



**United  
Financial  
Group**

2022



### **Разработка технологии производства «Алгинар».**

**Сентябрь 2020 (начало работ)**

Характеристика природного штамма 365 *Nadsoniellanigra var. hesuelica*.

Природный штамм 365, характеризующийся угольно-чёрной пигментацией, был выделен Е.Л. Рубан в 1957 г. из образца, взятого И.П. Рубаном на антарктическом острове Хесуэлл во время 2-й Антарктической экспедиции (1956 – 1957 гг.).

Чёрный пигмент (меланин) антарктических чёрных дрожжей *Nadsoniellanigra var. hesuelica*. Его значимость для фармацевтики отмечена в материалах Университета ООН, Токио при обсуждении Международной программы по поиску и практическому применению биологически активных веществ, синтезируемых антарктическими организмами, в частности, микроорганизмами.

Штамм 365 был подробно описан и получил имя *Nadsoniellanigra var. hesuelica*, по названию того острова, где был найден. В ноябре 1969 г. аспирантская работа с мелано пигментом *Nadsoniellanigra var. hesuelica* 365, антарктических черных дрожжей, была закончена. Ее результаты представлены в диссертации С.П. Лях «Мелано пигмент антарктических черных дрожжей *Nadsoniellanigra var. hesuelica* и его физиологическая функция» (Москва, 1970, 578 с.), в 17 публикациях по теме и в вышедшей в 1972 г. монографии С.П. Лях и Е.Л. Рубан «Микробные меланины», М., Наука. Публикация двух последующих монографий, имеющих непосредственное отношение к меланино-антарктической тематике (С.П. Лях «Адаптация микроорганизмов к низким температурам», 1976, М., Наука и С.П. Лях «Микробный меланиногенез и его функции», 1982, М., Наука), обзоры по особенностям микрофлоры Антарктиды и экспериментальных статей по той же тематике являются результатом почти 15-летней работы.

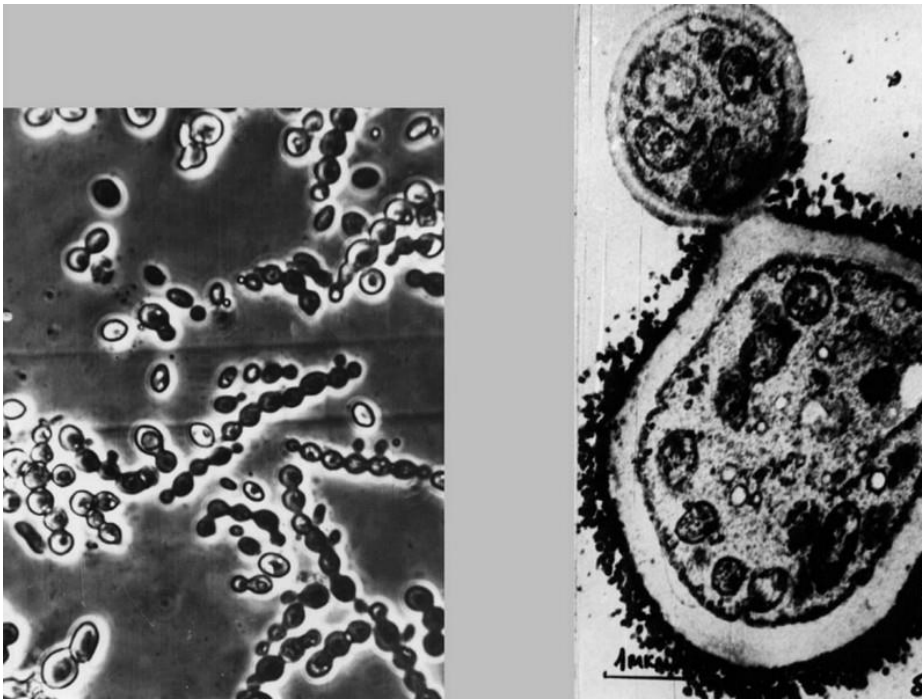


Рис. 1. Световая микроскопия культуры клеток штамма *Nadsoniella nigra* var. *hesuelica* 365.

**Декабрь 2020**

Первичное спектрально исследование Астромеланина.

Спектр ЭПР

Из статьи 1969г Рубин, Лях- концентрация парамагнитных центров в пигменте составляет от 0.3 до  $1.6 \cdot 10^{19}$  спин/г (по сути количественная оценка антиоксидантных свойств). В данном образце №3- $1.8 \cdot 10^{14}$  спин/мг- т.е.  $1.8 \cdot 10^{17}$  спин/г, что чуть ниже, чем приведено выше. Для сравнения- образец №2 - энномеланин, выделенный из кожуры винограда в 1986г-опытная партия -порядок концентрации парамагнитных центров примерно совпадает.

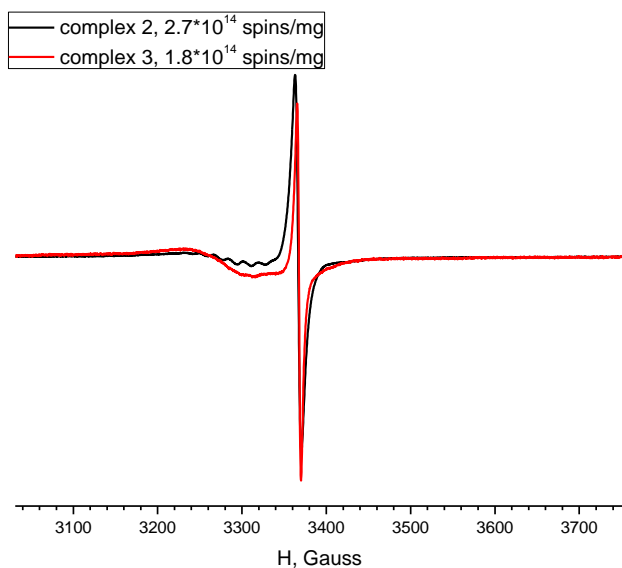


Рис. 2. Спектр ЭПР образцов астромеланина и энномеланина

Анализ спектров ядерно-магнитного резонанса ЯМР показал, что ароматических структур в данном образце довольно мало, что вызывает удивление, т.к. в современной литературе в различных меланинах всегда присутствуют ароматические сопряженные структуры.

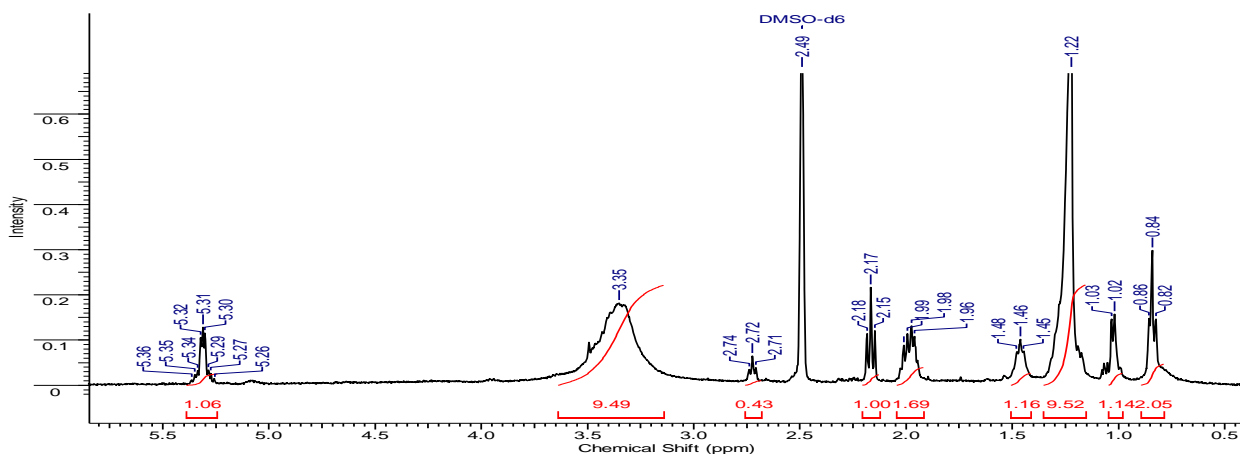


Рис. 3. Спектр ЯМР-1H астромеланина в DMSO-D<sub>6</sub>

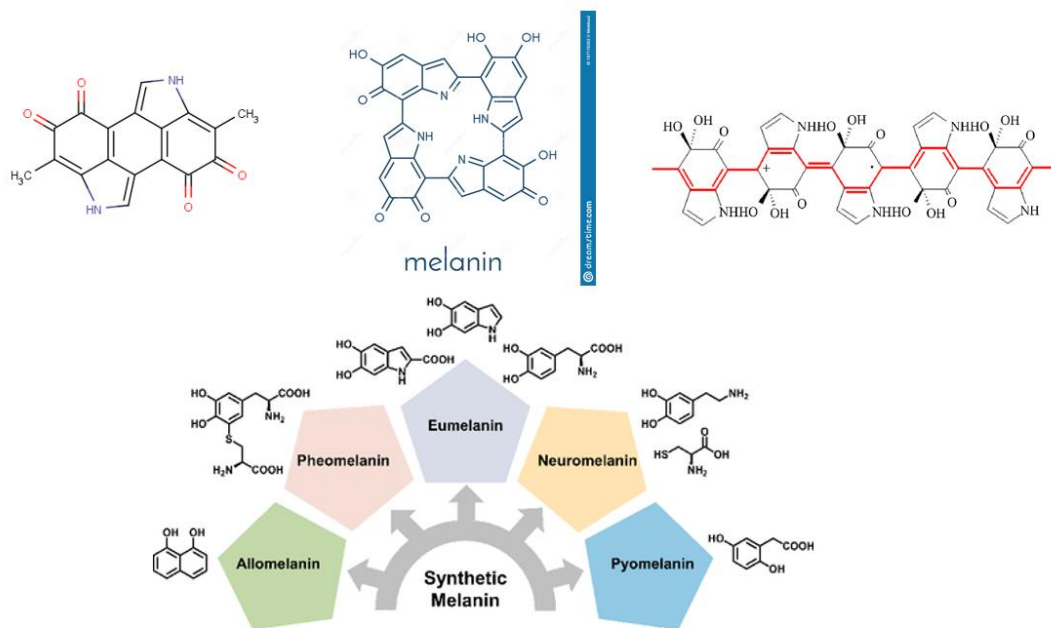


Рис. 4. Предполагаемые структуры различных меланинов

### ИК-спектр

В области  $3600-3100\text{ см}^{-1}$  имеется широкая интенсивная полоса, соответствующая валентным колебаниям ОН групп, связанных меж- и внутримолекулярными водородными связями. Валентные колебания С-Н в метиленовых группах проявляются интенсивным поглощением с максимумами в интервале  $2850-2960\text{ см}^{-1}$ . Полосы поглощения средней интенсивности с пиками в области  $1710-1540\text{ см}^{-1}$  соответствуют валентным колебаниям карбонильных групп (и, возможно, N-H). В области  $1460-1370\text{ см}^{-1}$  наблюдаются полосы скелетных колебаний О-Н групп. Эфирные связи групп =C-O-C (а также C-N) проявляются в области  $1280-1160\text{ см}^{-1}$ . Наблюдается также поглощение средней интенсивности с пиком  $1087\text{ см}^{-1}$ , связанное с участием группы C-O-N в скелетных колебаниях.

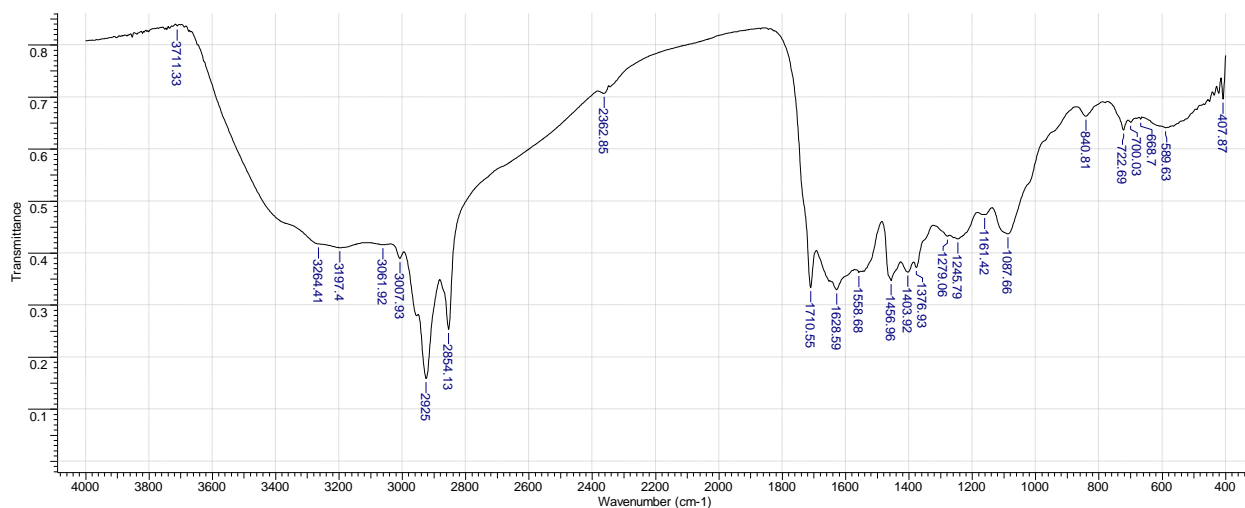


Рис. 5. ИК спектр астралмеланина в таблетке KBr

## Февраль 2021

Ввиду того, что немодифицированный меланин представляет собой нерастворимый в воде полимер и быстрый скрининг образцов для качественной оценки работоспособности меланинов доступных в продаже, а также выделяемых в ходе обработки грибных штаммов фракций затруднителен. Поэтому, образцы продажных меланинов перемешивали в диметилсульфоксиде при комнатной температуре в течение 48 часов, а полученный раствор исследовали с помощью ЭПР. Эксперименты ЭПР проводили при температуре кипения жидкого азота.

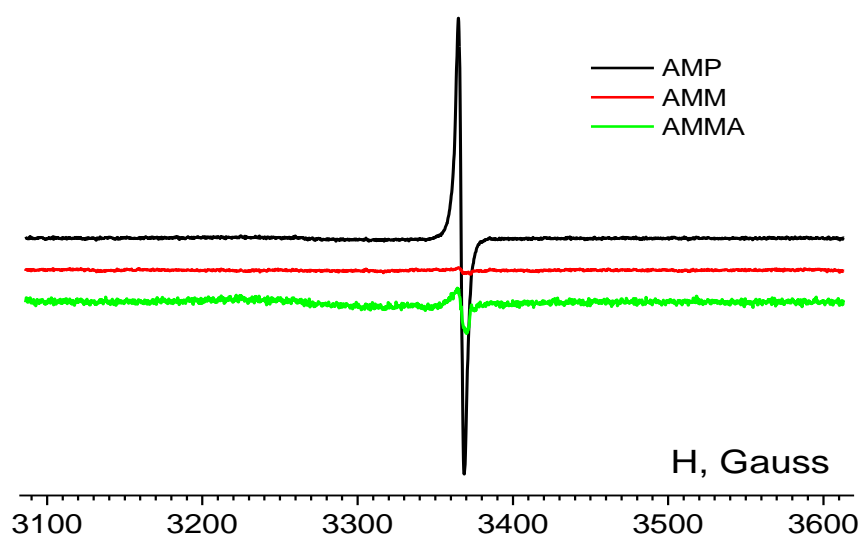


Рис. 6. Сравнение растворенных в ДМСО меланинов

**АМП  $4 \cdot 10^{14}$  spin/mg**

АММ  $1 \cdot 10^{13}$  spin/mg

АММА  $4 \cdot 10^{13}$  spin/mg

Растворимая в диметилсульфоксиде фракция меланина образца №1 оказалась на порядок лучше, чем образец №2. Таким образом, можно прогнозировать, лучшую противораковую активность в меланине АМП.

## Март 2021

Получен штамм антарктических дрожжей *Nadsoniella nigra* var. *hesuelica* и начата практическая работа по выращиванию сырья для производства. Закуплено необходимое для работы оборудование.



## Апрель 2021

Спектральная проверка различных меланинов, имеющих в продаже, выявила их несоответствие заявленным структурам и качеству. Было принято взять под контроль каждый этап производства меланина.

Планируется отработать методику выделения меланина из клеток. Это самое главное, т.к. зачастую, даже при небольшом отклонении от методики, получается продукт загрязненный неактивными и примесями до 80%.

Отрабатывая методику извлечения меланина, каждый этап будет контролироваться спектральными методами до достижения необходимой чистоты продукта.

## Июнь 2021

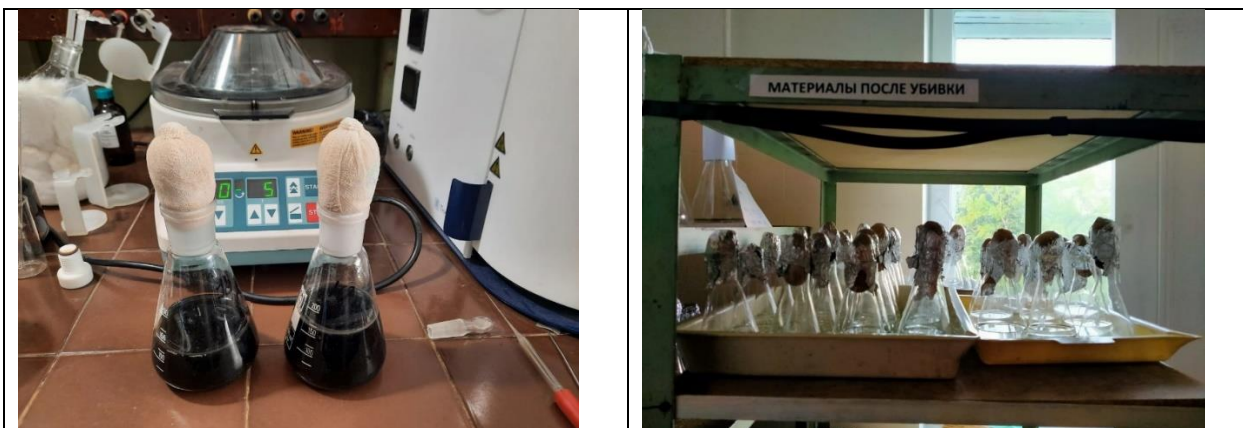


Рис. 7. Первый выращенный штамм *Nadsoniella nigra* var. *hesuelica*



Рис. 8. *Nadsoniella nigra* var. *hesuelica* растущие с разными компонентами питательных субстратов.

Опробовано разведение штамма в жидкой среде на различных водных субстратах. Найден оптимальный субстрат для быстрого и устойчивого роста штамма. Из водных субстратов выделены и подготовлены к извлечению меланина клетки штамма. Подобраны условия содержания лучшего размножения и накопления меланина в штамме на твердой питательной среде.

## Июль 2021

Была подробно изучена литература по способам выделения меланина из различных растений и грибов.

Подобрана и закуплена лабораторная техника для разведения штаммов грибов-продуцентов меланина в необходимых количествах, для варьирования условий оптимального роста и максимального выхода пигмента.

Запущена культивация двух различных штаммов в нормальных условиях.



Рис. 9. Первый масштабный эксперимент по культивированию *Nadsoniella nigra* var. *Hesuelica* в жидкой питательной среде.

Суммарный объем культуры выращенной в условиях лаборатории составил - 20л

## Июль 2021

Произведен выбор методов отделения штамма от культивационной среды. Метод выделения необходимо подобрать с минимальными потерями в мягких условиях, для уменьшения разрушения клеток и вымыванию меланина в раствор.

Это очень важный этап, от результатов которого зависит качество и чистота готового продукта.



Рис.10. Специалист миколог к.б.н. в процессе изучения *Nadsoniella nigra* var. *hesuelica*.

## Октябрь 2021

Самостоятельно выделили первую партию Меланина из собственного сырья черных дрожжей *Nadsoniella Nigra*  
Подобрали нужные параметры для выделения меланина из готовой дрожжевой массы, которую мы выращивали 3 месяца, так как существует несколько способов выделения.



Было проведено ЭПР исследование на определение антиоксидантной активности разных образцов меланина включая наш собственный.

Наш образец показал самую высокую антиоксидантную активность, которая сопоставима с данными из работ Лях С. П.

Было проведено сравнительное исследование осадков и растворов коммерчески доступных меланинов и выделенных по оригинальной методике из штамма *Nadsoniella Nigra* (ВКМ F-2137) методом ЭПР.

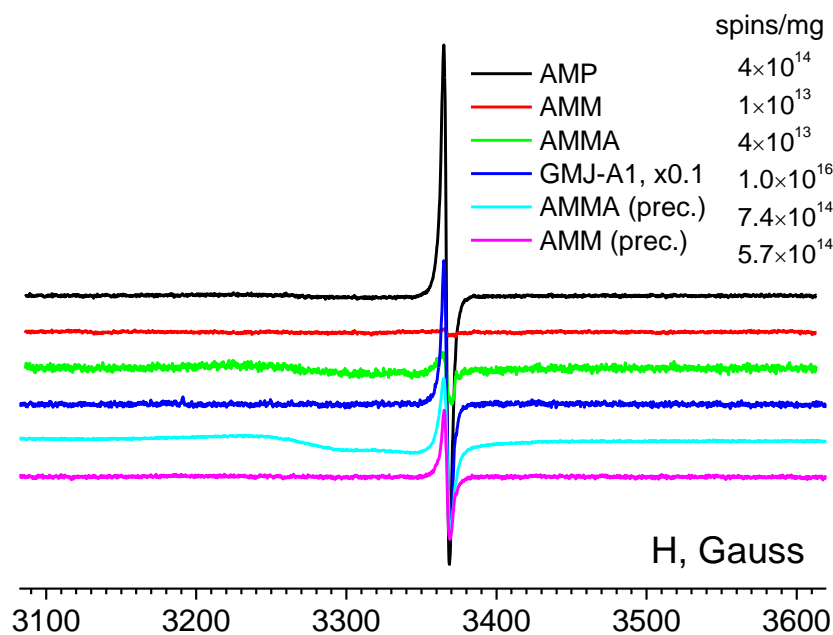


Рис. 11. Исследование ЭПР растворимых и нерастворимых меланинов

Как видно из диаграммы, количество спинов на 1 мг вещества, как минимум на порядок выше в нерастворимых осадках (AMMMA и AMM (prec)) -  $10^{14}$  против  $10^{13}$  spin/mg в растворе ДМСО.

Выделенный, по оригинальной методике меланин GMJ-A1 из штамма грибов *Nadsoniella Nigra* оказался самым активным и содержит в 2 порядка больше радикалов -  $10^{16}$  spin/mg. Для удобства на диаграмме данные для этого меланина умножили на 0.1 чтобы не выйти за рамки графиков. В пересчете на 1 г меланина количество спинов  $10^{19}$ , что вполне достаточно для обеспечения высокой антиоксидантной активности.

## Октябрь 2021

За последние два месяца из культивированных штаммов нами было получено 10л суспензии *Nadsoniella Nigra* и 10 л суспензии *Exorhiala Alcalophila*. Эти штаммы были зарекомендовали себя как хорошие продуценты животного меланина. Путем длительного подбора метода выделения из биомассы соответствующих штаммов было получено 17г сухих клеток *Nadsoniella Nigra* и 32г клеток *Exorhiala Alcalophila*. По разработанной нами оригинальным методикам выделения меланина из сухих клеток было получено 1.5г очищенного первичного меланина (*Nadsoniella Nigra*) и 2,5г меланина из клеток *Exorhiala Alcalophila*.

Также методом ЭПР была подтверждена более чем высокая антиоксидантная активность этих штаммов. ( $10^{*19}$  спин на грамм). Этот показатель является самым высоким на сегодняшний день из всех известных штаммов грибов.

Мы исследовали данные образцы и установили возможную структуру меланинов методом твердофазной ЯМР спектроскопии. Надо отметить, что наши данные коррелируют с литературными источниками. Более того, подготовлены водорастворимые формы меланинов для дальнейших исследований.

## Ноябрь 2021

Отработана технология получения водорастворимой формы меланина.

Проведены испытания еще с одной формой меланина, полученного из дрожжевой структуры.

Проводились исследования по антиоксидантной активности образцов меланина, выделенных различным способом, методом (ЭПР).

Данный тип активности косвенно свидетельствует об онкологической резистенции образцов: чем выше антиоксидантная активность, тем выше токсичность данного соединения по отношению к онкологическим клеткам.

В результате исследования было продемонстрировано, что выделенный нашей группой биохимиков собственный меланин имеет один из самых высоких показателей активности среди других образцов.

В работе находятся несколько видов меланина из разного сырья, включая черный антарктический пигмент.

## **Июнь 2022**

Доработана технология выделения меланина из сырья. На выходе получается на 150% больше готового вещества из того же объема сырья, что снижает себестоимость производства.

## **Сентябрь 2022**

Готовимся к мелкому промышленному производству