выделения и очистки БАВ, представляющих коммерческий интерес, является актуальной задачей [1].

Целью предлагаемой работы являлось исследование процессов выделения и очистки некоторых БАВ (микробного меланина и биоингибирующего продукта) из КЖ и разработка эффективных технологий их выделения и очистки из КЖ микробного синтеза.

Выделение и очистка биоингибирующего продукта из КЖ

Биоингибирующие вещества, в основном, представляют собой синтезируемые бактериями (бактериоцины) или дрожжами (микоцины) продукты, которые отличаются друг от друга по молекулярному весу, химическому составу и по спектру влияния [2].

Получение новых биоингибирующих продуктов на основе пробиотических микроорганизмов является актуальной задачей. За последние два десятилетия проблема приобрела более актуальный характер, так как увеличилось число бактерий, устойчивых к влиянию антибиотиков, что приводит к увеличению распространения болезней как среди населения, так и среди животных [3].

Биоингибирующие вещества имеют различную природу [4].

В литературе существует большое число опубликованных работ, посвященных классификации бактериоцинов [2-5], а также биосинтезу и их выделению из культуральных жидкостей (КЖ). В некоторых работах выделение бактериоцина из КЖ осуществляют центрифугированием, после чего центрифугат подвергают ультрафильтрации [5-8]. Далее бактериоцин осаждают из пермеата высаливанием сульфатом аммония, а выделившийся осадок растворяют в растворе цитрата натрия и диализуют. Диализат подвергают гель-фильтрации. Собранные фракции объединяют и лиофильно высушивают. Сухую массу растворяют в воде и пропускают через колонку, заполненную карбоксиметилцеллюлозой. Со смолы целевой продукт элюируют раствором

хлорида натрия. Собранные активные фракции смешивают, подвергают диализу и фракционируют с помощью ВЭЖХ. Активные фракции смешивают, лиофильно высушивают и после растворения в воде проверяют бактерицидные свойства.

Известен способ выделения бактериоцина из КЖ, полученной культивированием штамма *Lactobacillus plantarum* F1 и *Lactobacillus brevis* в питательной среде [9]. Согласно способу, вначале КЖ подвергают центрифугированию, центрифугат ультрафильтруют и из пермеата сульфатом аммония осаждают бактериоцин. Осадок растворяют в фосфатном буфере и подвергают диализу. Из диализованного раствора бактериоцин экстрагируют органическими растворителями, экстракт выпаривают, полученный осадок растворяют в растворе NaCl и определяют бактерицидную активность полученного вещества. Аналогичный подход к выделению и очистке бактериоцина изложен в работе [4]. Окончательную очистку образца целевого продукта осуществляют с помощью ВЭЖХ.

Выделение биоингибирующих продуктов из супернатантов в литературе, в основном, предлагают осуществлять следующим образом: высаливанием сульфатом аммония, растворением образовавшегося осадка в буферном растворе, диализом, гель-фильтрацией, ионным обменом и ВЭЖХ [4-7].

Предложенные подходы к выделению и очистке биоингибирующих продуктов из КЖ, в основном, имеют исследовательский характер и являются нетехнологичными.

Целью предлагаемой работы являлась разработка эффективного технологического способа выделения и очистки биоингибирующего продукта из КЖ молочнокислых бактерий, имеющего высокое бактерицидное действие.

Выделение и очистка микробного меланина из КЖ и изучение его физико-химических свойств

Меланины – темноокрашенные высокомолекулярные нерегулярные полимеры, образующиеся в организмах при ферментативном окислении азотсодержащих и безазотистых полифенолов [18,19]. Они обладают радиопротекторными и антиоксидантными свойствами, являются сорбентами радионуклидов и тяжелых металлов и способны эффективно защищать живые организмы от ультрафиолетового излучения.

Являясь ингибиторами свободнорадикальных реакций, меланины способны подавлять рост злокачественных опухолей, оказывать защитное действие при летальных дозах ионизирующих излучений, тормозить процессы перекисного окисления липидов, стимулировать рост растений [19]. Меланины используются в медицине, фармакологии, сельском хозяйстве и в других областях [20].

Для получения меланинов используют следующие технологии: химический синтез, предусматривающий окисление тирозина и его производных [21], экстракцию из животного материала и растительного сырья [22,23], микробный синтез [24,25].

Вследствие большого химического разнообразия биологических материалов, являющихся сырьем для получения меланина, единого стандартного метода выделения и очистки не существует [26].

Условия эксперимента

Ранее была показана антимикробная активность КЖ штаммов *Lactobacillus acidophilus* 1991 ВКПМ 6257 [10] и *Lactobacillus rhamnosus* 2012 ИНМИА 9614 [11], обусловленная синтезом бактериоцина.

КЖ биоингибирующих веществ вышеуказанных штаммов, полученную после выращивания в среде MRS при температуре 37°C в течение 48 ч, подвергали центрифугированию в течение 20 мин при 2900 g. Супернатант подвергали ультрафильтрации путем пропускания через разделительный ультрафильтрационный аппарат с полыми волокнами периодического действия AP-02 (Россия). Рабочая смесь циркулировала по замкнутому контуру. Далее пермеат подвергали упариванию в вакууме при 36-38°C и остаточном давлении 0,01 МПа до достижения содержания сухих веществ (СВ) в пермеате 27-30%. Для осаждения целевого продукта к 30 мл упаренного пермеата при перемешивании добавляли сульфат аммония квалификации «хч» до достижения степени насыщения раствора равной 30-80%. Значение pH упаренного раствора составляло 3,5 и 6,5. После 20-минутного перемешивания массу выдерживали при 4°C в течение 20 ч. Образовавшийся осадок отделяли от раствора центрифугированием в течение 15 мин при 5400 g. Аналогичный подход был применен при осаждении биоингибирующего вещества изопропанолом. Объемное соотношение упаренного раствора к изопропанолу составляло от 1:0,5 до 1:10. Из образовавшегося осадка готовили 5% водный раствор и в нем определяли антимикробную активность.

Сорбционный процесс выделения биоингибирующего вещества из супернатанта КЖ осуществляли пропусканием раствора через две последовательно соединенные ионообменные колонки. Первая колонка заполнена катионитом КУ-2-8 (Россия), а вторая – анионитом ЭДЭ-10П (Россия) в H⁺ и OH⁻ форме, соответственно. Линейная скорость потока супернатанта по направлению снизу вверх составляла 0,034 см/с. В процессе сорбции первую колонку использовали для регулирования pH раствора в фазе анионита. Объем катионита в колонке составлял 0,12 объема, а анионит – 0,35 объема от общего объема пропущенного супернатанта. Так как биоингибирующее вещество, в основном, имеет анионную природу, оно сорбируется на анионите. После прекращения

подачи супернатанта смолы промывали водой до содержания СВ в выходящей со смолы жидкости, равного ~0%, затем сорбированный целевой продукт со смолы элюировали аммиачным раствором при скорости потока элюента по направлению сверху вниз, равной 0,02 см/с. Фракции, обладающие биоингибирующим свойством, объединяли и подвергали вакуумному упариванию до СВ раствора, равных 50-52% и после разбавления определяли биоингибирующую активность полученного продукта.

Экстракцию биоингибирующего продукта из элюата ионообменной колонки осуществляли добавлением к 20 мл элюата определенного количества (обычно один объем к одному объему элюата) органического растворителя соответствующего типа и после десятиминутного экстрагирования массу оставляли на расслоение в течение 20 мин, после чего органический слой отделяли от водного. Вакуумным упариванием органический растворитель отделяли от экстракта и водного слоя и определяли биоингибирующую активность упаренных растворов. Упаренный водный раствор присоединяли к исходному супернатанту для ионообменной очистки.

Содержание биоингибирующего продукта в различных образцах определяли методом образования ингибирующей зоны на тест-культурах.

В работе условной единицей антибактериальной активности (Аи/мл) считалась величина разбавления, при котором образец проявлял минимальную зону (2 мм) подавления роста тест-культур [12].

В качестве исследуемых тест-культур использовали условно-патогенные бактерии родов *Escherichia coli* K-12, *Salmonella typhimurium* Г-38 и *Bacillus subtilis* Г-17-89, находящиеся в коллекции микроорганизмов НПП «Армбиотехнология». Выращивание тест-культур проводили в питательной среде при 30°C в течение 18 ч. В конце, в зависимости от культур, титр составлял 10^5 - 10^6 КОЕ/мл.

Для устранения действия органических кислот на тест-организмы рН анализируемых образцов был скорректирован до 6,0 раствором NaOH.

КЖ меланина была получена при культивировании штамма-продуцента *Bacillus thuringiensis* K1 на питательной среде [25]. Содержание меланина в КЖ составляло 4-6 г/л.

Сорбцию меланина в динамических условиях проводили на колонке (6×70 см) при линейной скорости потока супернатанта по направлению снизу вверх, равной 0,034 см/с.

Элюирование меланина со смолы проводили 3,5% аммиачным раствором при скорости потока элюента через колонку по направлению сверху вниз, равной 0,015 см/с.

Концентрацию меланина определяли измерением оптической плотности (ОП) раствора при 315 нм и сравнением полученной величины со значением ОП стандартного раствора меланина.

Спектры ЭПР регистрировали при температуре 20°C на спектрометре типа SE/X-2543 «Radiopan» (Польша) с высокочастотной модуляцией 100 кГц на частоте 9,4 ГГц.

Спектральные измерения проводили на спектрометре Perkin Elmer 550S UV-VIS (США).

Результаты и обсуждение

Проведенные нами исследования показали, что с помощью высаливания сульфатом аммония или осаждения изопропанолом при различных значениях pH раствора целевого продукта из КЖ двух используемых штаммов не удастся количественно провести осаждение биоингибирующего продукта из упаренного пермеата независимо от степени насыщения раствора (от 35 до 80%) и объемного соотношения раствор: изопропанол (от 1:0,5 до 1:10) соответственно. Очевидно, что отсутствие образования осадка биоингибирующего продукта может быть связано с небольшим молекулярным весом (~700-1400 D) и высокой растворимостью [13].

Учитывая вышесказанное, для выделения целевого продукта из супернатанта был применен метод ионообменной хроматографии. Обменная емкость анионита ЭДЭ-10П к биоингибирующему продукту составляет ~ 1280 ед/мл.

В собранных элюатах определяли СВ, pH и биоингибирующую активность. Фракции, обладающие антимикробным свойством, объединяли. Полученный продукт именовали антимикробный препарат – АМП [14-15].

Объем пропущенного через ионообменные колонки супернатанта, составлял 5,2 л (pH 3,4; СВ 7,0%, кислотность 220 по Тернеру, солевой состав 0,34 г-экв, антимикробная активность супернатанта 600 Аи/мл).

Опыты показали, что из сухих веществ, содержащихся в исходном супернатанте (364 г) – 279 г, как примеси переходят в сорбционный сток и лишь ~85 г СВ сорбируется на анионите.

Таким образом, на стадии ионного обмена ~76,6% от общего количества СВ исходного супернатанта как примеси очищаются от биоингибирующего продукта.

В процессе сорбции 79% биоингибирующего продукта сорбируется на смолах.

После водной промывки смолы, сорбированный на смолах целевой продукт элюировали 3% раствором аммиака.

Фракции элюатов обеих колонок, имеющие биоингибирующее свойство, объединялись и подвергались вакуумному упариванию до содержания СВ в растворе, равном 52%. Объем полученного упаренного

раствора составлял 360 мл (~7% от общего объема исходного супернатанта), а активность целевого продукта в нем 5800 Аи/мл.

Выход целевого продукта на стадии ионного обмена составляет ~67%.

Разработанный сорбционный способ позволяет очистить целевой продукт от положительно заряженных неорганических и органических соединений, а также от основного количества сопутствующих целевому продукту незаряженных компонентов.

Установлено, что при ионообменном выделении биоингибирующего продукта из супернатанта целевой продукт удается очистить от сопутствующих примесей только частично. Для доочистки полученного элюата от примесей нами применялся экстракционный способ. Исходя из того, что биоингибирующие продукты устойчивы в среде органических растворителей [16], для их экстракции из элюатов были испытаны органические растворители различной природы. Результаты исследований по выделению биоингибитора из элюата ионообменной колонки методом экстракции представлены в табл. 1.

Таблица 1

Результаты опытов по экстракции биоингибирующего продукта из элюатов органическими растворителями различной природы

Название экстрагента	Объемное соотношение элюат/экстрагент	Объем экстракта после упарки, мл	Объем водной фазы после упарки, мл	Биоингибирующая активность экстракта, Аи/мл	Биоингибирующая активность водной фазы, ед/мл	Величины дипольного момента экстрагентов
Гексан	1:1	2,3	17,6	6500	5740	0,08
Гептан	1:1	2,5	17,9	7000	5300	–
Диметилэфир	1:1	2,2	16,0	6000	6200	1,3
Диоксан	1:1	2,5	17,0	6700	5350	0,45
Хлороформ /метанол	1:1	2,0	18,1	8000	5600	1,15/1,7
ДМК	1:1	2,7	16,8	28000	2420	2,84
ДМК	1:1	2,8	17,0	26800	2750	„ - „
ДМК	1: 0,7	2,8	17,7	25100	2600	„ - „
ДМК	1: 0,5	2,3	17,5	22400	3700	„ - „
ДЭК	1:1	2,6	17,0	27200	2600	–
Ацетонитрил	1:1	2,6	17,5	27800	2500	3,2
Этилацетат	1:1	2,3	17,3	7300	5700	1,78
Толуол	1:1	2,1	16,8	6900	6000	0,36
Диметилформамид	1:1	Расслоение не идет				3,82

Как видно из табл. 1, из применяемых органических растворителей более эффективными оказались диметил- и диэтилкетоны и ацетонитрил. Высокая экстрагирующая способность вышеуказанных соединений связана, по-видимому, с высокой величиной их дипольных моментов.

Несмотря на то, что из использованных органических растворителей наибольшую величину дипольного момента имеет диметилформамид (ДМФ), его использование для экстракции нецелесообразно, потому что он не обеспечивает расслоения с водным раствором биоингибирующего продукта.

Из использованных экстрагентов выгоднее применять диметил- и диэтилкетоны по причине их низкой стоимости по сравнению с ацетонитрилом. Что касается выбора кетонов, то для экстракции целевого продукта, исходя из доступности, предпочтительнее использовать ДМК [17].

Микробиологическим анализом установлено, что полученный упаренный экстракт подавляет рост условно-патогенных (*E. coli*, *S. typhimurium* и *B. subtilis*) и патогенных (*Staphylococcus aureus*-21G, *Pseudomonas aeruginosa*-12, *Klebsiella sp.*, *Proteus mirabilis* 597) культур в 200-кратном разбавлении полученных образцов.

Исследования показали, что при экстракции ~62-65% биоингибирующего продукта переходит из элюата в органическую фазу. Если учесть, что оставшиеся в водном растворе ~35% биоингибирующего продукта после отгонки экстрагента возвращаются на стадию ионнообменной очистки, выход целевого продукта на стадии экстракции можно довести до 97%.

Выход целевого продукта из супернатанта с учетом возврата растворов в технологический цикл составляет ~64%.

Разработанный комбинированный способ выделения и очистки антимикробного продукта был применен для получения биоингибирующих продуктов из КЖ различных МКБ и дрожжей. Отличие состояло в количественном выходе биоингибирующих продуктов, связанном с их содержанием в КЖ.

Так как концентрация меланина в полученном КЖ низка, наиболее эффективным является применение сорбционного способа выделения пигмента из супернатанта.

Исследование процесса сорбции меланина из супернатанта в статических условиях показало, что равновесное состояние в изученной системе, в основном, устанавливалось через 2-4 ч в зависимости от типа применяемого сорбента (табл. 2).

Как видно из данных табл. 1, количество сорбированного меланина существенно зависит от типа анионита и его гранулометрического состава (опыты 1,8). Поэтому для лучшей сорбции пигмента крупные

гранулы анионита размалывали и использовали фракции (-0,63–+0,2 мм).

Так как из испытанных ионитов по технологическим показателям (по сорбции и десорбции) лучшие результаты получены при использовании анионита сорбента ИА-1р, то для выделения меланина из супернатанта применен этот тип ионита.

Сорбция меланина на смоле ИА-1р обусловлена, по-видимому, селективным взаимодействием между сорбатом и матрицей смолы, образованной в результате поликонденсации формальдегида, *м*-фенилендиамин и резорцина [27].

Равновесную обменную емкость смолы ИА-1р (Cl⁻-форма) по меланину при величине рН исходного раствора 5,0 в статических условиях определяли в виде изотермы (рис. 1).

Таблица 2

Результаты сорбции меланина из супернатанта в зависимости от типа применяемого сорбента или смолы, величины рН раствора и размеров гранул смолы

Номер опытов	Наименование сорбента	рН супернатанта	рН супернатанта после сорбции	Концентрация меланина в исходном	Концентрация меланина в супернатанте	Емкость смолы или сорбентов к меланину
	ИА-1р Cl ⁻ форма -0.63÷+0.2 мм	4.0	4.3	3.10	0.75	79.0
	ИА-1р Cl ⁻ форма -0.63÷+0.2 мм	5.0	5.1	3.30	1.03	75.8
	ИА-1р Cl ⁻ форма -0.63÷+0.2 мм	6.2	6.9	3.20	1.59	53.8
	ИА-1р Cl ⁻ форма -0.63÷+0.2 мм	7.5	7.3	3.20	1.76	48.0
	ИА-1р Cl ⁻ форма -0.63÷+0.2 мм	8.9	8.4	3.20	2.10	37.6
	ИА-1р Cl ⁻ форма -0.63÷+0.2 мм	12.4	11.8	3.10	2.70	11.6
	AB-17 Cl ⁻ форма -0.75÷+0.5 мм	5.4	5.8	3.20	2.52	22.6
	Dowex Cl ⁻ форма 100-200 меш.	5.4	6.2	3.20	1.13	69.2
	АРА-8Р Cl ⁻ форма – 0.75÷+0.5 мм	5.0	5.5	3.30	2.25	35.0
	АРА-8Р Cl ⁻ форма – 0.25÷+0.1 мм	5.0	5.5	3.30	1.85	48.3
	ЭДЭ-10П Cl ⁻ форма – 0.75÷+0.5 мм	5.4	5.8	3.20	1.85	45.0
	Уголь актив. марка ОУ-В	5.0	6.6	3.30	1.00	76.6
	Уголь актив. марка АГЦ-4	5.4	6.2	3.20	2.90	3.3
	КУ-2х8 Н ⁺ форма -0.75÷+0.5 мм	5.4	1.6	3.20	2.25	28.3
	КУ-2х8 NH ₄ ⁺ форма – 0.75÷+0.5 мм	5.4	6.1	4.10	3.98	4.0
	Полисорб 1	5.0	5.7	3.30	3.26	1.4
	КМ целлюлоза КМ-32	5.0	5.7	3.30	3.25	1.7
	Силикагель Ц-25И, 5/40 мк/м	5.0	5.6	4.20	4.12	2.7

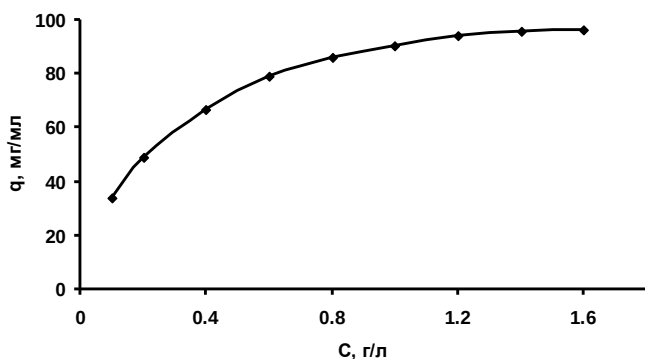


Рис. 1. Изотерма сорбции меланина, где c – равновесная концентрация меланина в растворе, г/л; q – сорбированное количество меланина на анионите, мг/мл.

Как видно из рис. 1, полученная изотерма имеет выпуклую форму, что свидетельствует об избирательной сорбции. Из зависимости сорбционной способности смолы от равновесной концентрации меланина следует, что увеличение концентрации меланина в равновесном растворе приводит к возрастанию сорбции [28].

Исходя из полученных данных, в динамических условиях на анионите ИА-1р проводили выделение меланина из супернатанта. Сначала рН супернатанта снижали от 8,9 до 3,5, затем раствор пропускали через ионообменную колонку, заполненную смолой ИА-1р в СГ-форме. Далее смолу промывали обессоленной водой, после чего меланин элюировали 3,5% раствором аммиака.

Как видно из рис. 2, при элюировании ~97% сорбированного меланина концентрируется в 2,5 кратном объеме элюата от одного объема смолы.

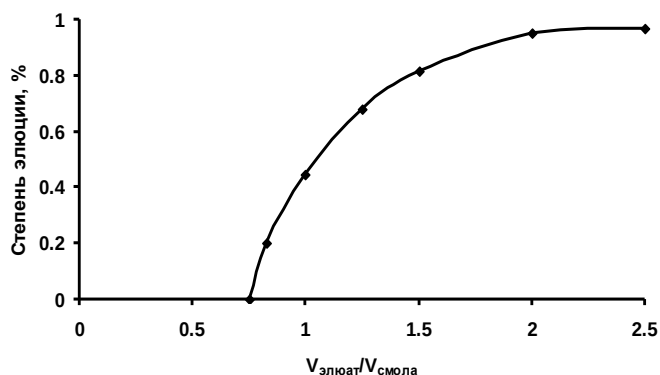


Рис. 2. Степень элюирования меланина со смолы ИА-1р в зависимости от объема пропущенного элюента.

Выявлено, что в результате возврата в технологический цикл разбавленного элюата меланина и аммиачного конденсата, полученного

после вакуумного выпаривания «богатого» элюата, удается на 25% снизить расход аммиачного раствора на стадии элюирования и на 4,0-4,5% увеличить выход целевого продукта.

Собранный аммиачный элюат подвергали вакуумному упариванию до концентрации меланина 200-250 г/л и раствор высушивали в сушильном шкафу с продувкой горячего воздуха (50-55⁰С). В результате высушивания получается черно-коричневая аморфная масса с металлическим блеском [25].

Для установления принадлежности полученного пигмента к меланинам использовали качественные реакции с окислителями [18]. Результаты указанных реакций показали присутствие в полученном пигменте хиноидных и фенольных структур, что подтверждает его меланиновую природу [18-19].

При сопоставлении ИК-спектров виноградных пигментов, выделенных из природной и культивированной чаги, синтетического и полученного нами микробного меланина обнаруживается их сходство в отношении основных полос поглощения [29-30].

Особенностью меланинов, как природных полимеров, содержащих развитые системы сопряженных связей, является наличие неспаренных электронов.

Все меланины, без исключения, имеют ЭПР-поглощение в виде слегка асимметричного синглетного сигнала без сверхтонкой структуры (рис 4) с величиной g-фактора, варьирующего в пределах 2,003-2,004 [26].

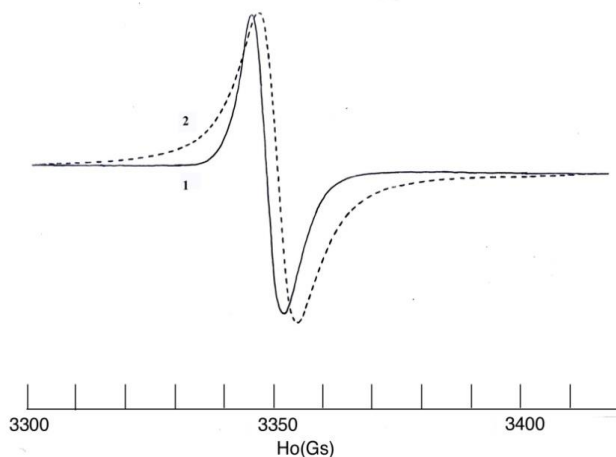


Рис. 4. Спектры ЭПР меланинов микробного (1) и синтетического (2) происхождения.

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

Число неспаренных электронов в нем составляют 10^{18} - 10^{19} *спин/г* [30].

Полученный нами микробный меланин хорошо растворим в воде, что позволило зарегистрировать его спектры ЭПР в растворе в зависимости от разбавления.

Так как удалось провести измерения ЭПР-данных в жидкой фазе, прежде всего надо было убедиться, что наблюдаемый сигнал действительно принадлежит меланину. С этой целью был приготовлен ~ 20 *mM* раствор меланина в воде, а каждый последующий образец разбавляли в два раза.

На рис. 5 представлены спектры ЭПР исходного раствора меланина (1) и растворов, разбавленных в 2 (2), 4 (3), 8 (4), 16 (5) и 32 (6) раза по отношению к исходному.

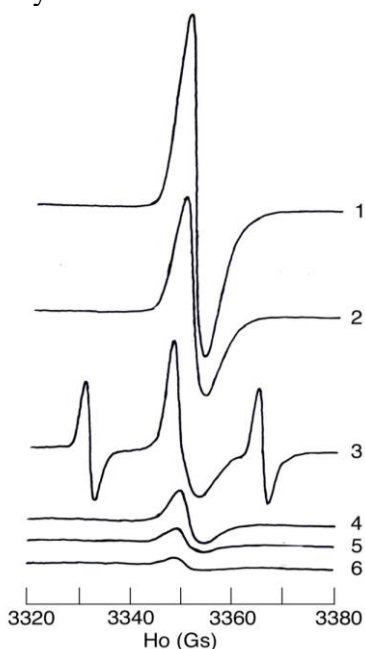


Рис. 5. Спектры ЭПР водного раствора микробного меланина в зависимости от разбавления: 1- исх. – 20 *mM*; 2 – 10 *mM*; 3 – 5 *mM*; 4 – 2,5 *mM*; 5 – 1,25 *mM*; 6 – 0,625 *mM*.

Как видно из рис. 5, после разбавления исходного образца в 2 раза относительная интенсивность сигнала уменьшалась без изменения формы сигнала, а последующее разбавление в 2 раза привело к тому, что, как видно из рис. 5, спектр (3) представляет суперпозицию двух сигналов ЭПР: первый – синглетный, на который наложен триплетный сигнал с одинаковыми интенсивностями трех исходных компонентов. Ширина линии исходного синглетного сигнала ЭПР составляет 5,2 *Гаусса*, а значение *g*-фактора равно $g=2,002$; константа сверхтонкого расширения у триплетного сигнала равна 17,4 *гаусса*, а значение *g*-фактора равно $g=2,004$. Такая величина константы сверхтонкой

структуры однозначно свидетельствует о том, что неспаренный электрон взаимодействует с ядром азота [31]. В соответствии с изложенным можно считать, что спектр (3) несет такую информацию: в структуре меланина при этой концентрации ($\sim 5 \text{ mM}$) имеются два типа парамагнитных центров, один из которых должен быть локализован в сопряженной цепи меланина, а второй – на одном атоме азота. Таким образом, в структуре микробного меланина имеются два типа парамагнитных центров, один из которых являлся лабильным, а другой – стабильным (рис. 5) [30].

Изучено также влияние температурного воздействия на свойство микробного меланина [32]. Установлено, что аморфный осадок меланина устойчив при 120°C . При повышении температуры среды (до 200°C), по-видимому, начиналась деградация меланина, что приводило к частичному нарушению его структуры.

Исходя из данных гель-хроматографии (молекулярная масса микробного меланина составляла 4 кДа) и элементного анализа, водорастворимый меланин из культуры *Bacillus thuringiensis serovar K1* имеет следующую эмпирическую формулу: $\text{C}_{185}\text{H}_{257}\text{O}_{62}\text{N}_{40}\text{S}$ [33].

Так как меланин является аморфным веществом, при высоком давлении ($1,0\text{-}1,2 \text{ МПа}$) из указанных образцов приготовили таблетки диаметр (D), толщина (L) и поверхность (S) которых приведена в табл. 3. Сопротивление рассчитывали по формуле $\rho = RS/L$; а электропроводность – $\sigma = 1/\rho$. Результаты расчета приведены в табл. 3.

Таблица 3

L(м)	R (ом)	D (м)	S (м ²)	$\rho \cdot 10^{-8}$ (ом.м)	$\sigma \cdot 10^9$ (1/ом.м)
$1,45 \cdot 10^{-3}$	$170 \cdot 10^6$	10^{-2}	$0,785 \cdot 10^{-4}$	$9,2 \cdot 10^{-2}$	$1,1 \cdot 10^{-2}$
$2,2 \cdot 10^{-3}$	$270 \cdot 10^6$	10^{-2}	$0,785 \cdot 10^{-4}$	$9,6 \cdot 10^{-2}$	$1,0 \cdot 10^{-2}$
$0,7 \cdot 10^{-3}$	$300 \cdot 10^6$	$0,7 \cdot 10^{-2}$	$0,384 \cdot 10^{-4}$	$27,5 \cdot 10^{-2}$	$0,36 \cdot 10^{-2}$

Как видно из данных табл. 3, полученные образцы меланинов обладают диэлектрическими свойствами, но на грани полупроводников[34]. Исходя из этих свойств, меланины используются в производстве солнечных элементов [35].

**ԿՈՒՆՏԱՌԱՎ ՆԵՂՈՒԿՆԵՐԻՑ ԿԵՆՍԱՐԳԵԼԱԿԻՉ ՆՅՈՒԹԻ
ԵՎ ՄԵԼԱՆԻՆԻ ԱՆՋԱՏՄԱՆ ԵՎ ՄԱՔՐՄԱՆ ՏԵԽՆՈԼՈԳԻԱՆԵՐԻ
ՄՇԱԿՈՒՄ ՈՒ ՆՐԱՆՑ ՆԱՏԿՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ ՈՒՍՈՒՄՆԱՍԻՐՈՒՄ
Ա. Ե. ԱՂԱՋԱՆՅԱՆ, Գ. Ժ. ՀՈՎՀԱՆՆԻՍՅԱՆ, Կ. Ի. ԵՂՅԱՆ և Ս. Ո. ԱՎԵՏԻՍՅԱՆ**

Սորբցիոն եղանակով ուսումնասիրվել է կաթնաթթվային բակտերիաների կուլտուրայի հեղուկներից (ԿՀ) կենսաարգելակիչ նյութի անջատման և մաքրման գործընթացը և որոշվել գործընթացի իրականացման օպտիմալ ցուցանիշները:

Իոնափոխանակային աշտարակների էյուատներից նպատակային նյութը ուղեկցող խառնուրդներից մաքրման համար կիրառվել է էքստրակցիոն եղանակ:

Ուսումնասիրությունները ցույց տվեցին, որ կենսաարգելակիչ նյութի ակտիվությունը ստացվող նյութում հասնում է մինչև 28000 միավոր/մլ: Այդ պրոցեսի իրականացման համար արդյունավետ էքստրակցիոնները համարվում են ԴՄԳ, ԴԷԿ և ացետոնիտրիլը: Նպատակային նյութի ելքը սուպերնատանտից հաշված լուծույթների վերադարձը տեխնոլոգիական ցիկլ կազմում է ~64%:

ԿՀ-ից կենսաարգելակիչ նյութի անջատման և մաքրման կոմբինացված եղանակի էությունը կայանում է նրանում է, որ իոնափոխանակային եղանակով սուպերնատանտից անջատվում է մասնակի մաքրված հակամանրէային նյութի լուծույթ, որից այնուհետև էքստրակցիոն եղանակով հաջողվում է ստանալ բարձր ակտիվությամբ օժտված կենսաարգելակիչ նյութ:

Մշակվել է ԿՀ-ի սուպերնատանտից սորբցիոն եղանակով մեկանիների անջատման եղանակ կախված կիրառվող սորբենտի կամ խեփի տիպից, լուծույթի pH-ից ու խեփի չափից: Սուպերնատանտից մեկանիների սորբցիայի ու խեփից նրա էյուցիայի բարձր ցուցանիշներ ստացվել են ՄԱ-1p CI-ձևի իոնոսորբենտի կիրառման դեպքում:

Հանվել են մեկանիների էՊՌ սպեկտրները և ցույց է տրվել, որ չզուգավորված էլեկտրոնների կոնցենտրացիան նրանում կազմում է 1018-1019 սպին/գ:

Պարզվել է, որ մեկանիների կառուցվածքում առկա են երկու տիպի պարամագնիտ կենտրոններ, որոնցից մեկը հանդիսանում է լարբի, իսկ մյուսը ստաբիլ:

Ուսումնասիրվել են նաև ջերմաստիճանի ազդեցությունը մեկանիների հատկությունների վրա ու նրա էլեկտրահաղորդականությունը:

DEVELOPMENT OF THE TECHNOLOGY FOR ISOLATION AND PURIFICATION OF BIOINHIBITING PRODUCT AND MELANIN FROM CULTURE LIQUIDS AND STUDY OF THEIR PROPERTIES

**A. E. AGHAJANYAN, G. Zh. HOVHANNISYAN,
K. I. YEGHIYAN and S. V. AVETYSYAN**

Scientific and Production Center “Armibiotechnology” NAS RA
14, Gyurjyan Str., Yerevan, 0056, Armenia
E-mail: aghajanyanarmen@yahoo.com

The process of sorption method for isolation and purification of bio-inhibitory product from culture liquids (CL) of lactic acid bacteria has been studied and optimum parameters of the process have been determined. To purify the target product from related admixtures of exchange columns eluates, the extraction method was used. The experiments showed that the bio-inhibitory activity of the obtained product could be brought to 28000U/ml. It was established that DMK, DEK and acetonitrile were efficient extractants. The yield of the target product from supernatant is ~64 % considering return of the solution to the technological cycle.

The essence of the developed combined method for isolation and purification of a bioinhibiting product from CL is that using ion exchange, a partially purified solution of an antimicrobial product is isolated from the supernatant, which after extraction affords a target product of high bio-inhibitory activity.

A sorption method for the isolation of melanin from the CL supernatant was developed, depending on the type of sorbent or resin used, the pH of the solution, and the size of resin granules. The best results for the sorption of melanin from the

supernatant and elution from the resin were obtained using the weakly basic anionite IA-1p in the CI-form.

The EPR spectra of melanin were taken and it was shown that the number of unpaired electrons in it was 10^{18} - 10^{19} spin/g. It was found that there were two types of paramagnetic centers in the structure of melanin, one of which was labile, and the other was stable.

The effect of temperature exposure on the properties of melanin and its electrical conductivity was also studied.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Simg S.P., Verma I.N. // Biotechnol.Dull., 1987, v.5, №2, p.5.
- [2] Oscariz J.C., Pisabarro A.G. // Int. Microbiol., 2001, №4, p.13.
- [3] Yoneyama H., Katsumata R. // Biosci Biotechnol. Biochem. 2006, v.70 (5), p.1060.
- [4] Kozak W., Bardowski J., Dobranski G. // Lactis. Bull. Acad. Pol. Sci., 1977, v. 25, p.217.
- [5] Chung-Hoi Kim. // Food Sci. Biotechnol., 2000, v. 9, №4, p.270.
- [6] Todorow S., Todorow B., Onno O., Sorokine C. // International Journal of Food Microbiology, 1999, v. 48, p.167.
- [7] Lu R., Fasano S., Madayiputhiya N., Morin N., Nataro J., Fasano A. // J. Pediatr Gastroenterol Nutr., 2009, v. 49, p.23.
- [8] Kyoung-Sik H., Younghoon K., Sae-Hun K., Sejong O. // J. Microbiol. Biotechnol., 2007, v.17, №5, p.774.
- [9] Ogunbanwo S.T., Sanni A.I., Onilude A.A // African Journal of Biotechnology, 2003, v. 2, №8, p.219.
- [10] Мкртчян Э.В. Исследование антагонистического действия некоторых микроорганизмов и свойств антимикробного препарата, полученного на основе штамма *Lactobacillus acidophilus* 1991., дисс. канд. биол. наук., Ереван, НИИ Биотехнологии, 2005, 145 с.
- [11] Карапетян К.Дж. Сравнительное исследование свойств некоторых молочнокислых бактерий и получение антимикробных препаратов на их основе, дисс. канд. биол. наук, Ереван, НИИ Биотехнологии, 2010, 155 с.
- [12] Parente E., Brienza C., Moles M. Ricciardi M. // J. Microbiol Methods., 1995, v. 22, p. 95.
- [13] Tkhruni F., Karapetyan K., Chailyan S. // Russian Journal of Infection and Immunity, 2014, September, special issue, p. 57.
- [14] Հիւսիսյան Ա., Տիրումիր Ֆ., Նաիրաբադյան Շ., Նովիանինյան Գ. // ՄԱՍՍԱԳԻՐ N1723 A2, C12P17/00, 2006:
- [15] Հիւսիսյան Ա., Տիրումիր Ֆ., Նովիանինյան Գ., Եղյան Կ., Վարդանյան Ա., Սարգսյան Ա. // ՄԱՍՍԱԳԻՐ N 2925 A, 2015:
- [16] Saleem F., Ahmad S., Yaqood Z., Rasool A. // Park. J. Pharm. Sci., 2009, v. 22, №3, p. 252.
- [17] Агаджанян А.Е., Тхруни Ф.Н., Оганесян Г.Ж., Егиян К.И., Сагиян А.С. // Биотехнология, 2015, №3, с.32
- [18] Лях С.П. Микробный меланогенез и его функция, М., Наука, 1981, 274 с.
- [19] Prota G. Melanins and Melanogenesis, N.-Y., Acad. Press, 1992, 290 p.
- [20] Барцевская М.И., Васильева С.М. // Вопросы медицинской химии, 1999, №1, с. 3.
- [21] Патент США №5618519, C12P17/14, 1997.
- [22] Патент России №2083214, A61K 35/36, 1997.
- [23] USA Patent Application N20020041905, A1A61K035/78, 2002.
- [24] Патент России N2186105, C2 C12N1/14, 2002.
- [25] Патент Армении N 1385, A2 C12P 17/00, 2003.
- [26] Макаредей Ф.В., Венгер Л.А., Слюсаренко Л.И., Барба И.Н. // Изв. ВУЗ. Химия и химическая технология, 1994, №4-6, с. 3.

- [27] *Агаджанян А.Е.* // Биотехнология, 2006, №1, с.36.
- [28] *Агаджанян А.Е.* // Автореферат диссертации доктора хим. наук по специальности 03.00.14. «Биотехнология», Ереван, 2008.
- [29] *Кукулянская Т.А., Курченко Н.В., Бабицкая В.И.* // Прикл. биохим. и микробиол., 2002, №1, с.68.
- [30] *Aghajanyan A.E., Hambardzumyan A.A., Hovsepyan A.S., Asaturian A.A., Vardanyan A.A., Saghiyan A.S.* // Pigment Cell Res., 2005, v. 18, p.130.
- [31] *Блюменфельд Л.А., Бендерский И.А.* // Журнал структурной химии, 1963, №4, с. 405.
- [32] *Aghajanyan A.E., Asaturian A.A., Hambardzumyan A.A., Sargsyan L.B., Hovsepyan A.S., Vardanyan A.A., Saghiyan A.S.* // Applied Biochemistry and Microbiology, 2011, v. 47, №5, p. 500.
- [33] *Агаджанян А.Е., Оганесян Г.Ж., Егиян К.И., Сагиян А.С.* // Хим. ж. Армении, 2015, т.68, №4, с.532.
- [34] *Aghajanyan A.E., Vardanyan A.A., Hovsepyan A.S., Hambardzumyan A.A., Filpenia V.E.* // J. BioTechnologia, 2017, №4, p.15.
- [35] *Ri Xu, Abdelaziz Gouda, Maria Federica Caso. Melanin:* //ACS Omega 2019 July 31, 4(7), p.12244, Published online 2019 Jul 16, doi 10.1021/ acsomega 9b01039.