

Изобретение относится к пищевой промышленности, преимущественно к технологическим процессам получения ценных продуктов из вторичного растительного сырья, в частности к способу получения меланина.

Известен способ получения суспензии меланина (1), включающий щелочную экстракцию виноградных выжимок, осаждение меланина соляной кислотой, промывку и растворение осадка гидроокисью аммония или натрия. В качестве исходного сырья используют сброженные выжимки, которые перед экстракцией предварительно выдерживают 10...30 часов при pH 7,0...8,0 в водном растворе гидроокиси аммония, затем снова добавляют гидроокись аммония до достижения pH 10...11 и проводят экстракцию в течение 10 часов экстракт отделяют от выжимок фильтрацией через песок и осаждают из него меланин при pH 2 с помощью соляной кислоты. Образовавшуюся суспензию отстаивают 4 часа, надосадочную жидкость удаляют, а образовавшийся осадок трижды промывают водой, причем после каждой промывки суспензию отстаивают вновь 4 часа. Суспензионный осадок растворяют в водном растворе гидроокиси аммония или гидроокиси натрия до получения насыщенного раствора с pH 8...9, после чего проводят повторное осаждение.

Указанный способ обладает следующими недостатками:

- невысокой химической чистотой продукта, поскольку отсутствует стадия высаживания меланина из экстракта, а о чистоте меланина судят не по постоянству значений электронотранспортной активности, а по неизменности величины pH экстракта, которая достигается в присутствии примесных полиэлектролитов;
- использованием высоких концентраций щелочей и минеральных кислот;
- невысокой экологической чистотой.

Известен способ-прототип получения водорастворимого меланина [2], включающий измельчение меланинсодержащего растительного сырья, экстракцию раствором гидроокиси аммония с последующим разделением фаз, промывку меланинсодержащего продукта ацетилсодержащим органическим реагентом, спиртом, ацетоном и сушку промытой массы. В качестве растительного сырья используют выжимки столовой свеклы и экстракции подвергают непосредственно измельченные выжимки раствором гидроксида аммония при pH 8,5... 11,5, температуре 65°C в течение 1 часа и объемном соотношении экстрагента к сырью 5:15. Шрот отделяют фильтрацией, а полученную после экстракции жидкую фазу настаивают на соляной кислоте при pH 3,1...3,6 в течение 4...6 часов при комнатной температуре. Затем надосадочную жидкость декантируют, выпавший осадок центрифугируют и промывают последовательно теплым /~60°C/ раствором уксусной кислоты pH 4,5, ацетоном и этанолом. После окончания промывок препарат высушивают в вакуум-эксикаторе до постоянного веса. В качестве меланинсодержащего продукта используют полученный осадок.

Рассматриваемому способу присущи следующие недостатки:

- низкая химическая чистота меланина, о чем свидетельствует растворимость в воде осадка, полученного после настаивания экстракта на соляной кислоте и используемого в качестве меланинсодержащего продукта;
- использование высоких концентраций гидроксида аммония и соляной кислоты и связанная с этим экологическая загрязненность метода.

В основу настоящего изобретения положена задача путем использования реагентов, обладающих способностью активировать технологические процессы выделения из растительной ткани природных биополимеров, а также приемов, учитывающих специфическую электроионообменную полимерную природу меланинов, создать способ получения меланина из растительного сырья, обеспечивающий высокую экологическую чистоту технологических процессов, химическую чистоту продукта при экономии дефицитных и дорогостоящих реагентов.

Задача решается тем, что предлагаемый способ получения меланина из растительного сырья, включающий подготовку сырья, щелочную экстракцию, осаждение минеральными кислотами, промывку, сушку, согласно изобретению, экстракцию осуществляют 0,25-0,125%-ным раствором гидроксида аммония в католите электроактивированной воды, а осаждение - 0,150-0,700%-ным раствором соляной кислоты в анолите электроактивированной воды, после чего растворяют полученный осадок в растворе гидроксида аммония в католите, из которого производят дробное осаждение высаливающими органическими растворителями, затем выделяют и промывают полученный продукт до достижения им постоянного значения электронотранспортной активности.

Благодаря заявляемому изобретению резко возрастает экологическая чистота способа получения меланина, поскольку в 10...100 раз снижается расход дефицитных и дорогостоящих оснований и кислот, а в сточные воды отработанный растворитель поступает практически в виде чистой воды или близкой к таковой и легко может быть регенерирован. Легко может быть регенерирован на повсеместно используемых в пищевой технологии установках и другой применяемой в способе растворитель - этиловый спирт.

Заявляемое изобретение обеспечивает практически полную очистку меланина от таких наиболее трудноотделяемых биополимеров как меланоидины, щелочерастворимые фенольные вещества, белки, пектины, гемицеллюлозы и другие полисахариды: их содержание в готовом продукте не превышает 1...2%, что способствует повышению воспроизводимости свойств препарата.

Отличительной особенностью заявляемого изобретения является то, что в нем реализована идея выделения меланина из растительного сырья, базирующаяся на представлении о его структуре как электроионообменном полимере, а не только как ионообменнике как в известных способах. Это достигается следующими операциями:

- выбором экстрагента и осадителя,
- дополнительным введением стадии дробного осаждения меланина из раствора католита высаливающими органическими растворителями,
- выбором аналитической методики контроля и включением ее непосредственно в технологический цикл путем контроля значений электронотранспортной активности.

Использование электроактивированной воды для выделения меланина (католита - в качестве экстрагента, анолита - в качестве осадителя) (базируется на свойстве такой воды - повышенной реакционной способности, связанной с значительно большими окислительно-восстановительными потенциалами анолита и католита, чем исходной воды, что обеспечивает обычно используемые для выделения меланина требуемые значения pH: для

экстракции pH 8...12 (католит) и для осаждения pH 2...4 (анолит). Однако использование электроактивированной воды в чистом виде, т.е. без всяких добавок, не обеспечивает выделения меланина, т.к. при контакте такой воды с меланинодержащим сырьем концентрация водородных ионов начинает резко меняться и значения pH выходят за вышеуказанные пределы (низка буферная емкость). Нами экспериментально установлено, что при добавке не-значительных количеств гидроокиси аммония (0,025...0,125%) в предварительно полученный католит и соляной кислоты (0,150...0,700%) в предварительно полученный анолит обеспечивается необходимая буферная емкость для выделения меланина и величина pH поддерживается на требуемом уровне. При этом большим величинам pH соответствуют меньшие количества добавок. Таким образом, только сочетанное действие окислительно-восстановительных свойств электроактивированной воды и кислотно-основных свойств добавок обеспечивает соответствие "структура-свойство" при получении меланина, оказывая интенсифицирующее и дифференцирующее воздействие при его выделении. Это проявляется в использовании гораздо меньших (в 10...100 раз) концентраций добавленных протолитов ( $\text{NH}_4\text{OH}$ ,  $\text{HCl}$ ) и меньшей загрязненностью целевого продукта компонентами, не обладающими окислительно-восстановительными свойствами, но всегда сопровождающими процесс получения меланина; например, пектином, гемицеллюлозой, полисахаридами, белками. Другим преимуществом выбранных реагентов является то, что при смешивании в равных пропорциях католита и анолита отработанной воды образуется вода, близкая по свойствам к исходной, неактивированной. Такая вода может быть реактивирована либо сброшена в канализацию без всякого ухудшения качества сточных вод.

Известно использование органических растворителей в технологии получения меланина. В частности согласно прототипа [2] спирт и ацетон также использованы для промывки осадка. В указанных способах реализовано лишь одно свойство названных растворителей, а именно: очистка сухого препарата меланина или его осадка от различных примесей, что обусловлено нерастворимостью самого меланина в указанных растворителях. В заявляемом изобретении органические растворители применены на другой технологической стадии и добавляются не к осадку или сухому препарату меланина, а к его щелочному раствору. При этом органические растворители проявляют как известные, так и новые свойства, а именно: осаждают меланин из растворов путем десольватации (дегидратации) его макромолекул за счет собственной сольватации (гидратации) (высаливание). Одновременно с разрушением гидратной оболочки происходит разрушение "мостиковых связей" из молекул воды, препятствующих в дальнейшем образованию истинного раствора меланина. Диффузия низкомолекулярного органического растворителя в сетчатую структуру меланина вытесняет примеси, оставляя их в растворе. Поскольку реакция между раствором меланина и органическими растворителями протекает в гомогенной среде, а не в гетерогенной (как в известных способах), то эффективность очистки от примесей резко возрастает. Проводя высаливание методом дробного осаждения с учетом электронотранспортной активности каждой фракции, добиваются максимально полного отделения меланина от сопутствующих примесей. Таким образом, несомненным достоинством введения данной операции в технологическую схему получения меланина является то, что она в максимальной степени учитывает структуру меланина - электронотранспортную активность, а также наличие у его макромолекул не только заряда; но гидратные оболочки и "мостиковых -  $\text{H}_2\text{O}$  - связей". Это обеспечивает высокую химическую чистоту продукта. В качестве высаливающих органических растворителей можно использовать различные органические водоотнимающие реагенты: метиловый спирт, этиловый спирт, ацетон и др. Поскольку меланин (в зависимости от формы) растворим лишь в воде или водных растворах щелочей, то температура кипения растворителя должна быть ниже температуры кипения воды, чтобы при сушке меланина используемый растворитель мог быть полностью и легко удален. Поэтому предпочтительно использование низкокипящих, экологически менее опасных и относительно менее дорогостоящих органических растворителей, таких как, например, этиловый спирт.

Меланин, как известно, является полимером с неуставленной молекулярной структурой, что обуславливает значительные трудности при разработке способов его получения и создает предпосылки для произвольных суждений его чистоте. Решением указанной проблемы является по возможности максимальный учет известных физико-химических свойств меланина, вытекающих из его электронообменной природы. Однако все известные методы получения меланина базируются лишь на учете его полиэлектролитных свойств, пренебрегая электронообменными. Такой подход заведомо не обеспечивает очистки меланина от близких по свойствам полиэлектролитов, не обладающих электронообменными свойствами, но всегда присутствующих с меланинами в растительном сырье: белки, гемицеллюлозы, пектины, и др. полисахариды, меланоидины. Очистка выделенного с указанными примесями меланина на завершающей стадии его получения путем промывки осадка органическими растворителями не приводит к существенному повышению химической чистоты продукта, так как примеси связаны с меланином прочными хемоадсорбционными и ковалентными связями. Лишь повторное, а возможно и многократное повторение операций "экстракция - осаждение" при контроле электронотранспортной активности продукта в сочетании с операцией промывки также при контроле электронотранспортной активности позволяет в максимальной степени очистить меланин. Отличительной особенностью заявляемого изобретения является то, что оно, учитывая полиэлектролитные свойства меланина, дополнительно учитывает и его электронотранспортные свойства. Электронотранспортные свойства меланина являются лимитирующими, т.к. в отличие от полиэлектролитных свойств не присущи вышеуказанным соединениям.

Если меланин содержит примеси, то его электронотранспортная активность будет зависеть от их содержания и возрастать по мере их уменьшения. В то же время электронотранспортная активность химически чистого меланина будет постоянной величиной. Поэтому постоянство значений электронотранспортной активности того или иного меланина из растительного сырья при одних и тех же условиях является важнейшим критерием его чистоты. Для оценки электронотранспортной активности меланина целесообразно использовать систему и методику специфичную для этого класса природных соединений: никотинамидадениндинуклеотид восстановленный (НАДН) - ферроцианид калия ( $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ ) в фосфатном буфере.

К достоинствам этой модели, помимо его специфичности, следует отнести и возможность проведения

измерений как с суспензией, так и раствором меланина, т.е. как с нерастворимой Н-формой меланина, выделяемой после кислотного осаждения, так и с водорастворимой Na - или NH<sub>4</sub>-формой.

Таким образом, использование незначительных концентраций растворов протолитов в электроактивированной воде для экстракции и осаждения меланина в сочетании с дробным осаждением продукта высаливающими органическими растворителями с постоянным контролем значений электронотранспортной активности позволяет создать экологичный способ получения очищенного меланина при экономии дорогостоящих и дефицитных реагентов.

Предложенный способ осуществляется следующим образом.

Исходное меланинсодержащее растительное сырье - лузгу и семян подсолнечника, жом сахарной свеклы, выжимки или кожицу винограда и т.п. - подвергают экстракции 0,025...0,125%-ным раствором гидроксида аммония в католите электроактивированной воды при pH 8...12 и гидромодуле от 1:1 до 1:1,5 в зависимости от вида сырья и содержания в нем меланина. После отделения экстракта от проэкстрагированного сырья экстракт подвергают осаждению путем введения 0,15...0,700%-ного раствора соляной кислоты в анолите электроактивированной воды при pH 2...4. Промытый и высушенный осадок перерастворяют в исходном растворе гидроксида аммония в католите, после чего проводят дробное осаждение путем введения высаливающих органических растворителей, например, этилового спирта. Для каждой фракции осадка определяют значение электронотранспортной активности. Фракции, не обладающие электронотранспортной активностью, не используют, т.к. они являются примесями. Фракции, обладающие промежуточными значениями электронотранспортной активности, доводят до достижения ими максимального значения. Для этого указанные фракции подвергают повторному циклу: экстракция гидроксидом аммония в католите, осаждение соляной кислоты в анолите, растворение в растворе гидроксида аммония в католите, дробное осаждение органическими высаливающими реагентами. Полученный препарат промывают спиртом или другими органическими растворителями до достижения постоянного значения электронотранспортной активности. Затем меланин высушивают.

Католит и анолит электроактивированной воды получают одним из известных методов, например, таким как изложен в работе (3). Концентрации гидроксида аммония в католите и соляной кислоты в анолите подобраны таким образом, чтобы обеспечить необходимую буферную емкость в процессе экстракции и осаждения. Экспериментально установлено, что превышение верхнего предела добавок гидроксида аммония или соляной кислоты не улучшает качеств реагентов, а ведет лишь к ненужному перерасходу указанных компонентов и загрязнению окружающей среды. Использование же добавок в концентрациях ниже минимальных значений указанных пределов не обеспечивает требуемой буферной емкости.

Величину электронотранспортной активности меланина определяли по методике, изложенной в (4). Для этого препараты меланина (0,25 мг) в фосфатном буфере (pH 7,2) вносили в систему никотинамидадениндинуклеотид восстановленный ( $0,72 \cdot 10^{-4}$  моль/л) - феррицианид калия ( $3,65 \cdot 10^{-4}$  моль/л), суммарный объем которой составлял 10 мл, и определяли скорость переноса электрона за 5 мин по сравнению с контролем, т.е. без меланина, по изменению концентраций НАДН и K<sub>3</sub>FeCN<sub>6</sub> в области 340 нм и 420 нм, соответственно. Электронотранспортная активность контроля принята за единицу. Результаты приведены в примерах.

Пример 1. Получение водорастворимого меланина из лузги семян подсолнечника.

200 г подсолнечниковой лузги заливают 2 л 0,05%-ного раствора гидроксида аммония в католите электроактивированной воды, имеющей pH по католилу 11,68, и экстрагируют при перемешивании в течение 3 часов. Образовавшуюся суспензию отстаивают, а затем фильтруют. Полученный фильтрат центрифугируют в течение 10 мин при 2500 об/мин, после чего осаждают 0,20% раствором соляной кислоты в анолите электроактивированной воды, имеющей pH=3,2 по анолилу. Затем суспензию отстаивают, надосадочную жидкость удаляют, а образовавшийся осадок промывают дистиллированной водой до достижения нейтральной среды.

Выделенный и промытый осадок снова растворяют в 0,05%-ном растворе гидроксида аммония в католите. Полученный раствор центрифугируют, а надосадочную жидкость подвергают дробному осаждению путем прибавления этилового спирта. Собирают осадки, образовавшиеся при разном соотношении "объем этилового спирта: объем надосадочной жидкости". Их оказалось три: 3:1, 6:1, 9:1. После промывки спиртом до нейтральной среды и высушивания определяют электронотранспортную активность каждого осадка. Результаты оказались следующими: 1,0 - для осадка 3:1, 4,8 - для осадка 6:1, 12,9 - для осадка 9:1. Первый осадок, не обладающий электронотранспортной активностью, отбрасывают, третий - оставляют, а второй - подвергают повторному циклу "экстракция гидроксидом аммония в католите - осаждение соляной кислоты в анолите - растворение в растворе гидроксида аммония в католите - дробное осаждение этиловым спиртом". Результаты после повторного цикла: два осадка при 5:1 и 10:1. их Электронотранспортная активность, соответственно, 1,05 и 12,9. Первый осадок отбрасывают, а второй объединяют с третьим осадком из первого цикла. Объединенные осадки вновь промывают спиртом пока не убеждаются, что величина электронотранспортной активности не меняется и достигает постоянного значения: 13,0. После чего осадок высушивают.

Выделенный таким образом меланин из лузги подсолнечника имеет растворимость в воде 20%, выход 1,8 г (0,9%), зольность 0,001%. содержание пектина 1,1%, белка 0,3%.

Пример 2. Получение нерастворимой, Н-формы, меланина из лузги семян подсолнечника.

Осуществляют способ аналогично примеру 1, но объединенные осадки, выделенные дробным осаждением этиловым спиртом, растворяют в аммиачном растворе католита, в который при перемешивании добавляют солянокислый раствор анолита с pH 2. Образовавшуюся суспензию отстаивают, после этого надосадочную жидкость удаляют и получают 1,7 г нерастворимой Н-формы меланина. Продукт нерастворим в обычных органических растворителях и воде.

Пример 3. Получение водорастворимого меланина из жома сахарной свеклы.

Осуществляют способ аналогично примеру 1, используя в качестве экстрагента 0,85%-ный раствор

гидроксида аммония в католите с pH 10, а в качестве осадителя 0,20%-ный раствор соляной кислоты в анолите с pH 3,3. Выход: 1,1%, растворимость: 17%, содержание пектина 0,7%, меланоидинов 0,6%, зольность 0,001%.

Пример 4. Получение водорастворимого меланина из кожицы виноградных выжимок.

Осуществляют способ аналогично примеру 1, используя в качестве экстрагента 0,06%-ный раствор гидроксида аммония в католите с pH 11, а в качестве осадителя 0,35%-ный раствор соляной кислоты в анолите с pH 2,5. Количество циклов: 1. Выход 1,7%, электронотранспортная активность 12, растворимость 20%. содержание пектина менее 0,1%, зольность 0,002%.

Пример 5. Получение нерастворимой. Н-формы, меланина из виноградных выжимок.

Осуществляют способ аналогично примеру 2, используя в качестве экстракта 0,1 %-ный раствор гидроксида аммония в католите, а в качестве осадителя 0,5%-ный раствор соляной кислоты в анолите. Выход: 0,85%. Продукт не растворим в обычных органических растворителях и воде.

Предлагаемый способ получения меланина из растительного сырья, предусматривающий использование экологически чистой технологии и обеспечивающий высокую воспроизводимость свойств препарата, найдет широкое применение в пищевой промышленности, фармакологии, парфюмерной и гидрометаллургической промышленности и сельском хозяйстве.

Создана опытная линия.