ՀՏԴ 581.1.039 Քիմիա
582.281

ՄԵԼԱՆԻՆԻ ՍՏԱՑՄԱՆ ՄԱՆՐԷԱԲԱՆԱԿԱՆ ԵՂԱՆԱԿ

Վերա ՀԱՅՐԻՅԱՆ

Բանալի բառեր-Մելանին, պիգմենտ, սպեկտրոսկոպ շտամ, մանրէ, լուծիչ, սինթեզ, ֆերմենտատիվ, հիդրոլիզ, էքստրակտ, ցենտրիֆուգ, ելք, պեպտոնային միջավայր, ներբջջային, օբյեկտ, նստվածք, կուլտուրալ հեղուկ, խեժ, ամոնիակաջուր, հումք, մուտագենեզ, սելեկտիվ միջավայր, մուտանտ, ագաթ, աերոբ, օպտիմալ, խմորում, սախարոզ, պրոտեոլիտիկ, ագլուտինացիա, շիճուկ, պոլիմերներ, ռեագենտ, ռեակտիվ, ուլտրաֆիլտրացիա, վակուում, լիպիդներ, ամինաթթուներ, սելեկցիա, ստրեպտոմիցին, սպոր, ներարտուկներ:

Ключевые слова-Меланин, пигмент, спектральный штамм, микроб, растворитель, синтез, ферментативный гидролиз, экстракт, центрифуга, выход, пептонная среда, внутриклеточный, объект, осадок, культуральная жидкость, жижа, аммиачный раствор, основа, мутагенез, селективная среда, мутант, агат, аэроб, оптимальный, брожение, сахароза, протолектический, агглютинация, вакцина, полимеры, реагент, реактивы, ультрафильтрация, вакуум, липиды, аминокислоты, селекция, стрептомицин, споры, везикула.

Keywords- melanin, pigment, spectroscopic stamp, bacterium, solvent, synthesis, fermentative, hydrolysis, extract, centrifuge, exit, peptone medium, intracellular, object, sediment, culture fluid, resin, Calcium chloride, row material, mutagenesis, selective environment, buffer, mutant, agate, aerobic, optimum, fermentation, sucrose, proteolysis, agglutination, serum, polymer, reagent, reaction, ultra filtration, vacuum, lipids, amino acids, selection, streptokinase, spore, vesicle.

В. Айриян

ПОЛУЧЕНИЕ ВОДОРАСТВОРИМОГО МИКРОБНОГО МЕЛАНИНА И ИЗУЧЕНИЕ НЕКОТОРЫХ ЕГО СВОЙСТВ

Исследован процесс выделения и очистки меланина из ферментационного раствора и разработан эффективный способ получения микробного меланина.

Для установления принадлежности полученного пигмента к меланинам использованы качественные реакции на меланин и спектроскопические методы (УФ, ИК, ЭПР).

Изучено влияние температурного воздействия на парамагнитные свойства меланина и на него растворимость. Показана зависимость концентрации неспаренных электронов в меланине от температуры обработки. Для понимания характера полученных данных использованы методы ИК- спектроскопии и дериватографического анализа.

На основе предложенной технологической схемы можно разработать технологию промышленного производства водорастворимого микробного меланина.

V. Hayriyan

OBTAINING OF WATER SOLUBLE MICROBIAL MELANIN AND STUDY OF ITS SOME PROPERTIES

In this article we reveal the process of isolation and purification of melanin and the effective way of obtaining microbial melanin. To confirm the obtaining of pigment to melanin we used the qualitative reactions and spectroscopic methods for melanin. The thermal influence on the par magmatic properties of melanin and its solubility are studied here. The dependence of the concentration of not coupled electrons in melanin from processing temperature is shown here. To understand the character of the result received we used analytic methods.

On the basis of the offered technological schemes it is possible to develop the technology of industrial production of water-soluble microbial melanin.

Սույն հոդվածում հետազոտված են մելանինի՝ ֆերմենտացիոն լուծույթից անջատման և մաքրման գործընթացը ու մշակված միկրոբային մելանինի ստացման արդյունավետ եղանակները:

Ստացված պիգմենտի (գունանյութ)՝ մելանինին պատկանելությունը հաստատելու համար օգտագործված են մելանինի համար որակական ռեակցիաներ և սպեկտրոսկոպիկ մեթոդներ:

Ուսումնասիրվում է մելանինի պարամագնիսական հատկությունների և նրա լուծելիության վրա ջերմային ազդեցությունը: Ցուցադրվում է մելանինի մեջ չզուգավորված էլեկտրոնների կոնցենտրացիայի կախվածությունը մշակման ջերմաստիճանից:

Ստացված տվյալների բնույթը հասկանալու համար օգտագործված են անալիզի մեթոդներ:

Առաջարկված տեխնոլոգիական սխեմաների հիման վրա կարելի է մշակել ջրում լուծվող մանրէաբանական մելանինի արդյունաբերական արտադրության տեխնոլոգիան:

Ուսումնասիրությունը վերաբերում է կենսատեխնոլոգիայի բնագավառին ու նվիրված է մանրէաբանական եղանակով մելանինի ստացմանը:

Մելանինները օրգանական բնույթի սև կամ մուգ դարչնագույն պիգմենտներ են:

Նրանք բարձրամոլեկուլային հետերոգեն անկանոն պոլիմերներ են, որոնք օրգանիզմում առաջանում են ազոտ պարունակող և առանց ազոտի մոնո և օրթո-դիֆենոլների ֆերմենտատիվ օքսիդացման հետևանքով:

Կենսաբանական հումքից ստացված, ինչպես նաև սինթետիկ մելանինները մեծ հաջողությամբ օգտագործվում են տարբեր տոքսիկոզների և թունավորումների, ճառագայթային ախտահարումների, չարորակ ուռուցքների բուժման ժամանակ, կոսմետիկայում՝ որպես ուլտրամանուշակագույն ճառագայթներից մաշկի և մազերի պաշտպանական միջոց, նաև այլ բնագավառներում [1, էջ 3-10]:

Մանրէներից ստացվող մելանինները ցուցաբերում են նույն հատկությունները, ինչ կենդանական և բուսական ծագում ունեցողները [1, էջ 3-10]:

Հայտնի է մելանինի ստացման եղանակ, ըստ որի մելանինը անջատում են մարդկային մազերից 2-4 M NaOH-ի լուծույթում 12-ից 24 ժամ եռացնելով ու աղաթթվով լուծույթից նստեցնելով: Մելանին պարունակող նստվածքը լվացվում է սպիրտով ու ացետոնով [2, էջ 96]:

Կա նաև մելանինի ստացման արտոնագրված մեկ այլ եղանակ, ըստ որի խոզերին և խոշոր եղջերավոր անասուններին սպանդի ենթարկելուց որոշ ժամանակ առաջ կերակրում են 50-150 մգ/կգ L-թիրոզինով: Սպանդից հետո ստացված մորթիները, մազերի հետ միասին, NaOH-ի լուծույթով 80-90°C ջերմաստիճանում հիդրոլիզում են ու լուծույթը չեզոքացնում աղաթթվով: Մելանին պարունակող նստվածքը անջատվում է, լվացվում օրգանական լուծիչներով ու չորացվում [3, հ. 2083214]:

Մելանինի անջատման մեկ այլ եղանակի համաձայն՝ մելանին պարունակող բջիջները ենթարկվում են ֆերմենտատիվ հիդրոլիզի, որից հետո ստացված էքստրակտը անց է կացվում 1 մկմ չափի անցք ունեցող դիէթիլամինոէթիլ տիպի ցելյուլոզային մեմբրանով: Լիզատի ֆիլտրելուց հետո ֆիլտրը լվացվում է pH -7,8 տրիս - HCL բուֆերով [4, հ. 2734825]: Ըստ հեղինակների (Ա. Վինարով, S. Կուկլյանսկայա, Վ. Բաբիցկայա, Ս. Լյաղ, Ա. Գոլոունին, Ֆ. Մակորդեյ) առաջարկված եղանակները կարելի է օգտագործել բջջում մելանոգենեզի գործընթացին մասնակցող միացությունների հայտնաբերման համար:

Հայտնի է նաև մանրէաբանական սինթեզով մելանինի ստացման չորրորդ եղանակը [5, էջ 96], համաձայն որի մելանինի կենսասինթեզի համար որպես շտամ- արտադրիչ օգտագործվում են Sacharomyes neoformans ցեղին պատկանող սնկեր: Սինթեզվող մելանինը ջրում չի լուծվում և կպչում է բջջի պատին, ու լուծույթ չի արտազատվում:

Կենսազանգվածից մելանինի անջատումը իրականացվում է ուլտրաձայնով կամ հիդրոլիզով, բջիջների քայքայմամբ ու լուծույթը թթվեցնելով՝ մելանինի նստեցմամբ:

Մելանին պարունակող նստվածքը ցենտրիֆուգվում է ու լվացվում: Կենսազանգվածից մելանինի ելքը կազմում է 10%: Նկարագրված եղանակի հիմնական թերությունը անջատման փուլում մելանինի ցածր ելքն է:

Կենսատեխնոլոգիական եղանակով գլյուկոզ-պեպտոնային միջավայրից ջրում չլուծվող մելանինի ստացման նմանատիպ եղանակ է նկարագրված նաև Inonotus obliguus սնկերի մոտ [6, էջ 68-72]:

Ջրում չլուծվող մելանինի ստացման շտամ-արտադրիչ է հայտնաբերված Cladosporium Cladosporioides սնկերի մոտ [7, հ. 1063834Ա] (նախատիպ): Ըստ արտոնագրի՝ 100գ չոր փոշիանման կենսազանգվածի, 530 մլ սառցային քացախաթթվի, 330 մլ կոնցենտրիկ աղաթթվի և 130 մլ ջրի խառնուրդը եռացվում է 4 ժամ: Այնուհետև տաք խառնուրդը ֆիլտրվում է, նստվածքը լվացվում 80% քացախաթթվով ու ջրով և չորացվում 80 °C ջերմաստիճանում:

Ինչպես երևում է բերված թվային տվյալներից, ներկայացվող եղանակով մելանինի ստացման դեպքում ծախսվում է մեծ քանակի թթվային լուծույթ, ինչը կբերի խիտ թթվային և աղային լուծույթների առաջացմանը: Միաժամանակ նշենք, որ ինչպես և վերը նկարագրված մյուս աշխատանքներում, ստացվող մելանինների մաքրության վերաբերյալ որևէ տվյալ չի ներկայացվում:

Մելանինների ստացման նկարագրված հիմնական եղանակները վերաբերում են այսպես կոչված ԴՕՖԱ - մելանիններին, որոնք ունեն ներբջջային տեղակայում և գտնվում են իրենց սինթեզող բջիջների հետ սերտ կառուցվածքային կապի մեջ: Այդ մելանինները ջրում չեն լուծվում: Բջիջներից նրանց անջատման և մաքրման տեխնոլոգիայի հետ կապված դժվարությունները պայմանավորում են դրանց բարձր արժեքը, որը և սահմանափակում է նրանց լայն օգտագործման հնարավորությունները:

Չնայած նրան, որ մասնագիտական գրականության մեջ հայտնի են մելանինների անջատման մի շարք եղանակներ /դրանց մասին խոսվեց վերևում/, սակայն մելանին պարունակող կենսաբանական

օբյեկտների բազմաբնույթ կառուցվածքի պատճառով մելանինների անջատման ստանդարտ եղանակ գոյություն չունի [1, էջ 3-10]:

Պատենտային /արտոնագրված/ գրականության մեջ չկան տեղեկություններ մանրէաբանական սինթեզով ջրում լուծելի մելանինների ստացման վերաբերյալ: Եթե ջրում չլուծվող մելանինների անջատման և մաքրման ժամանակ լուծույթի թթվեցմամբ անջատված մելանինի նստվածքը հիմքում լուծելով հնարավոր է այդ տիպի մելանինները մաքրել ուղեկցող խառնուրդներից, ապա ջրում լուծելի մելանինների դեպքում այդպիսի եղանակով հնարավոր չէ բավարար ելքով խառնուրդներից մաքրված մելանին ստանալ:

Մեր ուսումնասիրության խնդիրն է մանրէաբանական սինթեզի հիման վրա մշակել մելանինի ստացման եղանակ:

Էությունն այն է, որ Bacillus thuringiensis subsp. galleriae մոտ ստացվել է նոր շտամ-արտադրիչ, որն աճեցնելով ածխածին, ազոտ աճի գործոններ, անօրգանական աղեր և ջուր պարունակող սննդարար միջավայրում սինթեզում է ջրում լուծելի մելանին: Կուլտուրալ հեղուկից մելանինի անջատումը իրականացվում է ցենտրիֆուգմամբ կենսազանգվածի հեռացումով ու ֆուգատից pH= 4,5-7,0 տիրույթում-0,63- +0,2 մմ տրամագիծ ունեցող **ИА - Ip C I** - ձևի խեժով մելանինի սորբցմամբ, ջրով խեժի լվացմամբ, ամիակաջրով խեժից մելանինի էլյուցիայով, ուլտրաֆիլտրացիայով, էլյուատի վակուումային շոգիացմամբ ու չորացումով:

Տեխնիկական արդյունքները, որոնք կարող են ստացվել առաջարկվող եղանակի կիրառման դեպքում, կայանում են նրանում, որ ներկայացվող տեխնոլոգիական մոտեցումը հնարավորություն է տալիս մատչելի և էժան ելանյութերից, ոչ բարդ տեխնոլոգիական մոտեցմամբ, կենսատեխնոլոգիական եղանակով ստանալ ուղեկցող խառնուրդներից / լիպիդներ, ամինաթթուներ, ածխաջրատներ, անօրգանական աղեր/ ազատված ջրում լուծելի մելանին:

Մանրէներից ստացվող մելանինների առավելությունն այն է, որ նրանց արտադրությունը, ի տարբերություն կենդանական ծագում ունեցող կամ քիմիական ճանապարհով, թանկարժեք ռեակտիվներից սինթեզվող մելանինների, չի սահմանափակվում սկզբնական(հիմնական) հումքով:

Bacillus thuringiensis subsp. galleriae K1 (BTGK1) շտամը ստացվել է արդյունաբերական BT 69-6 շտամից մուտագենեզի և բազմափուլ սելեկցիայի արդյունքում: Որպես մուտագեն օգտագործվել է N-մեթիլ-3-նիտրո-N-նիտրոզոգուանիդինը (ՆԳ):

Սելեկցիայի առաջին փուլում BT 69-6 շտամի բջիջները մշակվել են ՆԳ-ով (1մգ/մլ, ֆոսֆատ-ցիտրատային բուֆեր; pH 6,0; 30 րոպե) և ցանվել են 500 մկգ/մլ ստրեպտոմիցին պարունակող սելեկտիվ միջավայրի վրա (մսա-պեպտոնային 2% ագար ՄՊԱ): Ընտրվել է ստրեպտոմիցինի նկատմամբ կայուն BT P-21 մուտանտը:

Երկրորդ փուլում BT P-21 շտամը մշակվել է ՆԳ-ով և ցանվել է 500 մկգ/մլ ստրեպտոմիցին պարունակող ՄՊԱ միջավայրի վրա: ՆԳ-ով մշակված P-21 շտամի բջիջները ՄՊԱ միջավայրում աճեցվել են 30°C ջերմության պայմաններում՝ 48 ժամ:

Ստուգվել է 3413 աճած գաղութ, որոնցից 15-ը եղել են մելանին սինթեզող մուտանտներ (0,44%): Վերջիններից միկրոսելեկցիայով ընտրվել է ավելի ակտիվորեն մելանին սինթեզող BTG K1 շտամը:

Այսպիսով՝ առաջարկվող BTGK1 շտամը տարբերվում է հայտնի BT 69-6 շտամից նրանով, որ նա կայուն է ստրեպտոմիցինի բարձր դոզաների նկատմամբ և ընդունակ է ՄՊԱ միջավայրում կուտակել մուգ-դարչնագույն մելանին:

<u>Մորֆոլոգիական հատկանիշներ:</u>

Բջիջները ցուպիկաձև և ուղիղ են՝ 3,0-6,0x0,8-1,3 մկ չափերով, շարժուն են, հանդիպում են կարճ և երկարավուն շղթաների ձևով: Ըստ Գրամի՝ ներկվում են դրական: Առաջացնում են ձվաձև սպորներ և շեղանկյունաձև բյուրեղյա պարասպորալ ներառուկներ՝ էնդոտոքսին:

Մսապեպտոնային ագարի վրա շտամը աճում է՝ առաջացնելով գորշ-սպիտակավուն 2-3մմ տրամագծով կլոր գաղութներ, որոնք աճի երկրորդ օրը շրջապատված են լինում սկզբում՝ կարմրավուն և ապա՝ մուգ դարչնագույն ճաճանչապսակով: 2-ից 3 օր սենյակային ջերմաստիճանում մնալուց հետո ագարով սննդային միջավայրը ամբողջությամբ գունավորվում է մուգ դարչնագույն: Հեղուկ մսապեպտոնային միջավայրում 30°C և աերացիայի պայմաններում (շրջապտույտ ճոճանակ, 220 պտույտ /րոպեում) աճում է՝ առաջացնելով միջավայրի համաչափ պղտորում, իսկ աճի 6-8 ժամերից սկսած՝ միջավայրը ստանում է սկզբում թույլ կարմրավուն, իսկ այնուհետև՝ մուգ դարչնագույն գունավորում:

<u>Ֆիզիոլոգիական հատկանիշներ.</u>

Ֆակուլտատիվ աերոբ է: Աճի օպտիմալ ջերմաստիճանը 28°C -30°C սահմաններում է: Օպտիմալ **pH-ը** 7,2-7,4 է: Սինթեզում է մուգ դարչնագույն մելանին: Մելանինի սինթեզը ավելի արագ և

ինտենսիվ է ընթանում 35°C -ից 37°C սահմաններում և pH-ի 8,0-ից-8,5 սահմաններում: Խմորում է խաղողաշաքարը, օսլան, էսկուլինը, ցելաբիոզը՝ առաջացնելով թթու՝ առանց գազի: Չի խմորում սախարոզը և մաննոզը: Ուրեազ չի առաջացնում: Աճի համար նիկոտինաթթվի կարիք է զգում: Ունի պրոտեոլիտիկ հատկություն: Կայուն է ստրեպտոմիցինի (500մկգ/մլ) նկատմամբ:

Մերոլոգիական հատկություններ.

Տալիս է դրական ագլյուտինացիայի ռեակցիա՝ սպեցիֆիկ H5a-5b շիճուկով:

Քանի որ, ի տարբերություն օրգանական բնույթի շատ միացությունների, մելանինները հանդիսանում են պոլիմերային միացություններ ու իրենց կառուցվածքում չունեն ռեագենտներից գունավորելու ընդունակ յուրահատուկ ֆունկցիոնալ խմբեր, ապա նրանց իդենտիֆիկացման համար օգտագործվում է տեստավորման եղանակ [8, էջ 530-542]: Մեր կողմից ստացված նպատակային նյութը ցուցաբերել է մելանինների վերաբերյալ կիրառվող տեստավորման բոլոր յուրահատուկ ռեակցիաները: Այսպես՝ արծաթի նիտրատի ամիակային լուծույթը վերականգնում է մինչև մետաղականի, ուժեղ օքսիդիչներից ($KMnO_4$,H_2O_2 ,HNO_3) , գունազրկվում է, $FeCL_3$-ի ավելացմամբ լուծույթից նստում է և այլն:

Բացի մելանինի տեստավորման ռեակցիաներից՝ ստուգվել է նաև հավանական ուղեկցող խառնուրդների՝ ամինաթթուների, սպիտակուցների, լիպիդների, ածխաջրատների, անօրգանական աղերի առկայությունը՝ նշված խմբի նյութերի հայտնաբերման համար կիրառվող յուրահատուկ ռեակցիաներով: Անալիզների արդյունքները ցույց են տվել, որ ստացված մելանինի նմուշում վերը նշված ուղեկցող խառնուրդներից միայն սպիտակուց (22,5%) է պարունակվում: Պարզվել է, որ սպիտակուցի մոլեկուլը մելանինի հետ կապված է քիմիական կապով:

Մանրէաբանական եղանակով ստացվող մելանինները կապված են լինում կամ սպիտակուցների, կամ լիպիդների հետ, որի պատճառով էլ նրանք ստացել են պրոտոմելանին կամ լիպոմելանին անունը [6,9]:

Գել-ֆիլտրացման եղանակով որոշվել է ստացված մելանինի միջին մոլեկուլյար կշիռը, որը կազմում է ~ 5730: Անջատված մելանինի իդենտիֆիկացիայի համար օգտագործվել են նաև սպեկտրալ եղանակներ: Այսպես, օրինակ, ուլտրամանուշակագույն սպեկտրոսկոպիայի մեթոդով պարզվել է մելանինի մոլեկուլին յուրահատուկ ֆունկցիոնալ խմբերի (-C=C-,=C=0, -COOH,NH-,-OH) առկայությունը, ինչը հիմնականում համապատասխանում է գրականության մեջ [1,6-9] բերված սպեկտրալ տվյալներին: Քանի որ մելանինի մոլեկուլում կան նաև չզուգավորված էլեկտրոններ, ապա էլեկտրոպարամագնիսական ռեզոնանսի մեթոդով պարզվել է նրա պարամագնիսական հատկությունը ու որոշվել պարամագնիսական կենտրոնների կոնցենտրացիան:

Ուլտրամանուշակագույն և տեսանելի տիրույթում հանվել են մելանինի կլանման սպեկտրները, որոնք իրենց տեսքով նորից նման են գրականության մեջ [7-10] բերված սպեկտրներին:

Մելանինի կոնցենտրացիան ֆերմենտացիոն հեղուկում որոշելու համար ֆուգված հեղուկը նոսրացվել է, ստացված լուծույթի օպտիկական խտությունը չափվել 326 nm ալիքի երկարության տակ ու համեմատվել մաքուր մելանինի լուծույթի օպտիկական խտության հետ: Այդպիսի ալիքի երկարության պայմաններում չափումների դեպքում ֆերմենտացիոն հեղուկում առկա ուղեկցող խառնուրդները գործնականում չեն խանգարում մելանինի որոշմանը:

Մելանինի սորբցիայի համար **ИА – Ip** մակնիշի իոնոսորբենտի օգտագործումը պայմանավորված է նրանով, որ խեժը, ունենալով ռեզորցինի, ֆորմալդեհիդի և մետա-ֆենիլենդիամինի պոլիկոնդենսացիայի հետևանքով ստացված պոլիմերային մատրիցա, մելանին կլանելու բարձր ընտրողականություն է ցուցաբերում, ինչը, ըստ երևույթին, կապված է խեժի մատրիցայի վրա մելանինի յուրահատուկ կլանմամբ:

Խեժի հատիկների տրամագծի մեծության ընտրությունը -0,63- +0,2մմ տիրույթում պայմանավորված է նրանով, որ մելանինի սորբցիան, քանի որ հիմնականում պայմանավորված է ֆիզիկական փոխազդեցություններով, ապա 0,63 մմ-ից բարձր մեծության դեպքում փոքրանում է խեժի տեսակարար մակերեսը, իսկ 0,2-ից փոքր չափը բերում է հատիկների մասնակի տրոհման ու իոնափոխանակային աշտարակի խցանման և հիդրոդինամիկ ռեժիմի խախտման:

Մելանինի սորբցիայի համար **ИА – Ip** խեժի Cl^- -ձևի օգտագործումը պայմանավորված է նրանով, որ այդ ձևում OH^- –ձևի համեմատ խեժի տարողությունը, հանդեպ մելանինի, 1,45 անգամ բարձր է :

Սորբցիայի ժամանակ ֆուգատի **pH-ի** մեծության 4,5-ից մինչև 7,0 տիրույթի ընտրությունը պայմանավորված է նրանով, որ **pH-ի** մեծության 4,5-ից ցածր մարզում տեղի է ունենում լուծույթից մելանինի մասնակի անջատում՝ նստվածքի ձևով, ինչը առաջ է բերում սորբցիոն պրոցեսի հիդրոդինամիկ ռեժիմի խախտում: Լուծույթի **pH-ի** 7,0-ից բարձր տիրույթում մելանինի սորբցիայի

ցուցանիշների նվազում է սկսվում, որը, ըստ երևույթին, պայմանավորված է խեժի ֆունկցիոնալ խմբերի դիսոցման աստիճանի փոքրացմամբ:

Եղանակի իրականացման հնարավորությունը լուսաբանվում է հետևյալ օրինակներով, բայց չի սահմանափակվում դրանցով:

Օրինակ 1. BTGK1 շտամը աճեցնում են մսապեպտոնային ագար պարունակող փորձանոթներում՝ 30°C ջերմաստիճանում, 48 ժամվա ընթացքում: Այնուհետև աճած շտամը մանրէազերծված ֆիզիոլոգիական լուծույթով ողողելով, հեռացվում է ագարի վրայից ու ավելացվում է 500մլ տարողությամբ Էրլենմեյերի կոլբաներ, ուր նախօրոք լցված է 50 մլ ֆերմենտացիոն հեղուկ, որն ունի հետևյալ կազմը՝

KH_2PO_4 -1,0 գ/լ,
K_2HPO_4 - 3,0 գ/լ,
NH_4Cl -0,5 գ/լ,
$NH_4 NO_3$ -0,1 գ/լ,
Na_2SO_4 - 0,1 գ/լ,
$Mg SO_4 x 7H_2O$ - $4x10^{-3}$M,
$CaCl_2 x 6H_2O$ - $4x10^{-4}$M,
$MnCl_2x 4H_2O$ - $4x10^{-3}$M,
գլյուկոզ -0,5%,
L - գլուտամինաթթու- $5x10^{-3}$M,
նատրիումի ցիտրատ – 0,5 գ/լ,
L - թիրոզին - 200 մգ/լ,
նիկոտինաթթու -10մգ/մլ. **pH** 8,0-8,5:

Կոլբաները տեղադրվում են ոլորապտույտ ճոճանակի վրա (220 պտ/րոպ) և աճեցնում են 30-35°C 48 ժամվա ընթացքում:

Մելանինի կոնցենտրացիան ֆերմենտացիոն հեղուկում կազմում է 2,1 գ/լ:

Օրինակ 2. Մելանինի ստացումը նմանատիպ է առաջին օրինակին, միայն այն տարբերությամբ, որ, որպես ֆերմենտացիոն միջավայր, օգտագործվել է մսապեպտոնային արգանակ: Մելանինի կոնցենտրացիան ֆերմենտացիոն հեղուկում կազմում է 4,0 գ/լ:

Օրինակ 3. **BTG K-1** շտամով վարակվում է հետևյալ կազմն ունեցող միջավայրը (զանգվածային %) - ցորենի ալյուր -1,5 և սպիտակուցավիտամինային խտանյութ - 3,0, **pH 7,2-7,4:** Ցանված շտամը աճեցվում է 24 ժամվա ընթացքում՝ 30°C ջերմաստիճանում, աէրացիայի պայմաններում (շրջապտույտ ճոճանակ-220 պտ/րոպ): Ստացված հեղուկ ցանքսանյութով վարակում են 500 մլ-անոց Էրլենմեյերի կոլբաներում ավելացված 50 մլ ֆերմենտացիոն միջավայր, որը ունի հետևյալ կազմը (զանգվածային %) - ցորենի ալյուր -1,5; սպիտակուցավիտամինային խտանյութ - 3,0; NaCl-0,2; $CaCl_2$-0,05; pH 7,5-8,0 (ցանքամիջավայրի ծավալը 10%-ի հաշվարկով): Կոլբաները տեղադրվում են ոլորապտույտ ճոճանակի վրա (220 պտ/րոպ) և աճեցնում 30-35°C 48 ժամվա ընթացքում:

Մելանինի կոնցենտրացիան, ֆերմենտացիոն հեղուկում պրոցեսի ավարտից հետո, կազմում է 5,3 գ/լ: Կոլբաներում տարված կենսասինթեզի հետևանքով ստացված 5,3 գ/լ մելանին պարունակող 9լ ֆերմենտացիոն հեղուկից կենսազանգվածի և այլ կախույթների հեռացման համար զանգվածը ցենտրիֆուգվել է ցենտրիֆուգի ռոտորի 3000պտ/րոպ, արագության ռեժիմով, 20 րոպե տևողությամբ: Արդյունքում ստացվել է 8,4 լ մուգ դարչնագույն ֆուգատ: Մելանինի կոնցենտրացիան ֆուգատում կազմել է 5,0 գ/լ:

Ստացված ֆուգատի pH-ը աղաթթվով հասցվել է մինչև 7,0-ի ու ներքևից վերև ուղղությամբ անց է կացվել Cr- ձևի **ИА-1р** իոնոսորբենտ պարունակող աշտարակով:

Իոնոսորբենտի հատիկների տրամագլխի մեծությունը կազմել է -0,63- +0,2 մմ, իսկ ծավալը՝ 1,8 լ: Ֆուգատի հոսքի ավարտից հետո խեժը լվացվում է այնքան ջրով, մինչև աշտարակից թափվող հեղուկում չոր նյութերի պարունակությունը հասնի 0-ի:

Իոնոսորբենտի վրա կլանված մելանինի դեսորբցիայի համար վերևից ներքև աշտարակով բաց է թողնվել 3,5%-ոց ամիակաջրի լուծույթ: Մելանինով հարուստ ամիակային էլյուատի հավաքելը սկսվել է լուծույթի օպտիկական խտությունը O.Խ > 0,5 (λ= 326nm, D= 1սմ) և մուգ դարչնագույն գունավորումը սկսվելը ու ավարտվել է նույն ցուցանիշների նվազումով:

Հավաքված 4,0լ էլյուատից ամիակի հեռացման համար լուծույթը ենթարկվում է վակուում շոգիացման՝ 55°C ջերմաստիճանում և 0,1մթ մնացորդային ճնշման պայմաններում: Արդյունքում ստացվում է 2,36լ շոգիացված էլյուատ, որտեղ մելանինի կոնցենտրացիան կազմում է 14,9 գ/լ: Միկրոկախույթներից և միկրոֆլորայից ազատվելու համար 1մթ. ճնշման տակ լուծույթը բաց է

թողնվել 0,2 մկմ մեծության անցքերով կապրոնե թաղանթով: Պերմիատը կոնցենտրացվել է մինչև մածուցիկ վիճակի հասնելը (մինչև մելանինի կոնցենտրացիան կազմի 150-170գ/լ): Այնուհետև շոգիացված զանգվածը տեղափոխվում է հախճապակյա թասի մեջ և չորացվում վառարանում՝ տաք օդ փչելով (55-60°C), կամ էքսիկատորում՝ ջուր խլող ագենտների (օրինակ՝ P_2O_5) առկայությամբ: Արդյունքում ստացվում է մետաղական փայլով 30,3 գ մուգ դարչնագույն ամորֆ զանգված:

Անջատման և մաքրման փուլում ֆերմենտացիոն հեղուկից մելանինի ելքը կազմում է 63,5%:

Օրինակ 4. Մելանինի ստացումը նմանատիպ է օրինակ 3-ին՝ միայն այն տարբերությամբ, որ անջատման փուլում սորբցիայի ժամանակ օգտագործվող ֆուգատի **pH** -ը կազմում է 4,5:

Ֆերմենտացիոն հեղուկից անջատման և մաքրման փուլում մելանինի ելքը կազմում է 67,3%:

Սույն աշխատանքի մեջ նկարագրված հետազոտությունը կատարվել է մասամբ ՄԳՏԿ A -683-ի ֆինանսավորման սահմաններում:

Գրականություն

1. Ф. В. Макордей, Л. А. Венгер, Л. И. Слюсаренко, И. Н. Барба, Алломеланины. Методы получения, физико-химические свойства, возможности практического использования. Известия ВУЗ Химия и химическая технология. 1994г., N 4-6, стр. 3-10.
2. Патент России № 2083214, Москва, 1997 г.
3. Патент России № 2040263, Москва, 1997 г.
4. Патент Франции № 2734825, Москва, 1998 г.
5. А. Ю. Винаров, З.Н. Робышева, Т. Е. Сидоренко, Е.Н. Дирина, Биотехнология пигмента меланина. Тезисы докладов 1-ого Международного конгреса биотехнологии, Москва, 2002г. Стр. 96.
6. Т. А. Кукулянская, Н. В. Курченко, В. И. Бабицкая, Физико-химические свойства меланинов, образуемых чагои в природных условиях и при культивировании. Прикладная биохимия и микробиология, Москва, 2000г., т. 38, N 1, стр. 68-72.
7. АС СССР № 1063834 А, Москва, 1983 г.
8. Е. Л. Рубан, С. П. Лях. Исследование природных меланинов. Известия АН СССР, Москва, 1968г., № 4, стр. 530-542.
9. С. П. Лях. Микробный меланогенез и его функции. М. Наука, Москва, 1981г.
10. А. В. Голоунин, Г. Е. Селютин. Влияние химической обработки на парамагнитные свойства меланина. Журнал прикладной Химии, Москва, 1996г., 69, вып. стр. 645-648.

Տեղեկություններ հեղինակի մասին.
Վերա Հայրիյան՝ ԼՂՀ կրթության, գիտության և սպորտի նախարարության կրթության պետական տեսչության պետական տեսուչ, Ստեփանակերտի հ. 5 հիմնական դպրոցի քիմիա և կենսաբանություն առարկաների ուսուցչուհի
E-mail՝ kisraelyan@mail.ru

Հոդվածը տպագրության է երաշխավորել խմբագրական կոլեգիայի անդամ, բ.գ.թ. Ա.Ն.Աբրահամյանը: