



**United
Financial
Group**

2022



Nghiên cứu công nghệ sản xuất "Alginar".

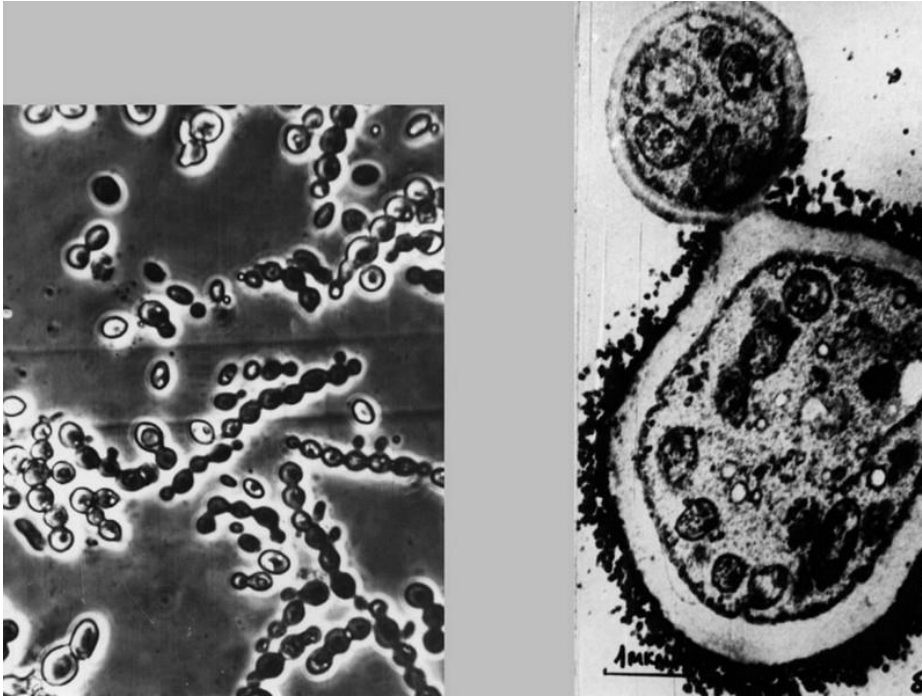
Tháng 9 năm 2020 (bắt đầu dự án)

Đặc điểm của chủng 365 phân lập từ tự nhiên *Nadsoniellanigra var. hesuelica*.

Chủng tự nhiên 365 đặc trưng bởi khả năng sinh tổng hợp sắc tố đen tuyến, chủng này do E.L. Ruban phân lập vào năm 1957 từ một mẫu do I.P. Ruban thu thập tại đảo Heswell - Nam Cực trong Chuyến thám hiểm Nam Cực lần thứ 2 (1956-1957).

Hắc tố (melanin) do nấm men đen Nam Cực *Nadsoniellanigra var. hesuelica* sinh tổng hợp. Ý nghĩa của sắc tố này trong lĩnh vực dược phẩm đã được chứng minh qua các tài liệu của Đại học LHQ, Tokyo, trong Chương trình Quốc tế Tìm kiếm và Ứng dụng các Hoạt chất sinh học do các Sinh vật Nam Cực sinh tổng hợp, đặc biệt là từ vi sinh vật.

Chủng 365 đã được mô tả chi tiết và được đặt tên là *Nadsoniellanigra var. hesuelica* theo tên hòn đảo nơi phân lập chúng. Vào tháng 11 năm 1969, luận án tiến sĩ về sắc tố nhóm melano sinh tổng hợp từ nấm men đen Nam Cực *Nadsoniellanigra var. hesuelica* 365 hoàn thành. Kết quả nghiên cứu có liên quan được trình bày trong luận án của nghiên cứu sinh S.P. Lyakh "Sắc tố melano từ nấm men đen Nam Cực *Nadsoniellanigra var. hesuelica* và chức năng sinh lý của chúng" (Mátxcova, 1970, 578 trang), trong 17 bài báo về chủ đề này và trong sách chuyên khảo của S.P. Lyakh và E.L. Ruban "Melanin từ vi sinh vật", Nhà xuất bản Nauka, Mátxcova năm 1972. Hai sách chuyên khảo tiếp theo liên quan trực tiếp đến chủ đề melanin-Nam Cực được xuất bản sau đó (S.P. Lyakh "Khả năng thích nghi của vi sinh vật với nhiệt độ thấp", 1976, Mátxcova, NXB Nauka và S.P. Lyakh "Quá trình hình thành sắc tố của vi sinh vật và chức năng của chúng", 1982, Mátxcova, NXB Nauka), tổng quan về đặc điểm hệ vi sinh vật Nam Cực và các bài báo mô tả các thí nghiệm về chủ đề này là kết quả của gần 15 năm làm việc.



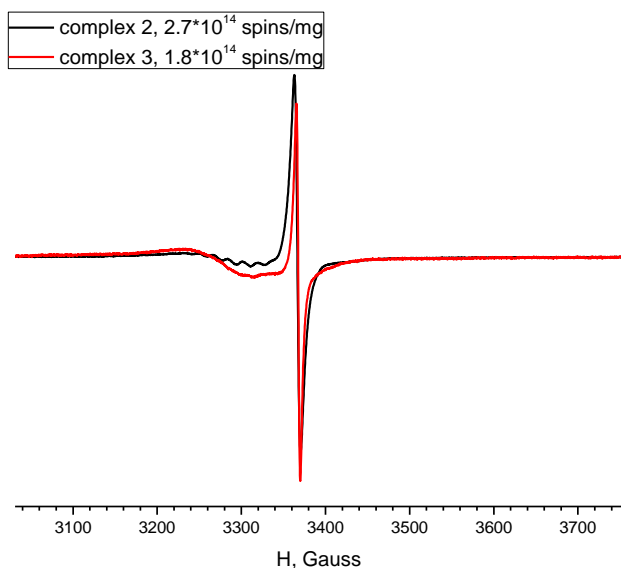
Hình 1. Hình ảnh vi thể tế bào chủng *Nadsoniellanigra var. hesuelica* 365. dưới kính hiển vi quang học.

Tháng 12/2020

Nghiên cứu quang phổ đầu tiên về AstroMelanin.

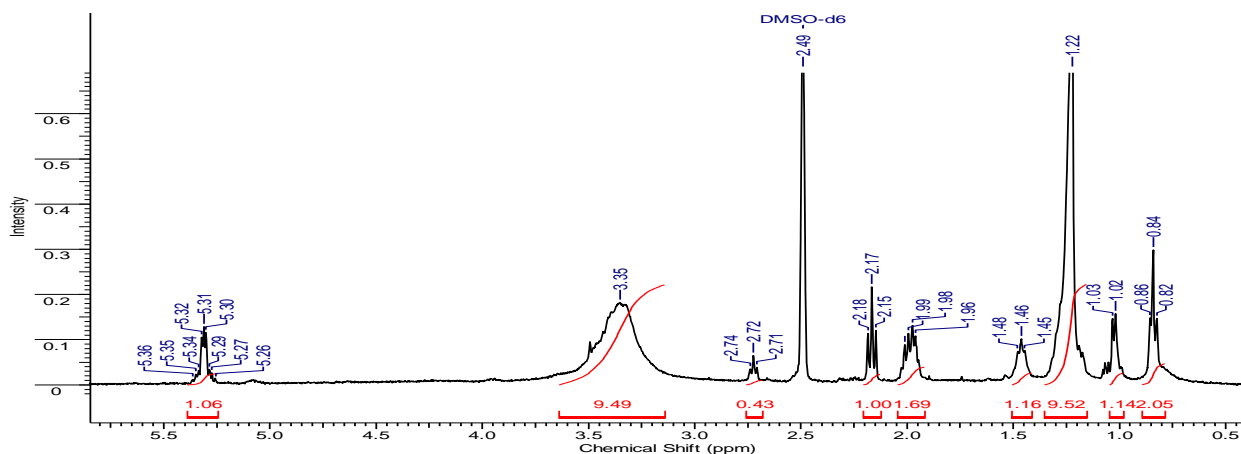
Quang phổ cộng hưởng điện tử (Phổ EPR)

Theo một bài báo viết năm 1969 của Rubin, Lyakh - nồng độ các “tâm thuận từ” trong sắc tố trong ngưỡng từ 0,3 đến $1,6 \cdot 10^{19}$ spin/g (về mặt bản chất, đây là phương pháp đánh giá định lượng hoạt tính chống oxy hóa). Trong mẫu Số 3 - đạt mức $1,8 \cdot 10^{14}$ spin/mg - tức là $1,8 \cdot 10^{17}$ spin/g, thấp hơn một chút so với ở trên. Mẫu số 2 - enomelanin phân lập từ vỏ nho năm 1986 được dùng làm mẫu so sánh, theo đó trật tự nồng độ của các “tâm thuận từ” gần như trùng khớp.

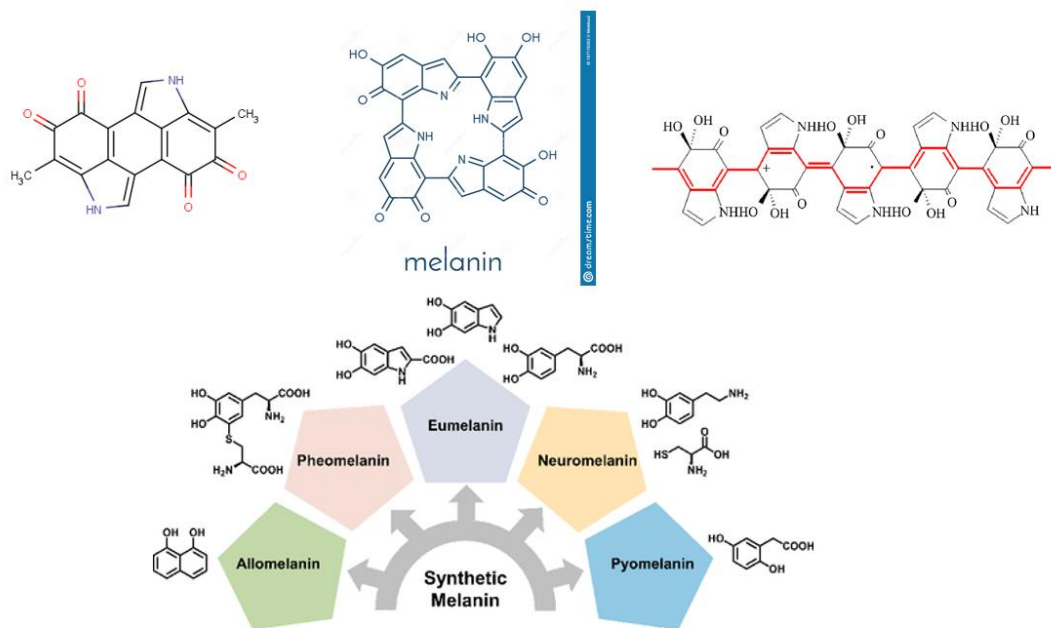


Hình 2. Phổ EPR của các mẫu astromelanin và enomelanin

Phân tích phổ cộng hưởng từ hạt nhân (NMR) cho thấy có rất ít các cấu trúc thơm trong mẫu này, đây là điều khá ngạc nhiên vì trong các tư liệu hiện nay, trong cấu trúc của các loại melanin khác nhau đều có sự hiện diện của các cấu trúc liên hợp thơm.



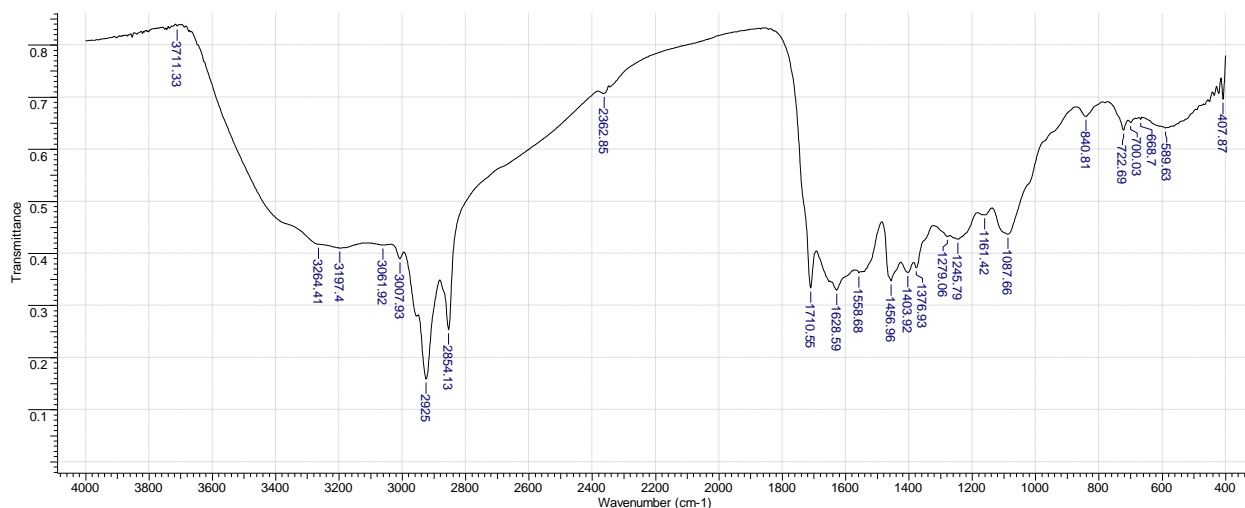
Hình 3. Phổ NMR-1H của astromelanin trong DMSO-D₆



Hình 4. Các cấu trúc gợi ý cho các loại melanin khác nhau

Phổ IR (quang phổ hồng ngoại)

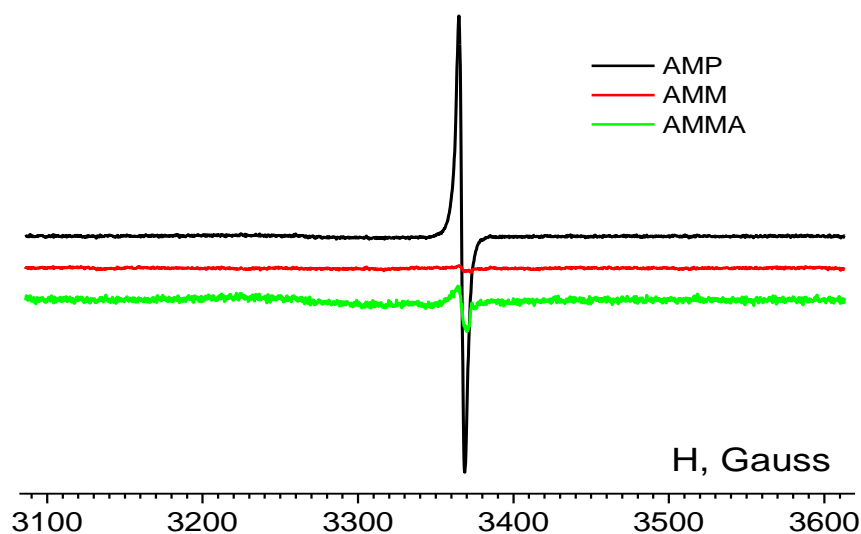
Trong vùng $3600-3100\text{ cm}^{-1}$ có một dải cường độ rộng tương ứng với dao động hóa trị của các nhóm OH được liên kết bởi các liên kết hydro giữa và nội phân tử. Dao động hóa trị C-H trong nhóm metylen được thể hiện qua sự hấp thụ cường độ cao, đạt cực đại trong khoảng $2850-2960\text{ cm}^{-1}$. Các dải hấp thụ cường độ trung bình có đỉnh trong khoảng $1710-1540\text{ cm}^{-1}$ tương ứng với các dao động hóa trị của các nhóm cacbonyl (và có thể cả nhóm N-H). Tại vùng $1460-1370\text{ cm}^{-1}$ quan sát thấy các dải dao động xương của các nhóm O-H. Liên kết ete của các nhóm $=\text{C}-\text{O}-\text{C}$ (cũng như C-N) xuất hiện trong vùng $1280-1160\text{ cm}^{-1}$. Ngoài ra còn quan sát thấy sự hấp thụ cường độ trung bình có đỉnh ở vị trí 1087 cm^{-1} liên quan đến sự tham gia của nhóm C-O-H trong các dao động xương.



Hình 5. Phổ hồng ngoại của viên nén astromelanin chứa muối KBr

Tháng 02/2021

Do Melanin chưa biến tính là một polymer không tan trong nước và khó sàng lọc nhanh các mẫu nhằm đánh giá định tính về hiệu quả hoạt động của các loại melanin có sẵn trên thị trường, và khó sàng lọc nhanh các phân đoạn tách chiết từ các chủng nấm trong quá trình xử lý, nên các mẫu melanin thương mại đã được hòa tan với dimethyl sulfoxide ở nhiệt độ phòng trong vòng 48 giờ, dung dịch thu được sau đó được kiểm tra bằng EPR. Các thí nghiệm EPR được thực hiện ở nhiệt độ sôi của nitơ lỏng.



Hình 6. So sánh các mẫu melanin hòa tan trong DMSO

AMP $4 \cdot 10^{14}$ spin/mg

AMM $1 \cdot 10^{13}$ spin/mg

AMMA $4 \cdot 10^{13}$ spin/mg

Phân đoạn melanin hòa tan trong DMSO của mẫu số 1 có độ lớn tốt hơn nhiều so với mẫu số 2. Như vậy, có thể dự đoán hoạt tính chống ung thư tốt nhất ở dạng melanin AMP.

Tháng 03/2021

Nhận chủng nấm men Nam Cực *Nadsoniella nigra var. hesuelica* và bắt đầu các công việc thực tế nhằm nhân sinh khối tạo nguồn nguyên liệu thô phục vụ sản xuất. Đã mua sắm xong các thiết bị cần thiết cho công việc.

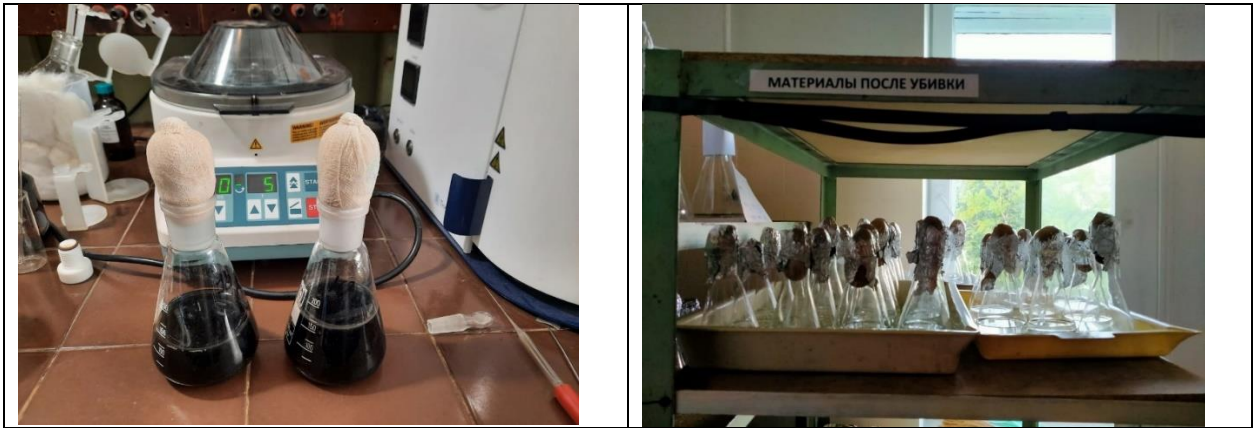
Tháng 04/2021

Các thử nghiệm kiểm tra các loại melanin bán trên thị trường bằng phương pháp quang phổ cho thấy chúng không có cấu trúc và chất lượng đồng nhất như đã công bố. Đã lên kế hoạch kiểm soát chặt chẽ tất cả các công đoạn trong quá trình sản xuất melanin.

Đã lập kế hoạch nghiên cứu phương pháp tách chiết melanin từ tế bào. Đây là vấn đề quan trọng nhất vì chỉ cần một chút sai lệch trong phương pháp cũng có thể dẫn đến việc sản phẩm thu được bị nhiễm các tạp chất không hoạt động lên đến 80%.

Đang nghiên cứu kỹ thuật tách chiết melanin, mỗi giai đoạn sẽ được kiểm soát bằng phương pháp quang phổ cho đến khi sản phẩm đạt độ tinh khiết theo yêu cầu.

Tháng 06/2021



Hình 7. Chủng *Nadsoniella nigra var hesuelica* nuôi cấy lần đầu tiên.



Hình 8. Chủng *Nadsoniella nigra var. hesuelica* phát triển trên các môi trường có cơ chất dinh dưỡng khác nhau.

Đã thử nghiệm nuôi lỏng chủng trong môi trường chứa cơ chất khác nhau. Đã tìm ra cơ chất tối ưu để chủng tăng sinh nhanh chóng và ổn định. Sinh khối từ chủng này đã được tách khỏi môi

trường lỏng và chuẩn bị chiết xuất melanin.

Đã lựa chọn được điều kiện nuôi cấy giúp chủng tăng sinh và tạo melanin tốt nhất trên môi trường dinh dưỡng rắn.

Tháng 07/2021

Đã nghiên cứu sâu các tài liệu về phương pháp phân lập melanin từ thực vật và các loại nấm khác nhau.

Đã chọn lựa và mua sắm các thiết bị phòng thí nghiệm để nhân giống các chủng nấm sản xuất melanin với số lượng cần thiết, thay đổi điều kiện tối ưu nhằm tăng sinh khối và tăng sinh tổng hợp melanin tối đa.

Đã bắt đầu nuôi cấy 02 chủng khác nhau trong điều kiện thường.



Hình 9. Thí nghiệm nuôi cấy lớn hơn lần đầu tiên đối với chủng *Nadsoniella nigra* var. *Hesuelica* trong môi trường lỏng.

Tổng thể tích nuôi cấy trong phòng thí nghiệm – 20 l

Đã tiến hành chọn phương pháp tách sinh khối tế bào khỏi môi trường nuôi cấy. Phương pháp tách sinh khối tế bào phải được thực hiện trong điều kiện không áp lực, sao cho tổn thất là tối thiểu để giảm sự phá hủy tế bào và sự thẩm thấu melanin vào trong dung dịch.

Đây là bước rất quan trọng quyết định chất lượng và độ tinh khiết của thành phẩm.



Hình 10. Tiến sĩ, chuyên gia nấm học đang nghiên cứu *Nadsoniella nigra* var. *hesuelica*.

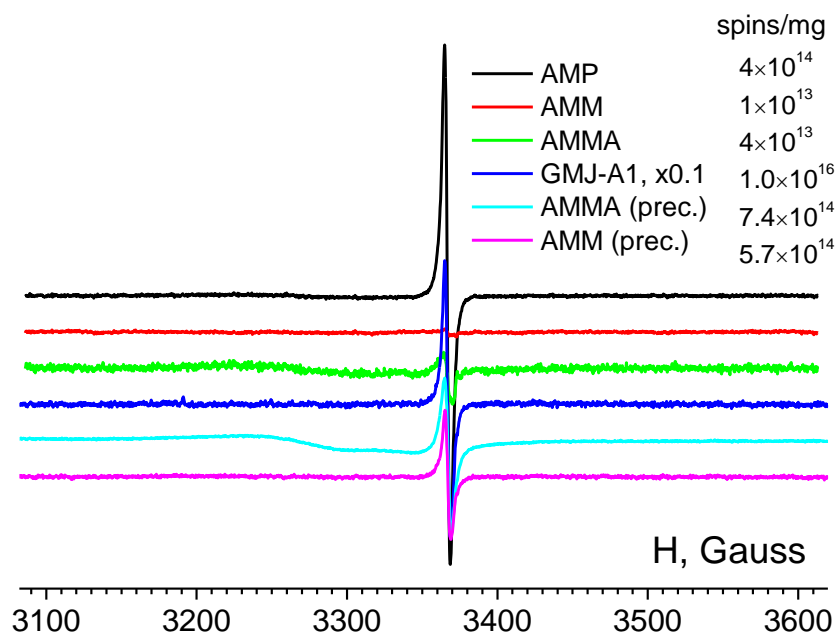
Tháng 10/2021

Đã tự phân lập được lô Melanin đầu tiên từ nguyên liệu nấm men đen *Nadsoniella nigra*. Đã lựa chọn được các thông số cần thiết để tách chiết melanin từ sinh khối nấm men thành phẩm nuôi cấy trong 3 tháng vì có nhiều phương pháp tách chiết khác nhau.

Đã tiến hành nghiên cứu EPR để xác định hoạt tính chống oxy hóa của các mẫu melanin khác nhau, bao gồm cả mẫu melanin của chúng tôi.

Mẫu của chúng tôi cho thấy chúng có hoạt tính chống oxy hóa cao nhất, có thể so sánh với công trình của Lyakh S.P.

Đã tiến hành nghiên cứu so sánh bằng EPR các loại melanin kết tủa và hòa tan bán sẵn trên thị trường cũng như được tách chiết từ chủng *Nadsoniella Nigra* (VKM F-2137) theo phương pháp riêng của chúng tôi.



Hình 11. Nghiên cứu EPR các loại melanin hòa tan và không hòa tan

Từ biểu đồ có thể thấy, số lượng spin trên 1 mg chất cao hơn ít nhất là một bậc trong các loại melanin không hòa tan (AMMMA và AMM (prec) - 10^{14} so với 10^{13} spin/mg trong dung dịch DMSO.

Melanin GMJ-A1 tách chiết theo phương pháp chúng tôi phát triển từ chủng nấm *Nadsoniella Nigra* hóa ra lại là loại có hoạt tính mạnh nhất và có số lượng gốc gấp 2 bậc - 10^{16} spin/mg. Để dễ quan sát, trong biểu đồ, dữ liệu melanin đã phải nhân với 0,1 để không vượt quá biểu đồ. Trong 1g melanin, lượng spin là 10^{19} , khá dồi dào để có hoạt tính chống oxy hóa cao.

Tháng 10/2021

Trong 02 tháng vừa qua, từ các chủng vi sinh được nhân sinh khối, chúng tôi đã thu được 10 lít huyền phù *Nadsoniella Nigra* và 10 lít huyền phù *Exophiala Alcalophila*. Những chủng này chứng minh có khả năng sản xuất tốt melanin động vật. Bằng cách chọn lọc từ từ phương pháp tách chiết sinh khối từ các chủng tương ứng, chúng tôi đã thu được 17g sinh khối tế bào khô *Nadsoniella Nigra* và 32g sinh khối tế bào *Exophiala Alcalophila*. Theo phương pháp phân lập do chúng tôi phát triển, chúng tôi đã tách chiết được melanin từ sinh khối tế bào khô, thu nhận 1,5g melanin tinh khiết ban đầu (*Nadsoniella Nigra*) và 2,5g melanin từ tế bào *Exophiala Alcalophila*.

Hoạt tính chống oxy hóa của các chủng này cao hơn và đã được xác nhận bằng phương pháp EPR (10^{*19} spin/gram). Đây là con số cao nhất từ trước đến nay trong số các chủng nấm được biết đến.

Chúng tôi đã nghiên cứu mẫu và đã thiết lập cấu trúc có thể có của các loại melanin này bằng phương pháp quang phổ NMR pha rắn. Cần lưu ý, dữ liệu của chúng tôi tương quan với các nguồn tài liệu tham khảo. Ngoài ra, chúng tôi đã chuẩn bị các dạng melanin hòa tan trong nước để tiếp tục nghiên cứu sâu hơn.

Tháng 11/2021

Đã phát triển công nghệ thu melanin hòa tan trong nước.

Đã tiến hành các thử nghiệm với một dạng melanin khác cũng có nguồn gốc từ cấu trúc nấm men.

Tiến hành nghiên cứu hoạt tính chống oxy hóa của các melanin được phân lập theo nhiều cách khác nhau bằng phương pháp (EPR).

Hoạt tính này gián tiếp chỉ ra khả năng kháng ung thư của các mẫu: hoạt tính chống oxy hóa càng cao thì độc tính của hợp chất này lên tế bào ung thư càng cao.

Theo kết quả nghiên cứu, melanin được tách chiết bởi nhóm các nhà hóa sinh của chúng tôi có hoạt tính chống oxy hóa cao nhất so với các mẫu khác.

Trong nghiên cứu có sử dụng một số loại melanin được phân lập từ nhiều nguồn khác nhau, kể cả từ sắc tố đen Nam Cực.

Tháng 06/2022

Đã cải tiến công nghệ tách chiết melanin từ nguyên liệu. Thành phẩm tăng 150% so với cùng một lượng nguyên liệu thô, giúp giảm chi phí sản xuất.

Tháng 09/2022

Sẵn sàng cho sản xuất công nghiệp quy mô nhỏ