

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202393505 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2024.02.06

(22) Дата подачи заявки
2022.05.27

(51) Int. Cl. C12N 1/20 (2006.01)
C12R 1/01 (2006.01)
C12P 1/04 (2006.01)
C12P 17/10 (2006.01)
C12P 17/16 (2006.01)
A61Q 17/04 (2006.01)
C09B 61/00 (2006.01)
C07D 209/70 (2006.01)

(54) СПОСОБ ВЫДЕЛЕНИЯ И КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ШТАММОВ, ШТАММЫ, ИХ ПРИМЕНЕНИЕ, СРЕДЫ ДЛЯ ИХ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ И ФОРМА СЦИТОНЕМИНА

(31) P.437991

(32) 2021.05.28

(33) PL

(86) PCT/PL2022/050034

(87) WO 2022/250557 2022.12.01

(71) Заявитель:
ЮБЕРА СА (PL)

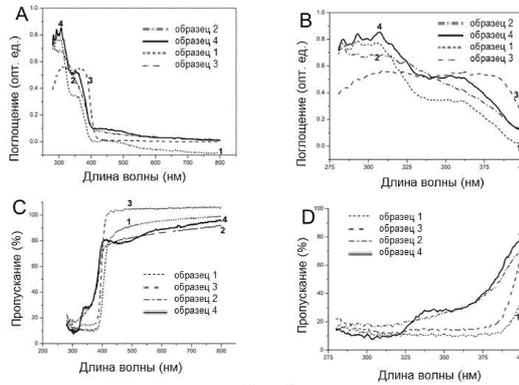
(72) Изобретатель:

Кициак Адам, Джандер Магдалена
(PL)

(74) Представитель:

Гизатуллина Е.М., Христофоров
А.А., Угрюмов В.М., Тихонина О.В.,
Строкова О.В., Костюшенкова М.Ю.,
Гизатуллин Ш.Ф., Джержакян Р.В.
(RU)

(57) Объектом изобретения является способ выделения и культивирования штаммов, штаммы, их применение, среды для их культивирования и форма сцитонемина.



A1

202393505

202393505

A1

СПОСОБ ВЫДЕЛЕНИЯ И КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ШТАММОВ, ШТАММЫ, ИХ ПРИМЕНЕНИЕ, СРЕДЫ ДЛЯ ИХ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ И ФОРМА СЦИТОНЕМИНА

ОПИСАНИЕ

Область техники, к которой относится изобретение

Объектом изобретения является способ выделения и культивирования штаммов, штаммы, их применение, среды для их культивирования и форма сцитонемина. Изобретение применимо в биотехнологической и косметической промышленности.

Предшествующий уровень техники настоящего изобретения

Известны стандартные методы выделения и культивирования (согласно Ripka et al., 1979; Anahas and Muralitharan, 2015; Singh et al., 2014), которые включают сбор биологического материала из эндолитического микроокружения, например из пор в камне, либо непосредственно в культуральную среду (BG11) (согласно Singh et al., 2014), или же помещение выделенного биологического материала на чашки с 2% агаром и питательной средой BG11 для селекции моноклональных *Cyanobacterium* (согласно Wolk, 1998) с последующим переносом колоний непосредственно в жидкую среду BG11 (согласно Anahas & Muralitharan, 2015, 2015). Прямой сбор биологического материала в жидкую среду BG11 во многих случаях может оказаться неприменимым, поскольку требуется дополнительная очистка и выделение моноклональных бактериальных штаммов. Метод культивирования и очистки, о котором сообщали Anahas и Muralitharan (2015), на чашках с агаром и BG11 (согласно Wolk, 1998), не дает ожидаемых результатов, поскольку колонии *Cyanobacteria*, собранные из чрезвычайно засушливых сред, размножаются крайне медленно или вообще не размножаются. Поэтому желательно разработать способ культивирования, который позволил бы легко размножать выделенные из окружающей среды различные штаммы *Cyanobacteria*, культивирование которых в лабораторных условиях с использованием известных в данной области техники методов невозможно или по меньшей мере их трудно осуществить. Ожидается, что применение такого способа позволит в результате выделить новые штаммы *Cyanobacteria*, обладающие уникальными благоприятными свойствами, в частности, высокой продуктивностью пигментов, а также являющимися природными фильтрами ультрафиолетового (УФ) излучения. Настоящее изобретение позволило решить вышеупомянутые проблемы.

Краткое раскрытие настоящего изобретения

Первым объектом изобретения является способ выделения и культивирования штаммов *Cyanobacteria*, в частности штаммов, депонированных в Banco Espanol de Algas Universidad de Las Palmas de GC под номером BEA_IDA_0068B или под номером BEA_IDA_0075B, где способ предусматривает:

а) приготовление питательной среды для роста бактерий путем обогащения ее микро- и макроэлементами, обнаруженными в природном песчанике нубийских формаций со следующим составом, выраженным в массовых процентах: 97,6% кварца, 0,4% мусковита-биотита, 1,2% апатита и 0,8% других минералов, присутствующих в следовых количествах, в количестве 200 г на 1000 мл раствора водной среды следующего состава, из расчета на 1000 мл среды: 1,5 г NaNO_3 , 0,04 г K_2HPO_4 , 0,075 г $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 0,036 г $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$, 6,0 мг лимонной кислоты, 6,0 мг железо-аммонийный цитрата, 1 мг ЭДТА, 0,02 г Na_2CO_3 , 1 мл смеси микроэлементов А5 следующего состава, из расчета на 1000 мл водного раствора смеси А5: 2,86 г H_3BO_3 , 1,81 г $\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$, 0,222 г $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 0,39 г $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$, 0,079 г $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$, 49,4 мг $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$, с последующим перемешиванием полученной суспензии в течение 24 часов при 25°C и последующим 5-часовым отстаиванием при 25°C и ее фильтрованием. При этом, всякий раз, когда используются выражения «чистая среда BG11», или «среда BG11 без агара», или «среда BG11», или «среда в соответствии с Rippka et al. (1979)», или «среда согласно Таблице 1», или «среда, состав которой раскрыт на стадии а), но без добавления камня», подразумевается среда с составом, указанным ниже в Таблице 1.

Таблица 1

Номер ингредиента	Химическое название	Количество ингредиента на 1000 мл среды, представляющей собой водный раствор.
1	NaNO_3	1,5 г
2	K_2HPO_4	0,04 г
3	$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	0,075 г
4	$\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$	0,036 г
5	Лимонная кислота	6,0 мг
6	Железо-аммонийный цитрат	6,0 мг

7	ЭДТА	1 мг
8	Na ₂ CO ₃	0,02 г
9	Смесь микроэлементов А5 следующего состава, из расчета на 1000 мл водного раствора смеси А5: 2,86 г Н ₃ ВО ₃ , 1,81 г МnСl ₂ x 4Н ₂ О, 0,222 г ZnSO ₄ x 7Н ₂ О, 0,39 г Na ₂ МоО ₄ x 2Н ₂ О, 0,079 г СuSO ₄ x 5Н ₂ О, 49,4 мг Со(НО ₃) ₂ x 6Н ₂ О	1 мл

b) сбор бактерий из окружающей среды;

c) пассивирование биологического материала, собранного на стадии b), в жидкой среде, полученной на стадии a), т.е. в среде с составом по Таблице 1, обогащенной камнем, дополненной агаром с конечным содержанием его от 2% по массе в начале до 0,5% по массе в конце процесса, предпочтительно в течение трех промежуточных стадий по 4 недели на каждой из пяти стадий, т.е. двух крайних стадий (начальной, заключительной) и трех промежуточных стадий, при этом питательная среда на промежуточных стадиях дополнена агаром соответственно в следующих количествах: 1,75%, 1,5%, 1% по массе, по отношению к среде, полученной на стадии a);

d) растворение культурального раствора, полученного на заключительной стадии c), т.е. содержащего 0,5% агара, в водном растворе среды, состав которой указан для стадии a), но без добавления камня, и инкубирование при 25°C в течение 2 недель при перемешивании.

Вторым объектом изобретения является бактериальный штамм, депонированный в Banco Espanol de Algas Universidad de Las Palmas de GC под номером BEA_IDA_0068B.

Третьим объектом изобретения является бактериальный штамм, депонированный в Banco Espanol de Algas Universidad de Las Palmas de GC под номером BEA_IDA_0075B.

Четвертым объектом изобретения является применение штамма настоящего изобретения, определенного как второй объект изобретения, для получения пигмента, обладающего свойствами поглощения УФ-излучения, в частности сцитонемина, или

его производных. Предпочтительное применение согласно настоящему изобретению предусматривает применение полученного пигмента, в частности сцитонемина, или его производных, для производства косметических продуктов, в частности для солнцезащитных кремов.

Пятым объектом изобретения является среда для культивирования *Cyanobacteria*, содержащая в 1000 мл раствора водной среды 1,5 г NaNO_3 , 0,04 г K_2HPO_4 , 0,075 г $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 0,036 г $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$, 6,0 мг лимонной кислоты, 6,0 мг железо-аммонийный цитрата, 1 мг ЭДТА, 0,02 г Na_2CO_3 , 1 мл смеси микроэлементов А5 следующего состава, из расчета на 1000 мл водного раствора смеси А5: 2,86 г H_3BO_3 , 1,81 г $\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$, 0,222 г $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 0,39 г $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$, 0,079 г $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$, 49,4 мг $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$, где среда содержит природный нубийский песчаник со следующим составом, выраженным в массовых процентах: 97,6% кварца, 0,4% мусковит-биотита, 1,2% апатита и 0,8% других минералов в следовых количествах, в количестве 200 г молотого камня на 1000 мл среды. Эта среда пригодна для культивирования *Cyanobacteria*, продуцирующих пигменты, в частности сцитонемин.

Шестым объектом изобретения являются кристаллы сцитонемина, обладающие по меньшей мере одним свойством, выбранным из следующих:

- спектр рентгеновской порошковой дифракции с характерными пиками при значениях углов 2-тета: $2,500^\circ$, $4,589^\circ$, $5,062^\circ$, $8,630^\circ$ и $9,197^\circ$,

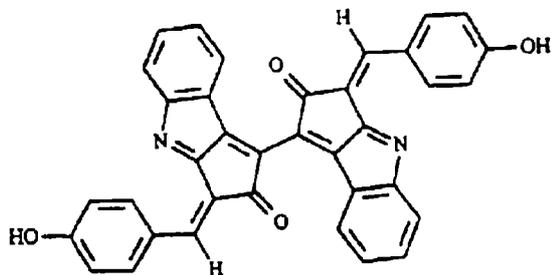
- специфические полосы инфракрасного поглощения при 3345, 3065, 2961, 2926, 1713, 1591, 1516, 1449, 1296, 1175, 1145, 957, 932, 930, 833 $[\text{см}^{-1}]$ в ИК-спектре (KBr),

- температура разложения в диапазоне от 365°C до $380,3^\circ\text{C}$ с пиком приблизительно при $380,3^\circ\text{C}$, согласно термогравиметрическому/дифференциальному термическому анализу (скорость нагрева/охлаждения: $15/20^\circ\text{C}/\text{мин}$),

- спектр ^1H -ЯМР, записанный в пиридине- d_5 , содержащий сигналы при $\delta = 8,98$ м.д., 7,99 м.д., 7,86 м.д., 7,75 м.д., 7,48 м.д., 7,33 м.д. и 7,22 м.д.

Благодаря настоящему изобретению стало возможным предоставить эффективный способ культивирования, который обеспечивает легкое размножение желаемого штамма *Cyanobacteria*, выделенного из природной среды, культивирование которого в лабораторных условиях с использованием методов, известных в данной области, было невозможно или по меньшей мере было трудно осуществить. Благодаря использованию способа по изобретению можно выделить конкретный штамм *Cyanobacterium*, обладающий чрезвычайно благоприятными свойствами, в частности,

высокой продуктивностью сцитонемина формулы 1, в частности, его окисленной формы, т.е. в количестве, составляющем по меньшей мере 1,5% на сухую массу *Cyanobacterium*.



Формула 1

Таксономические характеристики штамма *Cyanobacterium* определены на основе анализа оптической микроскопии и последних рекомендаций, представленных в публикации Komerek et al. (2014), а также в публикациях, цитированных в этой работе. Микроморфологические характеристики полученного штамма показали, что он принадлежит к семейству *Chroococciopsidaceae* (Komerek et al., 2014) и роду *Chroococciopsis* (Geitler, 1932).

Микроморфологическое описание полученных штаммов:

Cyanobacterium, полученные в культуре по изобретению, имеют следующие характеристики:

- a) цвет: сине-зеленый, от желтого до светло-коричневого;
- b) форма: одиночные и сферические клетки диаметром от 1,5 до 5 мкм, сгруппированные в колонии из от нескольких до менее двадцати клеток, или же образующие агрегаты, обычно окруженные отчетливо выраженной оболочкой;
- c) деление: клетки делятся в двух и более плоскостях. После деления клеточная оболочка обычно расширяется и включает дочерние клетки, что рассматривается как наложение оболочки на колонии;
- d) расположение тилакоидов: расположены циркулярно возле клеточной стенки.

Краткое описание фигур

Варианты осуществления настоящего изобретения отражены на фигурах, где на Фиг. 1 показаны сравнительные результаты испытаний по поглощению (А и В) и по пропусканию (С и D) света для выбранных коммерчески доступных кремов с SPF 30 и 50 (образцы 1-3) и образцов с добавлением сцитонемина (образец 4), где испытания

проводились с использованием тонкослойного материала для имитации искусственной кожи (хирургическая лента 3M®). На Фиг. 1А показаны кривые поглощения образцов в диапазоне УФ от UVA (280-320 нм), UVA (320-400 нм) и до 800 нм, а на Фиг.1В показаны кривые поглощения образцов в диапазоне УФ UVB (280-320 нм) и UVA (320-400 нм). На Фиг. 1С показаны кривые пропускания образцов в диапазоне УФ от UVB (280-320 нм), UVA (320-400 нм) и до 800 нм. На Фиг.1D показаны кривые пропускания образцов в диапазоне УФ UVB (280-320 нм) и UVA (320-400 нм). При этом кривые обозначены следующим образом: образец 4 с добавлением сцитонемина - сплошная жирная линия; образец 1 - «-----»; образец 2 - «-.-.-» и образец 3 «- - -». На Фиг. 2 показан FTIR-спектр образца SCY, на Фиг. 3 показана кривая потери массы в зависимости от температуры нагрева образца (черная кривая) и теплового потока кривая (серая кривая) в интервале температур 350-520 °С с максимальной температурой разложения 380,3°С. На Фиг. 4 показана рентгеновская дифрактограмма, полученная с помощью метода PXRD (метод анализа поликристаллической структуры с помощью рентгеновской дифракции) формы сцитонемина по изобретению. Основные пики отмечены знаком «*». На Фиг.5 и 5А представлен спектр протонного ядерного магнитного резонанса (¹H-ЯМР) образца сцитонемина, записанного в пиридине-*d*₅, со сдвигом по шкале δ [м.д.]. На Фиг. 5 представлен полный спектр (диапазон: от -0,5 до 10,5 м.д.), а на Фиг. 5А показан расширенный диапазон 7,1-9,1 м.д. На Фиг. 6 представлены результаты исследования степени дисперсности сцитонемина в растворах, используемых в косметике, как описано в Примере 2.2. На Фиг. 7А и 7В показан кристалл, описанный в Примере 8. На Фиг. 8А-8D показаны графические модели структуры SCY, полученные с помощью программы MERCURY (Macrae et al., 2020): асимметричная ячейка (Фиг. 8А), общий вид упаковки элементарных ячеек (Фиг. 8В) и упаковка элементарной ячейки: вид по направлению оси [001] (Фиг. 8С) и вдоль оси [100] (Фиг. 8D).

Примеры

Пример 1

1.1. Приготовление питательной среды для роста бактерий

Приготовление питательной среды для роста бактерий предусматривает обогащение ее микро- и макроэлементами, содержащимися в песчанике нубийских формаций, откуда происходят *Cyanobacteria*. Для этого 200 г простерилизованного камня растирали в агатовой ступке и добавляли на каждые 1000 мл чистой среды BG11

согласно Таблице 1. Затем полученную смесь перемешивали в течение 24 часов при 25°C, подвергали окончательной 5-часовой седиментации, а затем ее фильтровали через фильтр диаметром 25 мм и размером пор 0,2 мкм (Cyclo-pore Track-Etch Membranes, Whatman). Полученную среду BG11, обогащенную микро- и макроэлементами из песчаника, нагревали до 60°C. Затем к полученному раствору добавляли сухой агар в конечном количестве 2% по массе. Далее все содержимое перемешивали до растворения агара и разливали по чашкам Петри (R), охлаждали до 25°C и хранили накрытыми в стерильных условиях до сбора *Cyanobacteria* из окружающей среды и посева на чашки со средой.

1.1.1. Характеристики камня

Камни с эндолитическими микроорганизмами происходят из нубийских песчаников. Для количественного анализа минералогического состава пяти образцов камней общей массой 52 г использовали рентгеновскую дифракцию (XRD). Состав песчаника (среднее содержание): 97,6% кварца, 0,4% мусковит-биотита, 1,2% апатита и 0,8% других минералов в следовых количествах.

1.2. Сбор *Cyanobacteria* из окружающей среды

Два небольших фрагмента камня с эндолитической колонизацией двумя штаммами *Cyanobacteria*, являющихся объектами настоящего изобретения, механически соскребали с помощью стерильного ланцета на чашки Петри, подготовленных как описано выше на стадии 1.1, так что для двух штаммов были созданы две отдельные культуры, обогащенные микро- и макроэлементами из нубийского песчаника. *Cyanobacteria* высевали при 25°C в режиме свет/темнота (12/12 часов) при 25°C, с использованием света в диапазоне ФАР (фотосинтетически активная радиация, с длиной волн в диапазоне 400-700 нм) при плотности потока приблизительно 30-50 мкмоль фотонов м²с⁻¹, обеспечиваемых холодными люминесцентными лампами мощностью 18 Вт (PhilipsTLD18W/33). Через 5-10 недель чашки с агаром проверяли на наличие колоний *Cyanobacteria* с помощью светового микроскопа Euromex Oxion Inverso OX.2053-PL снабженного камерой Cmax 3.

1.3. Пассирование

Последовательное пассирование биологического материала со стадии 1.2 осуществляли на твердых средах, полученных на стадии 1.1, и пассирование проводили при дополнении среды агаром от первоначально количества, составляющего 2% от массы среды до конечного, составляющего 0,5% от массы среды, предпочтительно с тремя промежуточными стадиями с содержанием агара 1,75 %, 1,5% и 1% от массы

среды. Время пассирования составляло 4 недели для каждой промежуточной и конечных стадиях при 25°C с непрерывным ФАР-облучением (свет в диапазоне 400-700 нм) при плотности потока 35 мкмоль фотонов м⁻²с⁻¹.

1.4. Культура

Полученные колонии со стадии 1.3 для двух штаммов на среде с содержанием агара 0,5% по массе растворяли в водном растворе среды со стадии 1.1, состав которой указан в Таблице 1 (не модифицированной добавлением микро- и макроэлементов из камня), и инкубировали при 25°C в течение 2 недель с одновременным непрерывным орбитальным встряхиванием (20 об/мин) с использованием орбитального шейкера ИКА KS 501 и с непрерывным ФАР-облучением (свет в диапазоне 400-700 нм) при плотности потока 35 мкмоль фотонов м⁻²с⁻¹, поддерживая две отдельные культуры для двух штаммов, являющихся объектами изобретения.

Получение моноклональной стабильной культуры двух штаммов по изобретению на среде со стадии 1.1, не модифицированной добавлением микро- и макроэлементов из камня.

Колонии *Cyanobacteria*, выделенные под микроскопом, помещали в водный раствор среды со стадии 1.1, состав которой указан в Таблице 1, без добавления камня, при рН 8,2. При температуре 25°C и ФАР-облучении при плотности потока 35 мкмоль фотонов м⁻²с⁻¹, их подвергали встряхиванию через определенные интервалы времени для ресуспендирования. Часть культуры (2 мл) добавляли каждые две недели к 100 мл свежей стандартной среды со стадии 1.1 без добавления камня для поддержания свежей культуры. Световой режим при культивировании *Cyanobacteria* в жидкой среде составлял 10-12 часов света и 12-14 часов темноты в непрерывном или смешанном режиме.

Индукция синтеза сцитонемина культурой *Cyanobacteria* и определение продуктивности

Использовали методику, описанную в публикации Fleming & Castenholtz (2007). Вкратце, растворы *Cyanobacteria* из вышеуказанной среды, т.е. среды со стадии 1.1, без добавления камня, фильтровали и фильтры помещали на твердую агаризованную среду BG-11 с содержанием агара 2%. Чашки с фильтрами подвергали ФАР-облучению (с плотностью потока 65 мкмоль фотонов м⁻²с⁻¹ или с интенсивностью 40 Вт/м²) и УФ-облучению (1,8 Вт/м²). Некоторые фильтры с облученными *Cyanobacteria* анализировали на содержание сцитонемина каждые три дня. Для этого использовали метод спектрофотометрии, как описано ниже.

Спектры поглощения экстрагированного (метанол/этилацетат (об./об. 1:1)) сцитонемина получали с использованием однолучевого спектрофотометра с диодной матрицей HP 8452A Diode Array (Hewlett-Packard, Токио, Япония). Значения поглощения для конкретной длины волны (максимальные пики для соответствующих пигментов) использовали для полуколичественного анализа сцитонемина [мг/г сухой массы (DW)] с помощью трихроматических уравнений и с использованием коэффициентов экстинкции (Lichtenthaler, 1987).

1.5. Способ оценки продуктивности сцитонемина по изобретению

После окончания культивирования культуральные растворы, содержащие *Cyanobacteria* со стадии 1.4, фильтровали с помощью фильтра 0,2 мкм. Фильтры помещали на твердую агаризованную среду BG-11 (агар 2%). Чашки с фильтрами подвергали ФАР-облучению с плотностью потока 65 мкмоль фотонов $\text{м}^{-2}\text{с}^{-1}$ (или с интенсивностью 40 Вт/м²) и УФ-облучению в диапазоне UVA с интенсивностью 1,8 Вт/м². Некоторые фильтры с облученными *Cyanobacteria* анализировали на содержание сцитонемина каждые три дня. Для этого использовали метод спектрофотометрии, как описано ниже.

Спектры поглощения экстрагированного (метанол/этилацетат (об./об. 1:1)) сцитонемина (с другими пигментами) получали с использованием однолучевого спектрофотометра с диодной матрицей HP 8452A Diode Array (Hewlett-Packard, Токио, Япония). Значения поглощения для конкретной длины волны (максимальные пики для соответствующих пигментов) использовали для полуколичественного анализа сцитонемина [мг/г сухой массы (DW)] с помощью трихроматических уравнений и с использованием коэффициентов экстинкции (Lichtenthaler, 1987).

Продуктивность сцитонемина составила не менее 1,75% из расчета на сухую массу *Cyanobacterium* для бактериального штамма, депонированного в Banco Espanol de Algas Universidad de Las Palmas de GC под номером BEA_IDA_0075B, и для бактериального штамма, депонированного в Banco Espanol de Algas Universidad de Las Palmas de GC под номером BEA_IDA_0068B, то есть она оказалась намного выше, чем продуктивность, полученная в уровне техники, которая составляла от 0,03 до 0,09% сцитонемина на сухую массу (DW) *Cyanobacteria* (Balskus et al., 2011). Следовательно, полученная продуктивность в 19-58 раз выше значений, достигнутых в уровне техники.

1.6. Экстракция и очистка сцитонемина

Биомассу, полученную как описано выше, суспендированную в культуральной жидкости, отделяли центрифугированием (или фильтрованием). Полученную биомассу

подвергали предварительной очистке в смеси хлороформ:гексан (1:1 по объему). На этой стадии биомассу со смесью растворителей встряхивали в течение 10 минут и обрабатывали ультразвуком также в течение 10 минут. Затем полученную смесь центрифугировали (6000 об/мин в течение 10 мин) и собирали супернатант над осадком. К осадку добавляли еще одну свежую порцию смеси растворителей и процедуру повторяли. После еще одного центрифугирования супернатант от обоих центрифугирований сливали, и его можно очистить с помощью вакуумного испарителя для повторного использования. Биомассу после первой стадии очистки далее подвергали первичной экстракции смесью этилацетат:метанол (1:1 по объему) или ацетоном. На этой стадии также использовали центрифугирование и обработку ультразвуком в 10-минутных циклах. После каждого цикла обработки выполняли центрифугирование и собирали супернатант. Экстракцию повторяли с использованием новых порций растворителя до тех пор, пока супернатант не становился бесцветным (обычно 3-5 раз). Затем собранный супернатант выпаривали с помощью вакуумного испарителя (40°C) для его повторного использования. Высушенный остаток после выпаривания подвергали процедуре окончательной очистки. На этой стадии также использовали смесь хлороформ:гексан (1:1 по объему) со встряхиванием, обработкой ультразвуком и центрифугированием. Количество стадий очистки зависит от степени загрязнения пробы и их повторяли до получения прозрачного бесцветного супернатанта после центрифугирования. При достижении этого эффекта осадок (скитонемин) дополнительно дважды промывали гексаном. После последнего центрифугирования и сбора супернатанта, полученный осадок сушили в вакуумной сушилке (40°C) и затем взвешивали. Высушенный осадок анализировали с помощью ВЭЖХ для оценки чистоты полученного продукта.

Пример 2

Применение скитонемина

2.1. Эффективность защиты от солнца

Для оценки эффективности защиты от солнца различных марок солнцезащитных кремов и солнцезащитного продукта, предложенного заявителем (образец 4), содержащим скитонемин на основе экстрактов *Cyanobacterium* в качестве активного ингредиента, использовали метод спектрофотометрии. Коммерчески доступные солнцезащитные продукты и тестируемый образец 4 подвергали анализу в отношении поглощения и пропускания света в эксперименте с использованием модели

человеческой кожи (хирургическая лента 3M®). Коммерчески доступную ленту 3M® наносили на полоску из кварцевого стекла размером 2 x 2 см, и на нее наносили тонкий слой исследуемых образцов. Планшеты с образцами подвергали анализу в отношении поглощения и пропускания света через 20 минут после нанесения образцов с использованием системы FLAME-S (Ocean Optics, Флорида, США) и спектрометра.

Эффективность продукта с сцитонемин по изобретению в отношении защиты от солнца показана на Фиг. 1, где представлены сравнительные результаты оценки поглощения (A и B) и пропускания (C и D) выбранных коммерчески доступных продуктов с SPF (фактором защиты от солнца) 30 и 50 (по Greiter, 1974) (образцы 1-3) и образца 4 с добавлением сцитонемина. Испытания проводили с использованием тонкослойного материала, имитирующего искусственную кожу (хирургическая лента 3M®). На Фиг. 1A показаны кривые поглощения образцов в диапазоне УФ от UVB (280-320 нм), UVA (320-400 нм) и до 800 нм. На Фиг. 1B показаны кривые поглощения образцов в диапазоне УФ UVB (280-320 нм) и UVA (320-400 нм). На Фиг. 1C показаны кривые пропускания образцов в диапазоне УФ от UVB (280-320 нм), UVA (320-400 нм) и до 800 нм. На Фиг. 1D показаны кривые пропускания образцов в диапазоне УФ UVB (280-320 нм) и UVA (320-400 нм) При этом кривые обозначены следующим образом: образец 4 с добавлением сцитонемина - сплошная жирная линия; образец 1- «-----»; образец 2 - «-.-.-» и образец 3 «- - - -».

Для сравнительной оценки использовали коммерчески доступные продукты, составы которых указаны ниже.

Образец 1. 2-этилгексил-4-метоксициннамат/октиноксат + 2-гидрокси-4-метоксибензофенон/оксибензон + диоксид титана (TiO₂) [процентное содержание в продукте: 7,5%, 4% и 10%, соответственно] + q.s. (достаточное количество): глицерин + стеарат глицерина + вода + диоксид кремния + спирт.

Образец 2. диоксид титана (TiO₂) + оксид цинка (ZnO) [процентное содержание в продукте: 10% и 17%, соответственно] + q.s.: глицерин + стеарат глицерина + вода + диоксид кремния + спирт.

Образец 3. оксид цинка (ZnO) + (2-этилгексил 4-метоксициннамат)/октиноксат [процентное содержание в продукте: 15,5% и 7,5%, соответственно] + q.s.: глицерин + стеарат глицерина + вода + диоксид кремния + спирт.

Образец 4. 0,8% сцитонемин + q.s. крем Diprobase, в состав которого входят: белый вазелин, жидкий парафин, макрогол. цетостеариловый эфир, цетостеариловый

спирт, дигидрат дигидрофосфата натрия, хлоркрезол, гидроксид натрия, концентрированная фосфорная кислота, вода очищенная.

Результат оценки: образец 4, содержащий добавку сцитонемина, показал высокие значения поглощения и низкие значения пропускания в диапазоне УФ UVB и UVA на уровне, аналогичном показателям коммерчески доступных кремов с SPF 30 и 50.

2.2. Оценка степени диспергируемости сцитонемина в растворах, используемых в косметике

2.2.1. Приготовление образцов

На аналитических весах отвешивали 0,5 мг сцитонемина и его суспендировали в 1 г раствора следующего состава:

- 1) Пропиленгликоль (название по INCI (Международная номенклатура косметических ингредиентов): пропиленгликоль)
- 2) Рафинированное абрикосовое масло (название по INCI: масло из абрикосовых косточек)
- 3) Глицерин (название по INCI: глицерин)
- 4) Изогексадекан (название по INCI: изогексадекан)
- 5) 2-октилдодекан-1-ол, ODD (название по INCI: октилдодеканол)
- 6) Эмульгатор SLP (название по INCI: сорбитан-лаурат/полиглицерил-4-лаурат/дилаурилцитрат)

Затем каждый образец перемешивали с помощью шейкера в течение приблизительно 1 минуты и выдерживали в течение 10 минут в ультразвуковой ванне для достижения более высокой диспергируемости.

Полученные результаты:

1. Высокая диспергируемость действующего вещества; гликолевый раствор сразу становится коричнево-зеленым; в нем видны мелкие частицы суспензии (см. Фиг. 6А).
2. Очень низкая диспергируемость действующего вещества в растворе; хорошо видна нерастворившаяся часть суспензии, которая со временем выпадает в осадок (см. Фиг. 6В).
3. Низкая диспергируемость действующего вещества; хорошо видна суспензия, которая со временем постепенно растворяется и слегка окрашивает раствор (см. Фиг. 6С).

4. Высокая диспергируемость действующего вещества. После суспендирования получали равномерную дисперсию сероватого цвета; видны частицы вещества (очень мелкие), которые со временем оседали (см. Фиг. 6D).

5. Сравнительно высокая диспергируемость действующего вещества. Получен бледно-зеленый раствор; видно оседание частиц суспензии на дно (см. Фиг. 6E).

6. Низкая диспергируемость действующего вещества в растворе эмульгатора. Видны мелкие частицы, оседающие на дно; раствор со временем постепенно окрашивался (см. Фиг. 6F).

Обобщение полученных результатов:

Наилучшая диспергируемость активного ингредиента была получена для образца 1 при концентрации гликоля 0,5 мг/г. Степени диспергируемости, наблюдаемые в образцах, снижаются в следующем порядке (образцы расположены в порядке от самой высокой степени диспергируемости до самой низкой степени диспергируемости сцитонемин):

$1 > 4 > 5 > 6 > 3 > 2.$

2.2.2. Приготовление образцов

На аналитических весах отвешивали 0,5 мг сцитонемин и его суспендировали в 5 г композиции следующего состава:

7) глицерин + стеарат глицерина + вода + диоксид кремния + спирт

Полученную суспензию перемешивали в течение 5 минут с помощью лабораторной мешалки.

Полученные результаты:

После смешивания исходной основы с активным ингредиентом получали гомогенную беловатую основу с видимыми частицами сцитонемин. Вещество не растворялось, а распадалось на более мелкие частицы. Полученный результат аналогичен результату, полученному для образца 4 с изогексадеканом (суспензия): см. Фиг. 6G.

$1 > 4, 7 > 5 > 6 > 3 > 2.$

Пример 3.

Сравнительный пример: стандартный способ выделения и культивирования (способ уровня техники)

При использовании стандартного способа по методу Riprka et al. (1979), в котором используется культивирование на среде BG11; стандартного способа по

методу Anahas and Muralitharan (2015), в котором используется культивирование на среде BG-11N0; стандартного способа по методу Singh et al. (2014), в котором используется культивирование на среде BG-11, модифицированной добавкой 10 мМ NaHCO₃, бактерии штаммов, являющихся объектами настоящего изобретения, не могли быть выделены, а тем более культивированы. Колонии бактерий рано погибали, и биомассу, необходимую для продукции сцитонемина, получить не удалось.

Пример 4

Инфракрасная спектроскопия с преобразованием Фурье (FTIR) с термогравиметрическим/дифференциальным термическим анализом (TG/DTA)

Образец: SCY

Твердое вещество темно-коричневого цвета в виде порошка; масса: 8,3 мг

Введение

Образец, именуемый в дальнейшем SCY, был получен из штамма, являющегося объектом настоящего изобретения, имеющий депозитный номер BEA_IDA_0075B. Образец подвергали анализу методами дифференциального термического анализа/термогравиметрии (TG/DTA) и инфракрасной спектроскопии с преобразованием Фурье (FTIR), в соответствии с конкретными процедурами, описанными ниже. Никакой предварительной подготовки проб для анализа не требовалось. Последующие повторные эксперименты, выполненные с образцом, полученном из штамма BEA_IDA_0068B, дали аналогичные результаты. Все результаты, представленные в Примерах, относятся к одному и тому же веществу, полученному из двух штаммов, являющихся объектами настоящего изобретения.

Образец SCY хранили до анализа в закрытом контейнере при комнатной температуре.

4.1. Анализ методом FTIR

Для анализа FTIR взвешивали 209,9 мг KBr, предварительно высушенного при 110°C в течение пяти часов в вакуумном эксикаторе и охлажденного до комнатной температуры. К KBr добавляли 0,4 мг пробы и смесь растирали в агатовой ступке под инфракрасной лампой во избежание поглощения влаги.

ИК-спектр получали в следующих условиях.

Оборудование:

Спектрофотометр Shimadzu FTIR 8400 (Shimadzu, Киото, Япония).

Пресс PIKE (Pike Technologies, Мэдисон, США).

Параметры измерения:

Метод: % пропускания

Диапазон: 400-4000 см⁻¹

Аподизация: по функции Хаппа-Гензеля

Количество сканирований: 45

Разрешение: 4,0

Полученные результаты:

Данные измерений обрабатывали с использованием программного обеспечения Shimadzu для получения пиковых значений. Пиковые значения и полосы были ассоциированы со структурой в соответствии с литературными источниками (Pretsch, E. et al.: «Tablas para la elucidación estructural de compuestos organicos por métodos espectroscópicos», Ed. Alhambra. Madrid, 1980 и Flett, M. «Haracteristic Frequities of Chemical Chemical Groups in the Infra-red» Elsevier Monographs. Elsevier, 1963. На Фиг. 2 показан FTIR-спектр для образца SCY (полученного в Примере 1) с отмеченными основными полосами. В Таблице 2 показаны значения волновых чисел, ассоциированными с наиболее вероятными идентифицированными функциональными группами/связями.

Таблица 2

3345	<i>O-H валентные колебания</i>
3065	<i>=C-H валентные колебания (алкены, ароматические соединения)</i>
1713.	<i>C=O валентные колебания</i>
1591	<i>C=C валентные колебания (ароматические соединения)</i>
1516	<i>C=C валентные колебания (ароматические соединения)</i>
1449	<i>C=C валентные колебания (ароматические соединения)</i>
1296	<i>O-H деформация</i>
1175	<i>C-O валентные колебания</i>
957	<i>C-H деформация в плоскости (ароматические соединения)</i>
833	<i>C-H деформация вне плоскости (ароматические соединения)</i>

Аналогичный анализ проводили для соединения, полученного в Примере 1 из штамма, депонированного под номером BEA_IDA_0068B. Полученный спектр был идентичен спектру, представленному на Фиг. 2.

4.2. Анализ методом TG/DTA

В тигле из оксида алюминия отвешивали 3,7 мг образца, и к нему добавляли 34,6 мг проволоки из чистого золота (99,999%), чтобы сбалансировать массу стержня с противовесом микровесов.

Подготовка проб:

Никакой специальной подготовки проб для анализа не требовалось.

Оборудование:

Анализатор SETARAM SETSYS 6000

Условия эксперимента

Параметры измерения:

Поток аргона при 2 атм.

Масса образца: 3,7 мг

Тигель: 100 мкл Al_2O_3

Эталонный тигель: Al_2O_3

Температурный режим указан в Таблице:

Температура (начало - конец) в °С	Время, секунды	Скорость, °С/мин.
25-25	300	-
25-900	5250	15
900-40	2580	20

Полученные результаты

По термогравиметрической кривой рассчитывали потери массы на последовательных стадиях, а по кривой теплового потока определяли наличие экзо- и эндотермических процессов при нагреве образца.

На Фиг. 3 показаны кривая потери массы в зависимости от температуры нагрева образца (черная кривая) и кривая теплового потока (серая кривая) в диапазоне температур от 350°C до 520°C. В этом температурном диапазоне наблюдали отчетливую потерю массы SCY (черная кривая). Термическое разложение вещества представляет собой экзотермический процесс (приращение значения теплового потока на серой кривой), и он начинается при 365,4°C (вертикальная пунктирная линия на Фиг. 3), достигая максимума при 380,3°C (вертикальная сплошная линия на Фиг. 3). Установлено, что потеря массы SCY на 4,32% в диапазоне температур от 365,4°C до 380,3°C, связана с экзотермическим процессом, что подтверждает температуру разложения SCY, находящуюся в этом диапазоне температур с выраженным

максимумом при 380,3°C. Выше этой температуры происходит потеря массы SCY, связанная с эндотермическим процессом (уменьшение значений на серой кривой), что подтверждает происходящий процесс газовой выделения и реструктуризации продуктов разложения SCY, за исключением диапазона температур 405-412°C, когда протекает экзотермический процесс, связанный с вторичным разложением продуктов разложения SCY.

Диапазон температур разложения SCY = 365,4-380,3°C.

Максимальная потеря массы при температуре = 380,3°C.

Δ массы = 0,16 мг (4,32%)

Для соединений, полученных из двух штаммов, являющихся объектом изобретения, культивированных и выделенных согласно примеру 1, получены идентичные спектры.

Пример 5

Анализ поликристаллической структуры с помощью метода рентгеновской дифракции (PXRD)

Методика измерения

После экстракции SCY из двух штаммов, являющихся объектом изобретения, выпаривали растворитель и получали 8,3 мг коричневого порошка (кристаллическая форма по изобретению) с одиночными игольчатыми кристаллами размером от 2 до 20 микрометров или в виде их агрегатов с радиальным расположением игольчатых кристаллов. Характеристики кристаллического материала определяли с помощью оптической микроскопии (микроскоп AXIO Imager DM2, Zeiss, Carl Zeiss, Германия, объектив Aplanachrom 63x, n=1,4, Zeiss).

Анализ порошка методом PXRD проводили в кристаллическом материале (кристаллическая форма по изобретению), состоящем из SCY, полученном из двух штаммов, являющихся объектом изобретения, для которых были получены две идентичные дифрактограммы PXRD. Дифрактограммы PXRD получали с использованием поликристаллического дифрактометра Bruker D8-Discover. Порошковые дифрактограммы получали при комнатной температуре с рентгеновской трубкой в качестве источника рентгеновского излучения (медный анод, $K\alpha$ при 50 кВ, 30 мА, коллиматор со щелью 2 мм). Результаты измерений регистрировали в непрерывном режиме работы; диапазон сканирования угла 2-тета от 2 до 60 градусов, шаг измерений 0,02 градуса, скорость сканирования 0,7 секунды на шаг измерения.

Для анализа полученных дифрактограмм использовали программу Diffrac.EVA v5.1.

Анализ дифрактограммы кристаллического порошка (кристаллическая форма по изобретению), полученной методом рентгеновской дифракции, представленной на Фиг. 4, показал следующее.

1. На дифрактограмме SCY аморфных фаз не обнаружено.

2. Дифрактограмма PXRD содержит приблизительно 35 значимых дифракционных пиков в диапазоне углов 2-тета от 2 до 43 градусов. Поскольку качество дифрактограммы выше этого диапазона значений углов было хуже, то не удалось однозначно определить (идентифицировать) параметры пиков, и их анализ не проводился.

3. Учитывая характеристики пиков (малую полную ширину на половине высоты пика (FWHM), подтверждающую высокую степень кристалличности), для идентификации материала можно использовать не менее пяти малоугловых дифракционных углов, определенных с помощью использованного программного обеспечения, при следующих значениях угла 2-тета: 2,500°, 4,589°, 5,062°, 8,630° и 9,197°. Эти пики отмечены на Фиг. 4 знаком «*».

4. Наличие других более низких и более широких пиков с более высокими значениями FWHM показывает, что в образце присутствует кристаллический материал с более низкой степенью кристалличности (кристаллитов с уменьшенным размером).

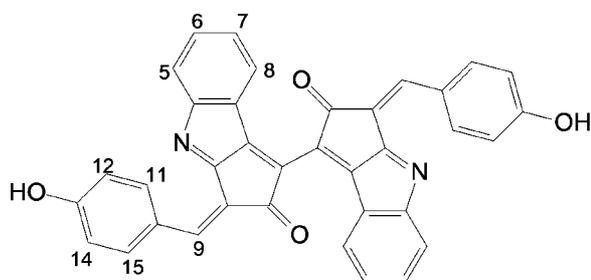
5. Зарегистрированные дифракционные пики специфичны для SCY, и они могут быть использованы для идентификации вещества. В имеющихся кристаллографических базах данных не обнаружено такой дифракционной картины, и нет какого-либо другого известного вещества со схожей дифракционной картиной.

Пример 6

Анализ сцитонемина методом ядерного магнитного протонного резонанса (¹H-ЯМР)

Спектр ¹H-ЯМР сцитонемина (1,6 мг) в пиридине-*d*₅ (0,75 мл) снимали на спектрометре Bruker Avance II 300 на основной частоте 300,13 МГц при комнатной температуре. На спектре ¹H-ЯМР химические сдвиги δ приведены в м.д., значения констант связи *J* приведены в Гц. Спектр стандартизировали по остаточному сигналу H-2 протонов пиридина-*d*₅ при 8,727 м.д. Фазу и базовую линию корректировали вручную. Аналогичным образом выбирали области интеграции. Зарегистрированные

сигналы сопоставляли с сигналами и данными, которые описаны в литературе (Proteau et al., 1993). Полученные экспериментальные данные в отношении химического сдвига δ согласуются с известными данными. Из-за быстрого обмена лабильных протонов группы -ОН в фенольных группах их сигналы не включены в описание спектра. Сигналы от следовых примесей (воды и *n*-гексана) обнаруживаются при значениях δ соответствующих 4,93 и приблизительно 1,0.



^1H -ЯМР (пиридин- d_5) δ [м.д.]: 8,98 (д, 2H, J 8,7; H-11,15); 7,99 (с, 1H; H-9); 7,86 (д, 1H, J 7,5; H-8); 7,75 (д, 1H, J 7,6; H-5); 7,48 (тд, 1H, J 7,6, 1,2; H-6); 7,33 (д, 2H, J 8,8; H-12, 14); 7,22 (м, 1H, H-7 /перекрывается с остаточным сигналом протонов H-3 пиридина- d_5).

На Фиг. 5 и 5А показаны спектры ^1H -ЯМР по шкале δ [м.д.] для образца сцитонемина в пиридин- d_5 , при этом на Фиг. 5 представлен полный спектр (диапазон от -0,5 до 10,5 м.д.), а на Фиг. 5А представлен расширенный диапазон 7,1-9,1 м.д.

Пример 7

Соединение, полученное в Примере 1, хранили в комнатных условиях (температура 25°C) в течение 10 месяцев. Спектры поглощения до и после хранения образца соединения оказались идентичными, что подтверждает стабильность соединения. Кроме того, высокая стабильность сцитонемина была подтверждена ранее в публикациях (Fleming and Castenholz 2007) и (Rastogi and Incharoensakdi 2014), где показано, что сцитонемин имел практически неизменные спектры поглощения после 2 месяцев непрерывного УФА-облучения (5 Вт/м²) или при нагреве до 60°C в течение 2 месяцев. Кристаллическая форма сцитонемина по изобретению является стабильной.

Пример 8

Определение модели структуры сцитонемина (SCY) с использованием метода рентгеновской дифракции (XRD)

Получение монокристаллического образца SCY.

Монокристаллический образец сцитонемина для анализа методом рентгеновской дифракции (XRD) готовили кристаллизацией в системе тетрагидрофуран-этанол (ТГФ-EtOH) в объемном соотношении 2:1. Использовали приблизительно 30 мг соединения и 12 мл смеси ТГФ-EtOH. Образец сначала растворяли в 8 мл ТГФ, а затем, после добавления 4 мл EtOH, полученный раствор медленно (приблизительно в течение 7 дней) концентрировали путем свободного испарения растворителя при комнатной температуре.

Получение данных анализа и их обработка

Из полученного образца был выбран один темно-коричневый кристалл в форме параллелепипеда размерами 0,011 x 0,035 x 0,131 мм (Фиг. 7А и 7В).

Дифрактограмму выбранного кристалла SCY получали при 100К на четырехцикловом дифрактометре Rigaku Oxford Diffraction Synergy-S, с источником излучения $\text{CuK}\alpha$ (1,54184 Å), графитовым монохроматором и системой низкотемпературного охлаждения образца Oxford CryoStream 800 при измерении. Обработку данных и определение параметров кристаллических ячеек проводили с использованием программного обеспечения от производителя дифрактометра (Rigaku Oxford Diffraction, 2018).

Определение параметров ячейки и уточнение структуры

Фазовую проблему решали с помощью внутреннего фазирования, а положения атомов в модели структуры определяли с помощью SHELXT (Sheldrick, 2015 - Раздел А). Учитывая качество исходных данных по дифракции, проводили только полноматричное уточнение положений и параметров изотропных атомных смещений неводородных атомов на основе квадратов структурных факторов ($F^2(hkl)$). Для улучшения уточнения структуры и коррекции параметров молекулярной геометрии использовали геометрические ограничения для бензольных колец (AFIX 66) и концевых пятичленных колец, имеющих карбонильные группы (AFIX 56).

Уточнение модели структуры и дополнительные расчеты выполняли с помощью SHELXL2014 (Sheldrick, 2015 - Раздел С).

Параметры, относящиеся к дифракции и кристаллической решетке, а также по уточнению модели структуры SCY, приведены в Таблице 3. Параметры геометрически определенной модели структуры SCY приведены в Таблицах 4-7. Они, соответственно, представляют собой: атомные координаты, выраженные в долях параметров элементарной ячейки ($\times 10^4$), и эквивалентные параметры изотропного атомного смещения U_{eq} ($\text{Å}^2 \times 10^3$) для SCY, где значения U_{eq} определены как 1/3 трассы

ортогонализированного тензора U_{ij} (Таблица 4), длины связей (Таблица 5), а также валентности (Таблица 6) и углы кручения (Таблица 7).

Графические представления модели структуры SCY (Фиг. 8A-D) были получены с помощью программного обеспечения MERCURY (Macrae et al., 2020). Асимметричная ячейка показана на Фиг. 8A. Общий вид упаковки элементарных ячеек показан на Фиг. 8B, и упаковки элементарных ячеек показаны на Фиг.8C (вид по направлению [001]) и на Фиг.8D (вид вдоль направления [100]).

Таблица 3

Показатель, название	SCY
Молекулярная формула	$C_{36}H_{20}H_2O_4$
Молекулярная масса, г моль ⁻¹	544,57
Температура измерения, К	100,00(15)
Кристаллическая система	Моноклиническая
Пространственная группа	Pc
a, Å	35,5024(13)
b, Å	3,78158(10)
c, Å	20,4422(6)
α , °	90
β , °	95,338(3)
γ , °	90
Объем элементарной ячейки, Å ³	2732,57(15)
Z	4
Плотность (расчетная), г см ⁻³	1,304
μ , мм ⁻¹	0,716
Размеры кристалла, мм ³	0,131 × 0,035 × 0,011
Источник радиации	CuK α ($\lambda = 1,54184$)
Диапазон углов 2 Θ для полученных дифрактограмм, °	от 5 до 149,748.
Диапазоны параметров hkl	$-41 \leq h \leq 44, -4 \leq k \leq 4, -24 \leq l \leq 24$
Количество зарегистрированных отражений	6816
Количество зарегистрированных симметрично независимых отражений	6816 [$R_{\text{sigma}} = 0,0239$]
Количество отражений/количество	6816/16/215

ограничений/количество уточненных параметров	
Параметр согласия модели структуры на основе функции $F(hkl)^2$	3,675
R-факторы [$I \geq 2\sigma(I)$]	$R_1 = 0,2424$, $wR_2 = 0,5534$
Наибольшее/наименьшее значение на карте разностной электронной плотности, $e \text{ \AA}^{-3}$	2,38/-1,65

Таблица 4

Атом	x	y	z	U _{eq}
C1	7477(4)	-3830(50)	6963(8)	30(4)
C2	7274(5)	-2300(50)	6402(7)	43(6)
C3	6889(4)	-2040(60)	6526(10)	37(5)
C4	6853(4)	-3410(70)	7164(10)	68(9)
C12	7217(5)	-4520(60)	7434(7)	39(5)
N5	6580(6)	-2680(60)	7543(9)	39(5)
C11	7088(5)	-5090(60)	8061(6)	55(8)
C6	6716(5)	-4110(70)	8129(8)	47(7)
C7	6568(4)	-4510(70)	8731(10)	62(8)
C8	6792(5)	-5880(70)	9265(7)	56(8)
C9	7164(5)	-6860(50)	9197(6)	37(5)
C10	7312(4)	-6460(50)	8595(7)	21(4)
C13	6634(14)	-210(150)	6110(30)	80(12)
C14	6238(6)	790(70)	5931(12)	41(6)
C15	6071(10)	1590(120)	5306(12)	95(16)
C16	5694(11)	2630(150)	5220(20)	110(20)
C17	5484(8)	2870(170)	5760(30)	140(30)
C18	5650(10)	2070(170)	6380(20)	180(50)
C19	6027(10)	1030(110)	6470(13)	72(10)
O20	5077(9)	3230(90)	5546(18)	72(8)
O21	7389(10)	-1730(100)	5910(20)	83(9)
C22	7872(4)	-4610(60)	7096(9)	43(6)
C23	8059(5)	-4180(60)	7736(7)	38(6)

C24	8437(5)	-5380(50)	7725(8)	32(5)
C25	8484(4)	-6570(60)	7079(9)	40(6)
C33	8135(6)	-6090(60)	6690(6)	49(7)
N26	8740(8)	-7660(120)	6664(12)	79(10)
C32	8180(4)	-7000(50)	6027(6)	29(5)
C27	8550(4)	-8240(50)	6046(7)	34(5)
C28	8693(4)	-9390(50)	5473(9)	36(5)
C29	8467(6)	-9310(60)	4881(7)	48(7)
C30	8097(5)	-8070(70)	4861(6)	65(10)
C31	7954(4)	-6920(60)	5434(8)	48(7)
C34	8684(5)	-5060(50)	8250(9)	17(3)
C35	9093(5)	-6120(70)	8481(9)	51(7)
C36	9236(4)	-5740(50)	9133(8)	34(5)
C37	9598(4)	-6940(50)	9338(8)	25(4)
C38	9817(4)	-8530(60)	8890(10)	82(12)
C39	9673(6)	-8910(70)	8238(10)	44(6)
C40	9311(7)	-7710(80)	8033(8)	130(30)
O41	10201(6)	-9340(60)	9131(12)	49(5)
O42	7964(6)	-2120(50)	8222(10)	41(4)
C51	2566(3)	13380(50)	2948(7)	44(6)
C52	2750(4)	11940(40)	3534(5)	26(4)
C53	3136(3)	11400(40)	3433(6)	17(3)
C54	3190(3)	12500(40)	2785(6)	16(3)
C62	2838(4)	13730(50)	2485(5)	30(4)
N55	3453(6)	12750(70)	2335(10)	47(6)
C61	2864(4)	14900(50)	1841(6)	26(4)
C56	3247(4)	14290(60)	1805(7)	34(5)
C57	3412(4)	15100(70)	1232(10)	68(10)
C58	3193(6)	16510(70)	696(8)	51(7)
C59	2810(6)	17130(70)	733(8)	71(10)
C60	2645(4)	16320(70)	1305(9)	58(8)
C63	3389(5)	10270(50)	4038(9)	19(3)
C64	3783(3)	9350(60)	4039(8)	81(12)

C65	3921(4)	8090(50)	4654(7)	36(5)
C66	4301(4)	7240(40)	4779(6)	21(4)
C67	4545(3)	7660(50)	4290(8)	38(5)
C68	4407(4)	8920(50)	3675(7)	36(5)
C69	4026(4)	9770(50)	3549(7)	29(4)
O70	4886(11)	5840(110)	4330(20)	89(10)
O71	2577(4)	11830(40)	4085(7)	18(3)
C72	2128(3)	14310(50)	2856(7)	41(5)
C73	1915(4)	13840(40)	2239(6)	20(4)
C74	1539(4)	14990(60)	2303(8)	58(8)
C75	1520(4)	16160(50)	2959(9)	37(5)
C83	1884(4)	15740(50)	3301(6)	23(4)
N76	1276(4)	17990(40)	3265(7)	21(3)
C82	1841(4)	17100(40)	3931(5)	35(5)
C77	1470(4)	18330(50)	3868(5)	26(4)
C78	1309(3)	19640(50)	4413(8)	49(7)
C79	1519(4)	19700(40)	5023(6)	23(4)
C80	1889(4)	18470(40)	5086(5)	20(4)
C81	2050(3)	17170(40)	4540(6)	21(4)
C84	1242(6)	15190(60)	1567(12)	29(4)
C85	896(4)	16160(50)	1462(8)	38(6)
C86	755(5)	15490(60)	817(8)	64(9)
C87	390(5)	16520(60)	595(7)	49(7)
C88	165(4)	18230(50)	1019(9)	27(4)
C89	305(4)	18890(50)	1665(8)	63(9)
C90	671(4)	17860(50)	1886(7)	21(4)
O91	-169(7)	18650(70)	817(13)	53(5)
O92	2030(5)	12180(50)	1792(9)	33(4)
C101	10609(7)	-12320(60)	8307(12)	29(5)
C102	-592(11)	22390(110)	1630(20)	59(8)

Таблица 5

Атом	Атом	Длина, Å		Атом	Атом	Длина, Å
C1	C2	1,4200		C51	C52	1,4200
C1	C12	1,4200		C51	C62	1,4200
C1	C22	1,434(18)		C51	C72	1,586(15)
C2	C3	1,4200		C52	C53	1,4200
C2	O21	1,13(4)		C52	O71	1,333(17)
C3	C4	1,4200		C53	C54	1,4200
C3	C13	1,36(6)		C53	C63	1,52(2)
C4	C12	1,4200		C54	C62	1,4200
C4	N5	1,325(18)		C54	N55	1,373(18)
C12	C11	1,418(15)		C62	C61	1,400(14)
N5	C6	1,362(18)		N55	C56	1,380(19)
C11	C6	1,3900		C61	C56	1,3900
C11	C10	1,3900		C61	C60	1,3900
C6	C7	1,3900		C56	C57	1,3900
C7	C8	1,3900		C57	C58	1,3900
C8	C9	1,3900		C58	C59	1,3900
C9	C10	1,3900		C59	C60	1,3900
C13	C14	1,47(5)		C63	C64	1,44(2)
C14	C15	1,3900		C64	C65	1,3900
C14	C19	1,3900		C64	C69	1,3900
C15	C16	1,3900		C65	C66	1,3900
C16	C17	1,3900		C66	C67	1,3900
C17	C18	1,3900		C67	C68	1,3900
C17	O20	1,48(4)		C67	O70	1,39(4)
C18	C19	1,3900		C68	C69	1,3900
C22	C23	1,4200		C72	C73	1,4200
C22	C33	1,4200		C72	C83	1,4200
C23	C24	1,4200		C73	C74	1,4200
C23	O42	1,33(2)		C73	O92	1,21(2)
C24	C25	1,4200		C74	C75	1,4200
C24	C34	1,33(2)		C74	C84	1,76(3)

C25	C33	1,4200		C75	C83	1,4200
C25	N26	1,36(2)		C75	N76	1,314(15)
C33	C32	1,422(15)		C83	C82	1,409(13)
N26	C27	1,39(2)		N76	C77	1,360(15)
C32	C27	1,3900		C82	C77	1,3900
C32	C31	1,3900		C82	C81	1,3900
C27	C28	1,3900		C77	C78	1,3900
C28	C29	1,3900		C78	C79	1,3900
C29	C30	1,3900		C79	C80	1,3900
C30	C31	1,3900		C80	C81	1,3900
C34	C35	1,54(2)		C84	C85	1,28(2)
C35	C36	1,3900		C85	C86	1,3900
C35	C40	1,3900		C85	C90	1,3900
C36	C37	1,3900		C86	C87	1,3900
C37	C38	1,3900		C87	C88	1,3900
C38	C39	1,3900		C88	C89	1,3900
C38	O41	1,44(3)		C88	O91	1,23(3)
C39	C40	1,3900		C89	C90	1,3900

Таблица 6

Атом	Атом	Атом	Угол, °		Атом	Атом	Атом	Угол, °
C2	C1	C22	130,7(14)		C52	C51	C62	108,0
C12	C1	C2	108,0		C52	C51	C72	123,7(12)
C12	C1	C22	121,3(14)		C62	C51	C72	128,3(11)
C1	C2	C3	108,0		C53	C52	C51	108,0
O21	C2	C1	126(2)		O71	C52	C51	120,8(12)
O21	C2	C3	125(2)		O71	C52	C53	130,2(11)
C2	C3	C13	121(3)		C52	C53	C54	108,0
C4	C3	C2	108,0		C52	C53	C63	115,3(11)
C4	C3	C13	130(3)		C54	C53	C63	136,1(11)
C12	C4	C3	108,0		C62	C54	C53	108,0
N5	C4	C3	126,4(17)		N55	C54	C53	143,5(12)
N5	C4	C12	121,5(17)		N55	C54	C62	108,4(12)

C1	C12	C4	108,0		C54	C62	C51	108,0
C11	C12	C1	157,9(15)		C61	C62	C51	139,9(12)
C11	C12	C4	92,2(14)		C61	C62	C54	112,1(12)
C4	N5	C6	102,3(17)		C54	N55	C56	102,1(15)
C6	C11	C12	116,0(14)		C56	C61	C62	98,5(12)
C6	C11	C10	120,0		C56	C61	C60	120,0
C10	C11	C12	124,0(14)		C60	C61	C62	141,5(12)
N5	C6	C11	106,3(14)		N55	C56	C61	118,6(14)
N5	C6	C7	133,5(14)		N55	C56	C57	121,3(14)
C11	C6	C7	120,0		C57	C56	C61	120,0
C8	C7	C6	120,0		C56	C57	C58	120,0
C9	C8	C7	120,0		C57	C58	C59	120,0
C8	C9	C10	120,0		C58	C59	C60	120,0
C9	C10	C11	120,0		C59	C60	C61	120,0
C14	C13	C3	148(5)		C64	C63	C53	124,7(15)
C15	C14	C13	127(3)		C65	C64	C63	110,1(12)
C15	C14	C19	120,0		C65	C64	C69	120,0
C19	C14	C13	113(3)		C69	C64	C63	129,8(12)
C16	C15	C14	120,0		C66	C65	C64	120,0
C15	C16	C17	120,0		C65	C66	C67	120,0
C16	C17	C18	120,0		C68	C67	C66	120,0
C16	C17	O20	111(4)		O70	C67	C66	120(2)
C18	C17	O20	128(4)		O70	C67	C68	117(2)
C19	C18	C17	120,0		C67	C68	C69	120,0
C18	C19	C14	120,0		C68	C69	C64	120,0
C23	C22	C1	121,1(14)		C73	C72	C51	120,8(11)
C23	C22	C33	108,0		C83	C72	C51	131,1(12)
C33	C22	C1	130,8(14)		C83	C72	C73	108,0
C22	C23	C24	108,0		C74	C73	C72	108,0
O42	C23	C22	128,9(16)		O92	C73	C72	123,1(14)
O42	C23	C24	120,3(16)		O92	C73	C74	127,7(14)
C25	C24	C23	108,0		C73	C74	C75	108,0
C34	C24	C23	120,8(15)		C73	C74	C84	115,5(12)

C34	C24	C25	131,0(15)		C75	C74	C84	135,8(12)
C24	C25	C33	108,0		C83	C75	C74	108,0
N26	C25	C24	144,7(17)		N76	C75	C74	135,0(13)
N26	C25	C33	106,8(17)		N76	C75	C83	115,8(13)
C22	C33	C32	142,3(15)		C75	C83	C72	108,0
C25	C33	C22	108,0		C82	C83	C72	148,2(12)
C25	C33	C32	109,4(15)		C82	C83	C75	103,7(12)
C25	N26	C27	108(2)		C75	N76	C77	100,4(13)
C27	C32	C33	104,1(14)		C77	C82	C83	102,8(11)
C27	C32	C31	120,0		C77	C82	C81	120,0
C31	C32	C33	135,9(14)		C81	C82	C83	136,9(11)
C32	C27	N26	110,5(15)		N76	C77	C82	116,6(12)
C28	C27	N26	128,9(15)		N76	C77	C78	123,3(12)
C28	C27	C32	120,0		C82	C77	C78	120,0
C27	C28	C29	120,0		C77	C78	C79	120,0
C30	C29	C28	120,0		C80	C79	C78	120,0
C29	C30	C31	120,0		C81	C80	C79	120,0
C30	C31	C32	120,0		C80	C81	C82	120,0
C24	C34	C35	139,2(18)		C85	C84	C74	130,3(19)
C36	C35	C34	121,2(14)		C84	C85	C86	111,1(15)
C36	C35	C40	120,0		C84	C85	C90	128,8(15)
C40	C35	C34	118,7(14)		C86	C85	C90	120,0
C35	C36	C37	120,0		C85	C86	C87	120,0
C38	C37	C36	120,0		C86	C87	C88	120,0
C37	C38	O41	115,8(15)		C89	C88	C87	120,0
C39	C38	C37	120,0		O91	C88	C87	116,3(18)
C39	C38	O41	123,8(15)		O91	C88	C89	123,1(18)
C38	C39	C40	120,0		C90	C89	C88	120,0
C39	C40	C35	120,0		C89	C90	C85	120,0

Таблица 7

A	B	C	D	Угол, °		A	B	C	D	Угол, °
C1	C2	C3	C4	0,0		C51	C52	C53	C54	0,0

C1	C2	C3	C13	171(3)		C51	C52	C53	C63	172,9(16)
C1	C12	C11	C6	152(4)		C51	C62	C61	C56	179,0(17)
C1	C12	C11	C10	-27(6)		C51	C62	C61	C60	-1(3)
C1	C22	C23	C24	176(2)		C51	C72	C73	C74	-178(2)
C1	C22	C23	O42	-23(3)		C51	C72	C73	O92	14(2)
C1	C22	C33	C25	-175(3)		C51	C72	C83	C75	178(2)
C1	C22	C33	C32	11(4)		C51	C72	C83	C82	2(3)
C2	C1	C12	C4	0,0		C52	C51	C62	C54	0,0
C2	C1	C12	C11	-155(5)		C52	C51	C62	C61	-180(2)
C2	C1	C22	C23	142,9(16)		C52	C51	C72	C73	-144,8(14)
C2	C1	C22	C33	-42(3)		C52	C51	C72	C83	38(2)
C2	C3	C4	C12	0,0		C52	C53	C54	C62	0,0
C2	C3	C4	N5	157(3)		C52	C53	C54	N55	-178(3)
C2	C3	C13	C14	173(7)		C52	C53	C63	C64	175,7(18)
C3	C4	C12	C1	0,0		C53	C54	C62	C51	0,0
C3	C4	C12	C11	171(2)		C53	C54	C62	C61	179,7(16)
C3	C4	N5	C6	-169,2(19)		C53	C54	N55	C56	-179,1(18)
C3	C13	C14	C15	-150(7)		C53	C63	C64	C65	-173,7(14)
C3	C13	C14	C19	32(10)		C53	C63	C64	C69	11(3)
C4	C3	C13	C14	-19(11)		C54	C53	C63	C64	-14(3)
C4	C12	C11	C6	-5,0(15)		C54	C62	C61	C56	-0,5(16)
C4	C12	C11	C10	176,5(16)		C54	C62	C61	C60	179,8(17)
C4	N5	C6	C11	9(2)		C54	N55	C56	C61	-4(3)
C4	N5	C6	C7	-175(2)		C54	N55	C56	C57	178,7(14)
C12	C1	C2	C3	0,0		C62	C51	C52	C53	0,0
C12	C1	C2	O21	-172(3)		C62	C51	C52	O71	169,7(16)
C12	C1	C22	C23	-36(3)		C62	C51	C72	C73	34(2)
C12	C1	C22	C33	139,2(18)		C62	C51	C72	C83	-143,8(14)
C12	C4	N5	C6	-15(3)		C62	C54	N55	C56	3(2)
C12	C11	C6	N5	-2(2)		C62	C61	C56	N55	3(2)
C12	C11	C6	C7	-179(2)		C62	C61	C56	C57	-179,8(15)
C12	C11	C10	C9	178(2)		C62	C61	C60	C59	180(2)
N5	C4	C12	C1	-158(3)		N55	C54	C62	C51	178,5(18)

N5	C4	C12	C11	12(2)		N55	C54	C62	C61	-2(2)
N5	C6	C7	C8	-175(3)		N55	C56	C57	C58	177(2)
C11	C6	C7	C8	0,0		C61	C56	C57	C58	0,0
C6	C11	C10	C9	0,0		C56	C61	C60	C59	0,0
C6	C7	C8	C9	0,0		C56	C57	C58	C59	0,0
C7	C8	C9	C10	0,0		C57	C58	C59	C60	0,0
C8	C9	C10	C11	0,0		C58	C59	C60	C61	0,0
C10	C11	C6	N5	176(2)		C60	C61	C56	N55	-177(2)
C10	C11	C6	C7	0,0		C60	C61	C56	C57	0,0
C13	C3	C4	C12	-170(4)		C63	C53	C54	C62	-171(2)
C13	C3	C4	N5	-12(4)		C63	C53	C54	N55	12(3)
C13	C14	C15	C16	-177(4)		C63	C64	C65	C66	-176(2)
C13	C14	C19	C18	178(4)		C63	C64	C69	C68	175(2)
C14	C15	C16	C17	0,0		C64	C65	C66	C67	0,0
C15	C14	C19	C18	0,0		C65	C64	C69	C68	0,0
C15	C16	C17	C18	0,0		C65	C66	C67	C68	0,0
C15	C16	C17	O20	-167(5)		C65	C66	C67	O70	-159(3)
C16	C17	C18	C19	0,0		C66	C67	C68	C69	0,0
C17	C18	C19	C14	0,0		C67	C68	C69	C64	0,0
C19	C14	C15	C16	0,0		C69	C64	C65	C66	0,0
O20	C17	C18	C19	165(5)		O70	C67	C68	C69	160(3)
O21	C2	C3	C4	172(3)		O71	C52	C53	C54	-168,4(18)
O21	C2	C3	C13	-17(4)		O71	C52	C53	C63	5(2)
C22	C1	C2	C3	-179(2)		C72	C51	C52	C53	178,8(19)
C22	C1	C2	O21	9(4)		C72	C51	C52	O71	-11(2)
C22	C1	C12	C4	179(2)		C72	C51	C62	C54	-179(2)
C22	C1	C12	C11	24(6)		C72	C51	C62	C61	2(3)
C22	C23	C24	C25	0,0		C72	C73	C74	C75	0,0
C22	C23	C24	C34	175(2)		C72	C73	C74	C84	172,0(19)
C22	C33	C32	C27	177(2)		C72	C83	C82	C77	172(2)
C22	C33	C32	C31	-3(4)		C72	C83	C82	C81	-15(3)
C23	C22	C33	C25	0,0		C73	C72	C83	C75	0,0
C23	C22	C33	C32	-173(3)		C73	C72	C83	C82	-175(3)

C23	C24	C25	C33	0,0		C73	C74	C75	C83	0,0
C23	C24	C25	N26	170(5)		C73	C74	C75	N76	166(2)
C23	C24	C34	C35	175(2)		C73	C74	C84	C85	-179(2)
C24	C25	C33	C22	0,0		C74	C75	C83	C72	0,0
C24	C25	C33	C32	176(2)		C74	C75	C83	C82	177,5(15)
C24	C25	N26	C27	-177(2)		C74	C75	N76	C77	-174,2(15)
C24	C34	C35	C36	-169(2)		C74	C84	C85	C86	-172,5(19)
C24	C34	C35	C40	6(3)		C74	C84	C85	C90	11(4)
C25	C24	C34	C35	-11(4)		C75	C74	C84	C85	-10(4)
C25	C33	C32	C27	4,0(17)		C75	C83	C82	C77	-3,6(14)
C25	C33	C32	C31	-176,2(16)		C75	C83	C82	C81	169,7(15)
C25	N26	C27	C32	9(4)		C75	N76	C77	C82	6,2(18)
C25	N26	C27	C28	-179,5(19)		C75	N76	C77	C78	-169,9(13)
C33	C22	C23	C24	0,0		C83	C72	C73	C74	0,0
C33	C22	C23	O42	161(3)		C83	C72	C73	O92	-168,4(19)
C33	C25	N26	C27	-6(4)		C83	C75	N76	C77	-9(2)
C33	C32	C27	N26	-8(3)		C83	C82	C77	N76	-1,5(15)
C33	C32	C27	C28	179,8(18)		C83	C82	C77	C78	174,7(14)
C33	C32	C31	C30	-180(3)		C83	C82	C81	C80	-172(2)
N26	C25	C33	C22	-174(3)		N76	C75	C83	C72	-169,2(19)
N26	C25	C33	C32	1(3)		N76	C75	C83	C82	8(2)
N26	C27	C28	C29	-171(3)		N76	C77	C78	C79	176,0(17)
C32	C27	C28	C29	0,0		C82	C77	C78	C79	0,0
C27	C32	C31	C30	0,0		C77	C82	C81	C80	0,0
C27	C28	C29	C30	0,0		C77	C78	C79	C80	0,0
C28	C29	C30	C31	0,0		C78	C79	C80	C81	0,0
C29	C30	C31	C32	0,0		C79	C80	C81	C82	0,0
C31	C32	C27	N26	172(3)		C81	C82	C77	N76	-176,2(16)
C31	C32	C27	C28	0,0		C81	C82	C77	C78	0,0
C34	C24	C25	C33	-175(2)		C84	C74	C75	C83	-170(2)
C34	C24	C25	N26	-4(5)		C84	C74	C75	N76	-3(3)
C34	C35	C36	C37	176(2)		C84	C85	C86	C87	-177(2)
C34	C35	C40	C39	-176(2)		C84	C85	C90	C89	176(2)

C35	C36	C37	C38	0,0		C85	C86	C87	C88	0,0
C36	C35	C40	C39	0,0		C86	C85	C90	C89	0,0
C36	C37	C38	C39	0,0		C86	C87	C88	C89	0,0
C36	C37	C38	O41	173(2)		C86	C87	C88	O91	-171(2)
C37	C38	C39	C40	0,0		C87	C88	C89	C90	0,0
C38	C39	C40	C35	0,0		C88	C89	C90	C85	0,0
C40	C35	C36	C37	0,0		C90	C85	C86	C87	0,0
O41	C38	C39	C40	-173(2)		O91	C88	C89	C90	170(2)
O42	C23	C24	C25	-163(2)		O92	C73	C74	C75	168(2)
O42	C23	C24	C34	13(2)		O92	C73	C74	C84	-20(2)

Примечания и пояснения

При обработке собранных данных по дифракции установили, что кристалл является множественно сдвоенным, и поэтому пришлось использовать адекватные процедуры, реализованные производителем программного обеспечения. Параметры уточнения модели структуры (R_1 , wR_2 , GoF) (Таблица 4) далеки от удовлетворительных, но тот факт, что исходная модель, полученная в ходе решения фазовой задачи, согласовывалась с ожиданиями и была химически последовательной, убедительно свидетельствует о том, что предполагаемая модель структуры является правильной. Кроме того, модель имела относительно стабильное поведение во время уточнения, а это означает, что разрушения модели не произошло, хотя это часто происходит, когда модель конструкции не соответствует реальности.

Предложенная модель структуры предполагает симметрию решетки, соответствующую пространственной группе Pc . Асимметричная ячейка содержит две молекулы анализируемого соединения (Фиг. 8A).

Каждая из молекул состоит из двух преимущественно компланарных фрагментов. Следовательно, торсионные углы в значительной степени определяют конформацию анализируемых молекул: $C2-C1-C22-C23$ $-142,9(16)^\circ$ и $C52-C51-C72-C73$ $-144,8(14)^\circ$, соответственно.

Величина расстояния между концевыми гидроксильными атомами кислорода O20 и O70, составляющая $2,71 \text{ \AA}$, предполагает наличие водородной связи между атомами.

В модели отмечены два несвязанных ковалентно атома C101 и C102, предварительно отнесенные к атомам углерода. Это могли быть артефакты, связанные с качеством полученных данных, но величины расстояния их от гидроксильных атомов кислорода (O41-C101) и (O91-C102), составляющее 2,679 Å и 2,734 Å, соответственно, позволяют предположить, что в этом месте могут присутствовать водородные связи. Поэтому можно предположить, что это атомы кислорода, находящиеся в остаточных молекулах растворителя.

Пример 9

Образец сцитонемина, полученный в соответствии с Примером 1, растворяли в ДМСО (диметилсульфоксид) до концентрации 1% по массе, а затем, с помощью спектрофотометра (Varian, модель: CARY 100 Scan), используемого в соответствии со стандартными процедурами от производителя, измеряли поглощение для двух длин волн (305 и 393 нм) в кювете толщиной 1 см. Получены следующие результаты измерений:

Поглощение УФ-излучения и коэффициенты экстинкции:

- Удельная экстинкция (1% раствор, при 305 нм): 330
- Удельная экстинкция (1% раствор, при 393 нм): 730

Список литературы

Proteau PJ, Gerwick WH, Garcia-Pichel F, Castenholz R. *Experientia* 1993, 49, 825-829.

Fleming ED, Castenholz RW. 2007. Effects of periodic desiccation on the synthesis of the UV-screening compound, scytonemin, in cyanobacteria. *Environ Microbiol* 9: 1448-1455.

Rastogi RP, Incharoensakdi A. 2014. Characterization of UV-screening compounds, mycosporine-like amino acids, and scytonemin in the cyanobacterium *Lyngbya* sp. CU2555. *FEMS Microbiology Ecology* 87: 244-256.

Wolk CP. (1988) Purification and storage of nitrogen fixing filamentous cyanobacteria. *Methods Enzymol.*, 167, pp. 93-100

Anahas AMP, Muralitharan G (2015) Isolation and screening of heterocystous cyanobacterial strains for biodiesel production by evaluating the fuel properties from fatty acid methyl ester (FAME) profiles. *Bioresource technology* 184:9-17. doi:<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.11.003>

Balskus EP, Case RJ, Walsh CT (2011) The biosynthesis of cyanobacterial sunscreen scytonemin in intertidal microbial mat communities. *FEMS Microbiol Ecol* 77 (2):322-332. doi:[10.1111/j.1574-6941.2011.01113.x](https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2011.01113.x)

Rippka R, Deruelles J, Waterbury JB (1979) Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *Journal of General Microbiology* 111 (1):1-61

Singh J, Tripathi R, Thakur IS (2014) Characterization of endolithic cyanobacterial strain, *Leptolyngbya* sp. ISTCY101, for prospective recycling of CO₂ and biodiesel production. *Bioresource technology* 166:345-352. doi:<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.05.055>

Greiter F, (1974) Sun protection factor-development methods. *Parf Kosm.* 55:70-75

Rigaku Oxford Diffraction 2018, CrysAlisPro Software system, version 1.171.64.93a, Rigaku Corporation, Oxford, UK.

Sheldrick GM, SHELXT-Integrated Space-Group and Crystal-Structure Determination, *Acta Crystallographica Section A* 2015, A71, 3-8.

Sheldrick GM, Crystal structure refinement with SHELXL *Acta Crystallographica, Section C* 2015, C71, 3-8.

Macrae CF, Sovago I, Cottrell SJ, Galek PTA, McCabe P, Pidcock E, Platings M, Shields GP, Stevens JS, Towler M and Wood PA, Mercury 4.0: from visualization to analysis, design and prediction, *J. Appl. Cryst.* 2020, 53, 226-235.



**BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS
FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE**

STATEMENT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT

Tratado de Budapest sobre el reconocimiento internacional de depósito de microorganismos con el propósito de gestionar la declaración de patente en caso de depósito original

INTERNATIONAL FORM

TO Name: UVERA S.A. Address: ul. Dr. Jana Muszynskiego 2 / 3.18 90-151 Lodz, Poland		RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT issued pursuant to Rule 7.1 by the SPANISH BANK OF ALGAE (BEA) identified at the bottom of this page <i>Recibo de depósito original según la norma 7.1 de la Autoridad internacional de Depósito identificada en la parte inferior de esta página</i>
I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM / identificación del microorganismo		
Identification reference given by the DEPOSITOR / referencia identificativa dada por el depositante: Chaococcidiopsis UVERA_03	Accession number given by the BEA / número de acceso dado por el BEA: BEA_IDA_00688	
II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION / descripción científica y/o designación taxonómica propuesta		
The microorganism identified under I above was accompanied by / el microorganismo descrito en I arriba se acompañó de: <input type="checkbox"/> a scientific description / descripción científica <input checked="" type="checkbox"/> a proposed taxonomic designation / designación taxonómica propuesta (Mark with a cross where applicable)		
III. RECEIPT AND ACCEPTANCE / recepción y aceptación		
BEA accepts the microorganisms identified under I above, which was received by it on / BEA acepta el microorganismo identificado arriba, el cual se recibió el 2 nd of October 2019. (date of the original deposit *)		
IV. RECEIPT OF REQUEST FOR CONVERSION		
The microorganism identified under I above was received by BEA on (not applicable) (date of the original deposit) and a request to convert the original deposit to a deposit under the Budapest Treaty was received by it on (not applicable) (date of receipt of request for conversion)		
V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY		
Banco Español de Algas (BEA) Universidad de Las Palmas de GC Muelle de Taliarte, s/n 35214 Telde - Las Palmas España	Date / fecha: 2 nd of October 2019 Curator of BEA culture collection Curador de la colección de cultivo BEA Dr. Anlira María Quiñana	Legal representative Representante legal Dr. José Pablo Sureda Vice-Chancellor for Research, Development and Innovation

* Where Rule 6.4(d) applies, such date is the date on which the status of international depositary authority was acquired



**BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS
FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE**

Tratado de Budapest sobre el reconocimiento internacional de depósito de microorganismos a los fines de patente

INTERNATIONAL FORM

<p>TO</p> <p>Name: UVERA S.A.</p> <p>Address: ul. Dr. Jana Muszynskiego 2 / 3 16 90-151 Lodz Poland</p>
--

VIABILITY STATEMENT
issued pursuant to Rule 10.2 by the
SPANISH BANK OF ALGAE
identified on the following page

*Declaración de viabilidad emitida por el Banco Español de Algas
conforme a la Norma 10.2 en la siguiente página conforme*

I. DEPOSITOR / depositante	II. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM / identificación del microorganismo
<p>Name/nombre: UVERA S.A.</p> <p>Address/dirección: ul. Dr. Jana Muszynskiego 2 / 3 16 90-151 Lodz Poland</p>	<p>BNA accession number: BEA_IDA_00688</p> <p>Date of the deposit or the transfer /¹ Fecha de depósito o transferencia: 2nd of October 2019</p>
<p>III. VIABILITY STATEMENT / declaración de viabilidad</p> <p>The viability of the microorganism under I. above was tested on / la viabilidad del microorganismo descrito en II se analizó el 2nd of October 2019². On that date, the said microorganism was / en esta fecha el susodicho microorganismo fue</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> Viable / viable</p> <p><input type="checkbox"/> No longer viable / no viable</p>	

¹ Indicate the date of the original deposit or, where a new deposit or a transfer has been made, the most recent relevant date (date of the new depositor or date of the transfer)

² In the cases referred to in Rule 10.2 (a) (i), (ii) and (iii), refer to the most recent viability test.

³ Mark with a cross the applicable box.



BANCO ESPAÑOL DE ALGAS
 BANCO ESPAÑOL DE ALGAS



UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS
 DE GRAN CANARIA

IV. CONDITIONS UNDER WHICH THE VIABILITY TEST HAS BEEN PERFORMED* <i>Condiciones en las que se ha realizado el test de viabilidad</i>	
Test of viability was performed by subculturing the strain <i>Chroococcidiopsis UVERA_03</i> in liquid BG11 (Rippka et al. 1979) (25°C, 55 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 14:10 (light:dark) photoperiod) and cryopreserving (Brand J: Protocols in: www.cyanosite.bio.purdue.edu/protocols/oryo.html). After several subculturing and thawing, respectively, the culture showed to be viable.	
V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY <i>Autoridad internacional de depósito</i>	
Banco Español de Algas (BEA) Universidad de Las Palmas de G.C. Muelle de Taliarte s/n 35214 Telde – Las Palmas Spain	Date/ fecha: 2 nd of October 2019 Curator BEA culture collection Curador de la colección de cultivos BEA  Dr. Antera Martel Quintana
	Legal representative of University of Las Palmas de Gran Canaria Representante legal de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria  Dr. José Pablo Suárez Rodríguez Vice-Chancellor for Research, Innovation & technology transfer

* Fill in the information has been requested and if the results of the test were negative



BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS
FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

STATEMENT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT

Tratado de Budapest sobre el reconocimiento internacional de depósito de microorganismos con el propósito de gestionar la declaración de patente en caso de depósito original

INTERNATIONAL FORM

<p>TO</p> <p>Name: UVERA S.A.</p> <p>Address: Muszynskiego 2 suite 3.18 90-151 Lodz Poland</p>		<p>RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT issued pursuant to Rule 7.1 by the SPANISH BANK OF ALGAE (BEA) Identified at the bottom of this page</p> <p><i>Recibo de depósito original según la norma 7.1 de la Autoridad internacional de Depósito identificada en la parte inferior de esta página</i></p>
<p>I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM / identificación del microorganismo</p>		
<p>Identification reference given by the DEPOSITOR / referencia identificativa dada por el depositante: UVERA_02</p>	<p>Accession number given by the BEA / número de acceso dado por el BEA BEA_JDA_0075B</p>	
<p>II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION / descripción científica y/o designación taxonómica propuesta</p>		
<p>The microorganism identified under I above was accompanied by: <i>el microorganismo descrito en I arriba se acompañó de:</i></p> <p><input type="checkbox"/> a scientific description / descripción científica <input checked="" type="checkbox"/> a proposed taxonomic designation / descripción taxonómica propuesta (Mark with a cross where applicable)</p>		
<p>III. RECEIPT AND ACCEPTANCE / recepción y aceptación</p>		
<p>BEA accepts the microorganism(s) identified under I above, which was received by it on / BEA acepta el microorganismo(s) identificado arriba, el cual se recibió e 5th of October 2020. (date of the original deposit¹)</p>		
<p>IV. RECEIPT OF REQUEST FOR CONVERSION</p>		
<p>The microorganism identified under I above was received by BEA on (not applicable) (date of the original deposit) and a request to convert the original deposit to a deposit under the Budapest Treaty was received by it on (not applicable) (date of receipt of request for conversion)</p>		
<p>V. INTERNATIONAL DEPOSITORY AUTHORITY</p>		
<p>Banco Español de Algas (BEA) Universidad de Las Palmas de GC Muelle de Taliara, s/n 35214 Telde - Las Palmas España</p>	<p>Date/ fecha: 5th of October 2020</p> <p>Curator of BEA culture collection Curaador de la colección de cultivo BEA</p> <p></p> <p>Dr. Arlene Mariel Quintana</p>	<p>Legal representative of the University of Las Palmas de Gran Canaria Representante legal de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria</p> <p></p> <p>Dr. José Pablo Suárez Riano Vice-Chancellor for Research, Development and Innovation</p>

¹ Where Rule 5.4(d) applies, such date is the date on which the initial international depository authority was acquired



**BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS
FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE**

Tratado de Budapest sobre el reconocimiento internacional de depósito de microorganismos a los fines de patente

INTERNATIONAL FORM

<p>TO</p> <p>Name: UVERA S.A.</p> <p>Address: Muszynskiego 2 suite 3.18 90-151 Lodz Poland</p>

VIABILITY STATEMENT
issued pursuant to Rule 10.2 by the
SPANISH BANK OF ALGAE
identified on the following page

*Declaración de viabilidad emitida por el Banco Español de Algas
conforme a la Norma 10.2 en la siguiente página conforme*

I. DEPOSITOR / depositante	II. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM / identificación del microorganismo
<p>Name/Nombre: UVERA S.A.</p> <p>Address/Dirección: Muszynskiego 2 / 3.18 90-151 Lodz Poland</p>	<p>BNA accession number: BEA_IDA_00758</p> <p>Date of the deposit or the transfer / Fecha de depósito o transferencia: 5th of October 2020</p>
III. VIABILITY STATEMENT / declaración de viabilidad	
<p>The viability of the microorganism under I above was tested on / la viabilidad del microorganismo descrito en II se analizó el 2nd of October 2019¹. On that date, the said microorganism was / en esta fecha el susodicho microorganismo fue:</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> Viable / viable</p> <p><input type="checkbox"/> No longer viable / no viable</p>	

1 Indicate the date of the original deposit or, here a new deposit or a transfer has been made, the most recent relevant date (date of the new deposit or date of the transfer)

2 In the cases referred to in Rule 10.2 (a) (ii) and (iii), refer to the most recent viability test

3 Mark with a cross the applicable box



IV. CONDITIONS UNDER WHICH THE VIABILITY TEST HAS BEEN PERFORMED* <i>Condiciones en las que se ha realizado el test de viabilidad</i>	
Viability test was performed under conditions described by the depositor in the BPY1 form	
V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY <i>Autoridad internacional de depósito</i>	
Banco Español de Algas (BEA) Universidad de Las Palmas de G.C. Muelle de Taliarte, s/n 35214 Telde – Las Palmas Spain	Date/ fecha: 5 th of October 2020 Curator BEA culture collection <i>Curaador de la colección de cultivos BEA</i>  Dr. Antera Medel Quintana I.D.I. 827
	Legal representative of University of Las Palmas de Gran Canaria <i>Representante legal de la Universidad Las Palmas de Gran Canaria</i>  Dr. José Pablo Suárez Ballesteros Vice-Chancellor for Research, Innovation & Technology Transfer

* Fill in the information has been requested and if the results of the test were negative

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ выделения и культивирования штаммов *Cyanobacteria*, в частности штаммов, депонированные в Banco Espanol de Algas Universidad de Las Palmas de GC под номерами BEA_IDA_0068B или BEA_IDA_0075B, где способ предусматривает:

а) приготовление питательной среды для роста бактерий путем обогащения ее микро- и макроэлементами, обнаруженными в природном песчанике нубийских формаций со следующим составом, выраженным в массовых процентах: 97,6% кварца, 0,4% мусковита-биотита, 1,2% апатита и 0,8% других минералов, присутствующих в следовых количествах, в количестве 200 г на 1000 мл раствора водной среды следующего состава, из расчета на 1000 мл среды: 1,5 г NaNO_3 , 0,04 г K_2HPO_4 , 0,075 г $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 0,036 г $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$, 6,0 мг лимонной кислоты, 6,0 мг железо-аммонийный цитрата, 1 мг ЭДТА, 0,02 г Na_2CO_3 , 1 мл смеси микроэлементов А5 следующего состава, из расчета на 1000 мл водного раствора смеси А5: 2,86 г H_3BO_3 , 1,81 г $\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$, 0,222 г $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 0,39 г $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$, 0,079 г $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$, 49,4 мг $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$, с последующим перемешиванием полученной суспензии в течение 24 часов при 25°C и последующим 5-часовым отстаиванием при 25°C и ее фильтрованием,

б) сбор бактерий из окружающей среды;

с) пассирование биологического материала, собранного на стадии б), в жидкой среде, полученной на стадии а), имеющей состав, указанный в Таблице 1, обогащенной камнем, дополненной агаром с конечным содержанием его от 2% по массе в начале процесса до 0,5% по массе в конце процесса, предпочтительно в течение трех промежуточных стадий по 4 недели на каждой из пяти стадий, т.е. двух крайних стадий (начальной и конечной) и трех промежуточных стадий, при этом питательная среда на промежуточных стадиях дополнена агаром соответственно в следующих количествах: 1,75%, 1,5%, 1% по массе, по отношению к среде, полученной на стадии а);

д) растворение культурального раствора, полученного на заключительной стадии с), то есть содержащего 0,5% агара, в водном растворе среды, состав которой указан на стадии А, но без добавления камня, и инкубирование при 25°C в течение 2 недель при перемешивании.

2. Новый бактериальный штамм, депонированный в Banco Espanol de Algas Universidad de Las Palmas de GC под номером BEA_IDA_0068B.

3. Новый бактериальный штамм, депонированный в Banco Espanol de Algas Universidad de Las Palmas de GC под номером BEA_IDA_0075B.

4. Применение штамма по п. 2 или 3 для получения пигмента, обладающего свойствами поглощения УФ-излучения, в частности сцитонемина, или его производных.

5. Применение по п.4, где полученный пигмент, в частности сцитонемин или его производные, применяют, для производства косметических продуктов, в частности для солнцезащитных кремов.

6. Среда для культивирования *Cyanobacteria*, содержащая в 1000 мл раствора водной среды 1,5 г NaNO_3 , 0,04 г K_2HPO_4 , 0,075 г $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 0,036 г $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$, 6,0 мг лимонной кислоты, 6,0 мг железо-аммонийный цитрата, 1 мг ЭДТА, 0,02 г Na_2CO_3 , 1 мл смеси микроэлементов А5 следующего состава, из расчета на 1000 мл водного раствора смеси А5: 2,86 г H_3BO_3 , 1,81 г $\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$, 0,222 г $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 0,39 г $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$, 0,079 г $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$, 49,4 мг $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$, где среда содержит природный нубийский песчаник со следующим составом, выраженным в массовых процентах: 97,6% кварца, 0,4% мусковит-биотита, 1,2% апатита и 0,8% других минералов в следовых количествах, в количестве 200 г молотого камня на 1000 мл среды.

7. Кристаллы сцитонемина, обладающие по меньшей мере одним свойством, выбранным из следующих:

- спектр рентгеновской порошковой дифракции с характерными пиками при значениях углов 2-тета: $2,500^\circ$, $4,589^\circ$, $5,062^\circ$, $8,630^\circ$ и $9,197^\circ$,

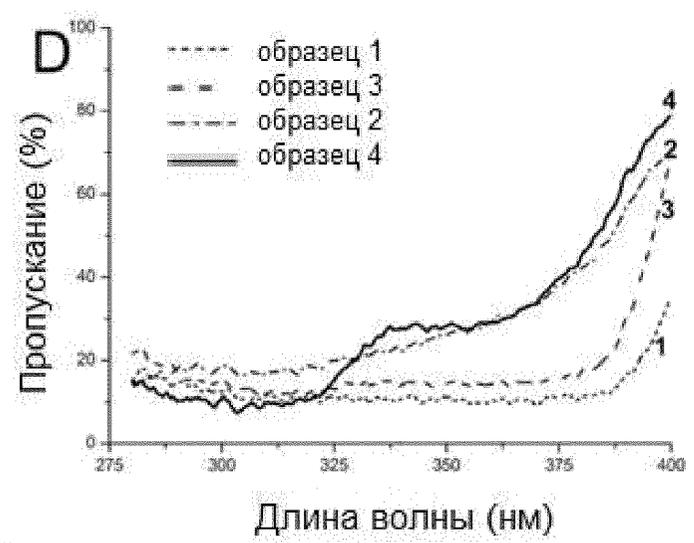
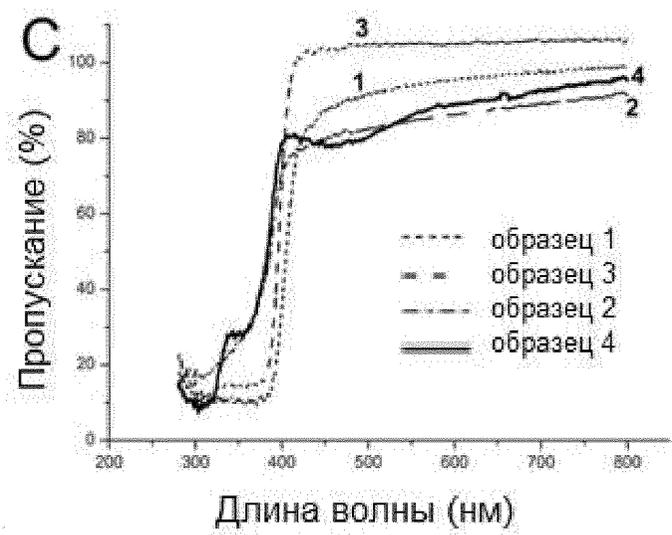
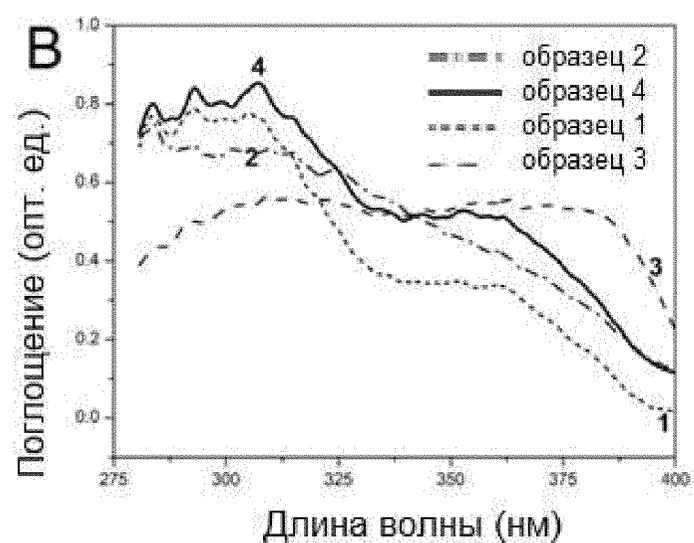
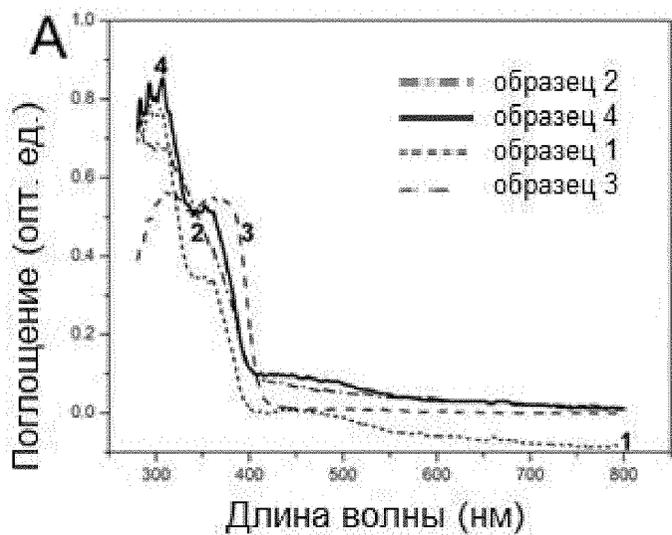
- специфические полосы инфракрасного поглощения при 3345, 3065, 2961, 2926, 1713, 1591, 1516, 1449, 1296, 1175, 1145, 957, 932, 930, 833 $[\text{см}^{-1}]$ в ИК-спектре (KBr),

- температура разложения в диапазоне от 365°C до $380,3^\circ\text{C}$ с пиком приблизительно при $380,3^\circ\text{C}$, согласно термогравиметрическому/дифференциальному термическому анализу при скорости нагрева/охлаждения $15/20^\circ\text{C}/\text{мин}$,

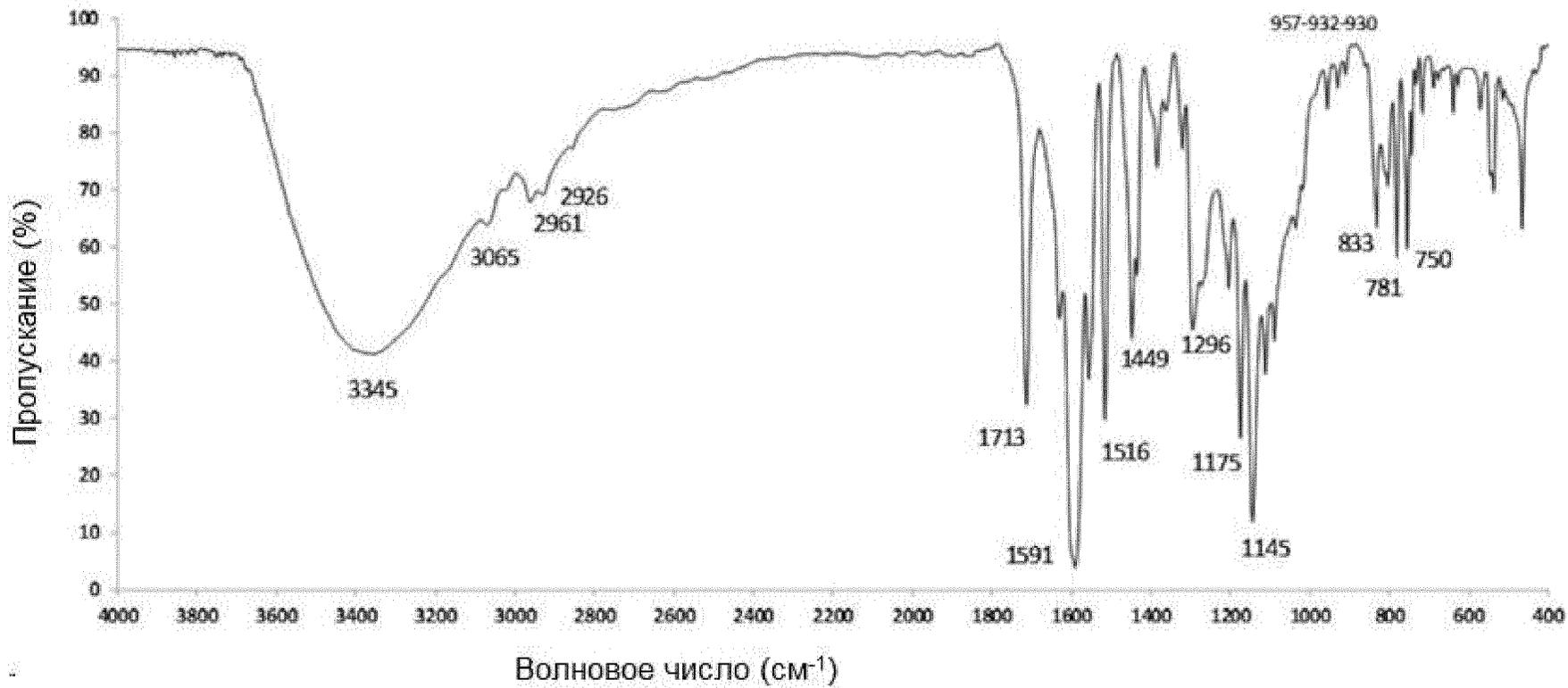
- спектр ^1H -ЯМР, записанный в пиридине- d_5 , содержащий сигналы при $\delta = 8,98$ м.д., 7,99 м.д., 7,86 м.д., 7,75 м.д., 7,48 м.д., 7,33 м.д. и 7,22 м.д.,

- модель структуры, основанная на результатах анализа методом рентгеновской дифракции (XRD), описываемая геометрическими параметрами, представленными в Таблицах 4-7, и представленная на Фигурах 8А-D.

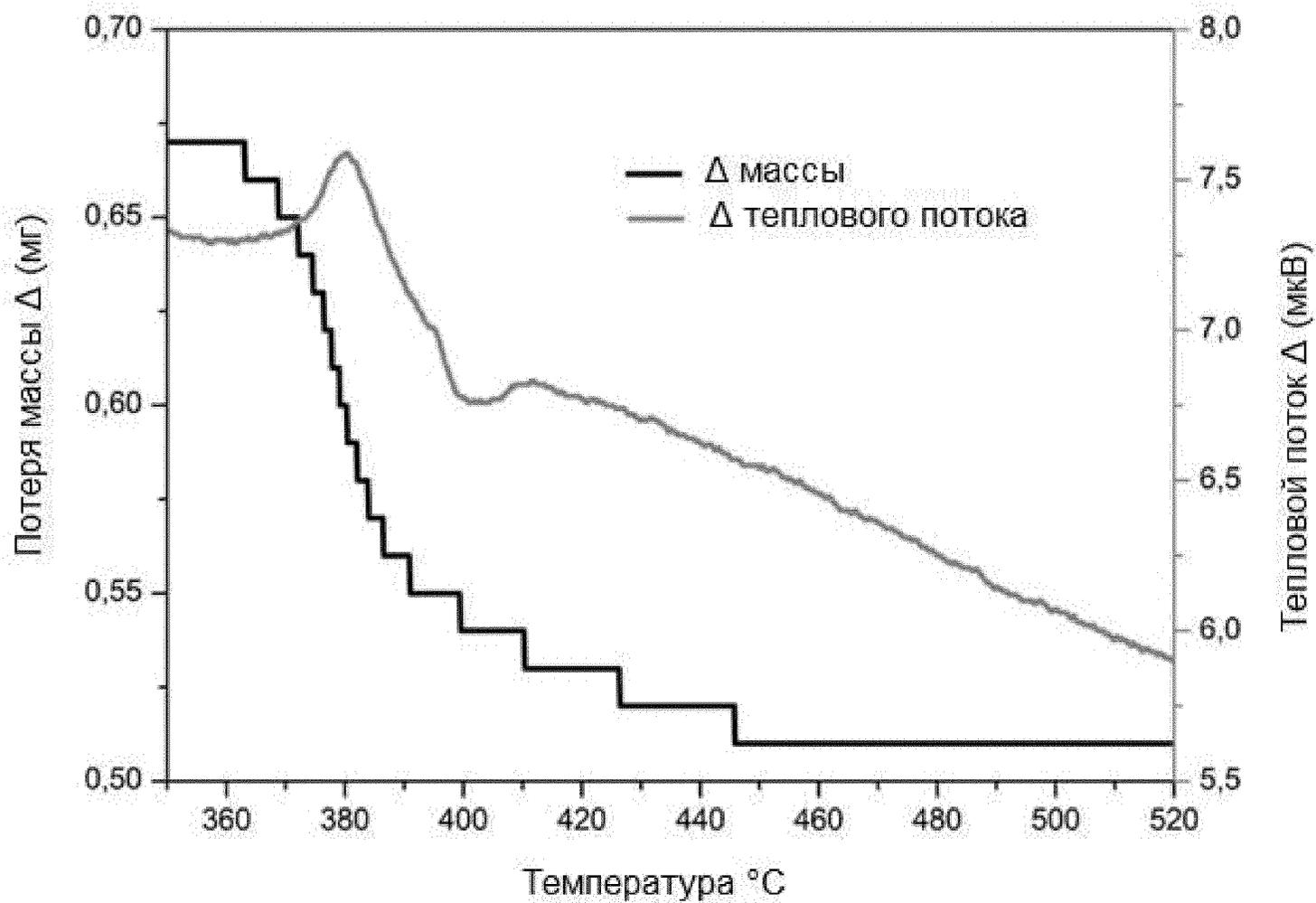
- удельная экстинкция 1% раствора в ДМСО при 393 нм: 730; и удельная экстинкция 1% раствора в ДМСО при 305 нм: 330.



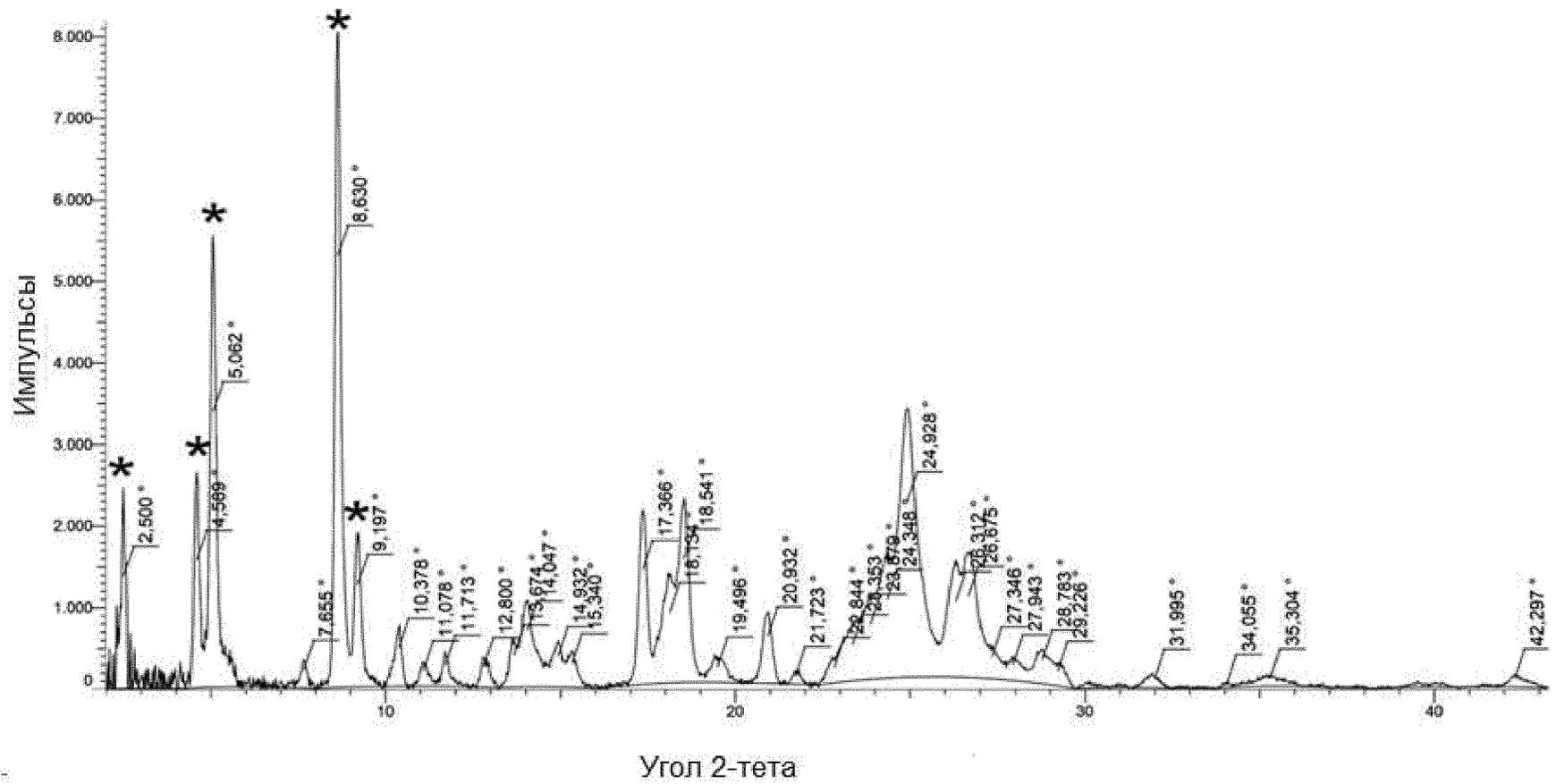
Фиг. 1



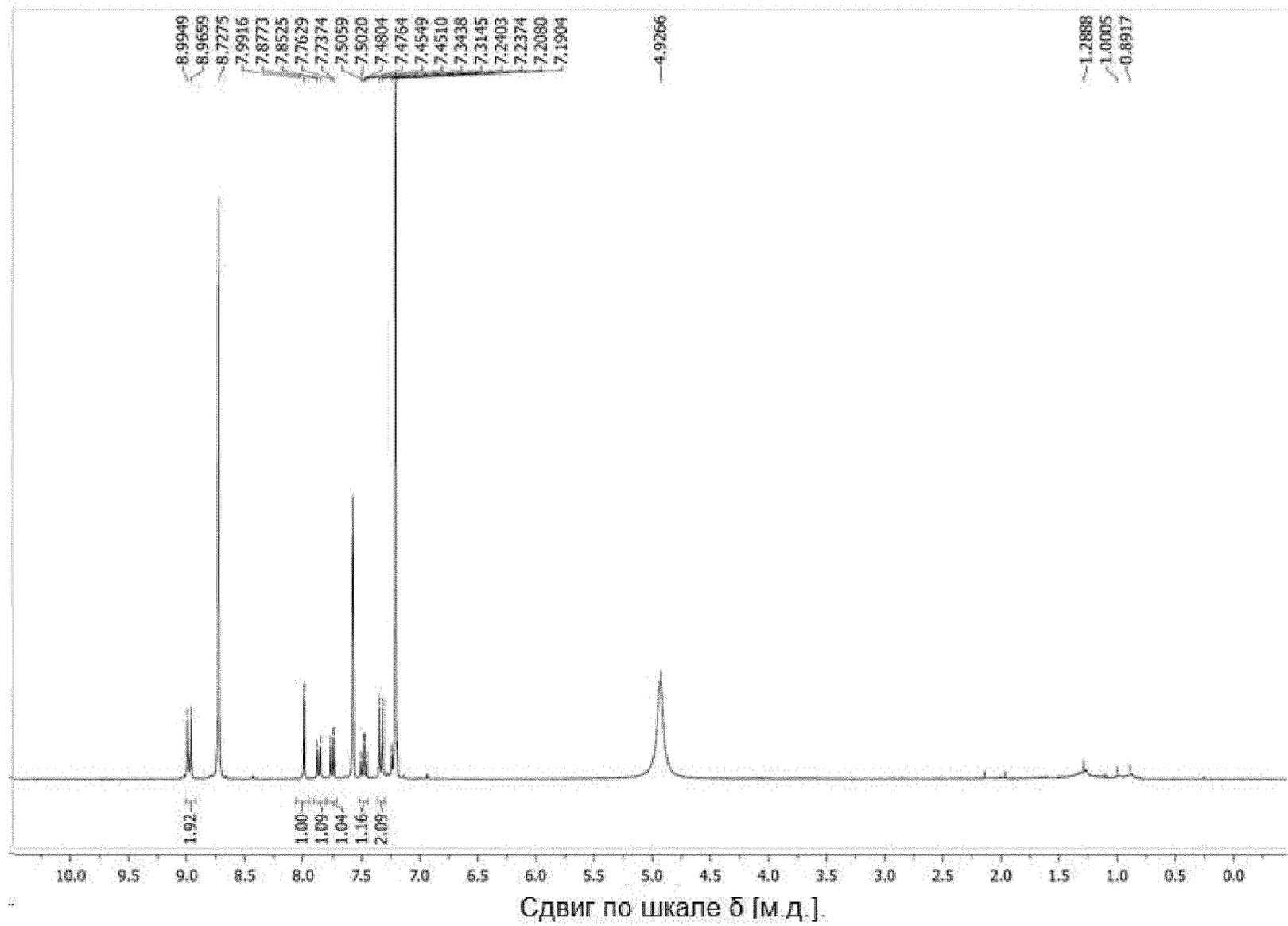
Фиг. 2



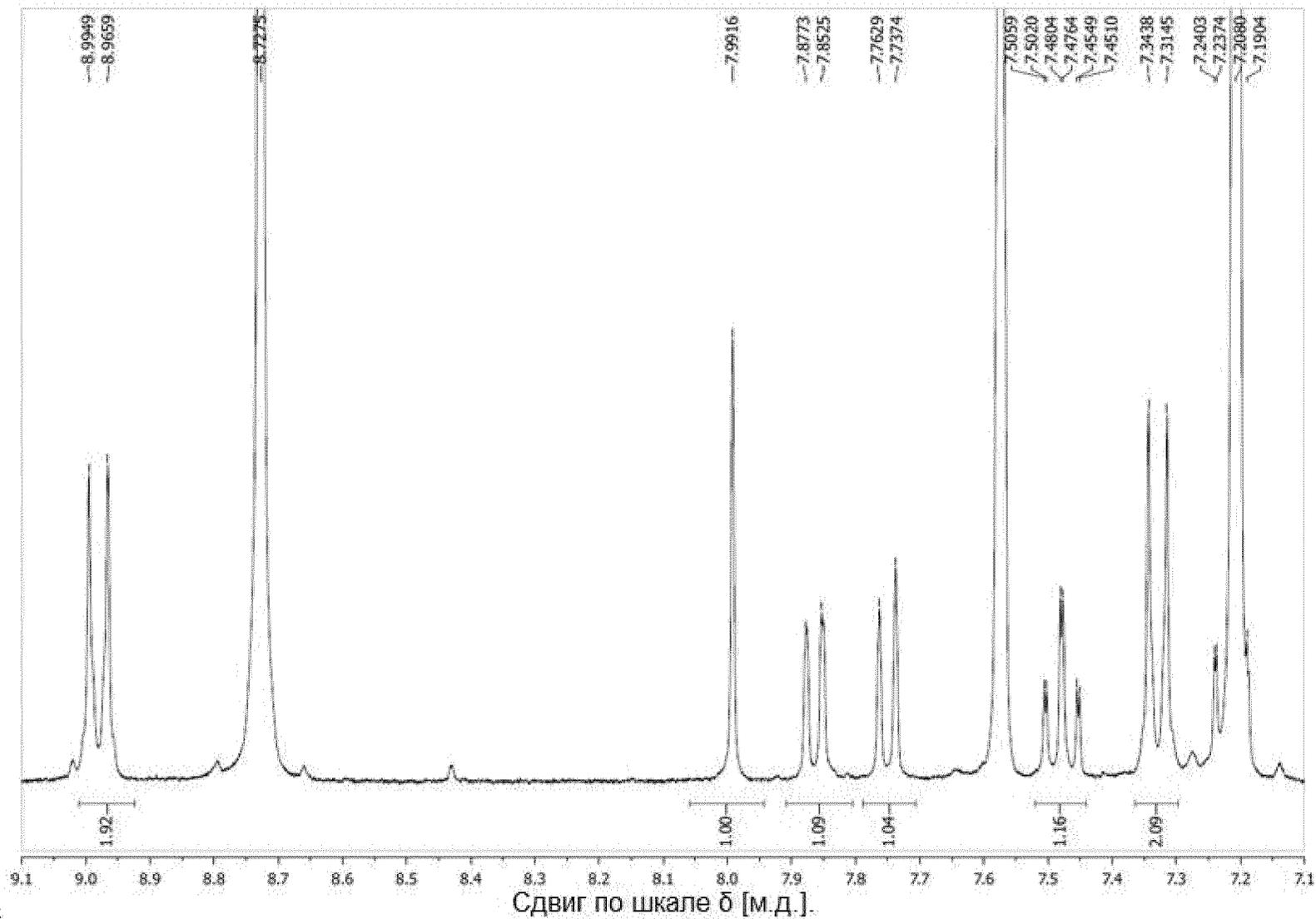
Фиг. 3



ФИГ. 4



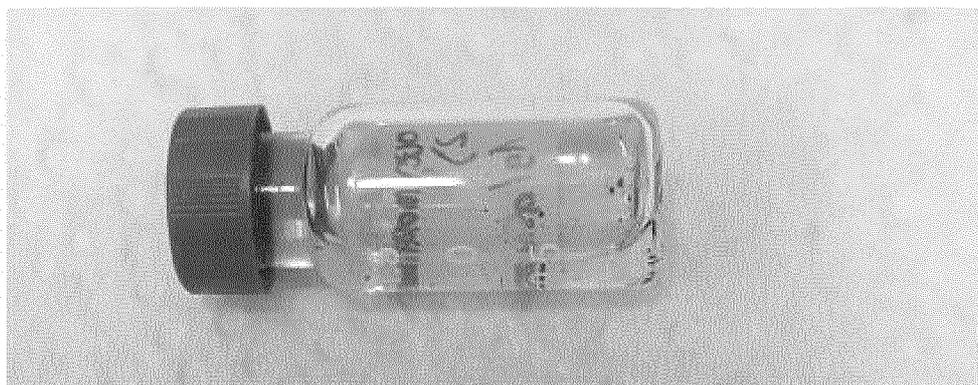
Фиг. 5



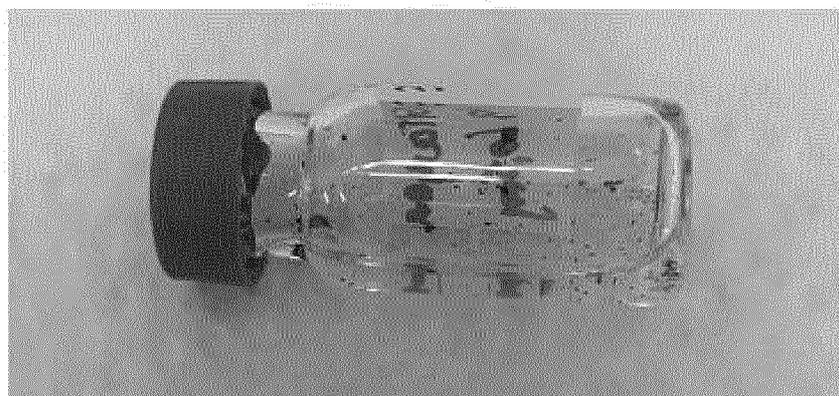
Фиг. 5А



ФИГ. 6А



ФИГ. 6В



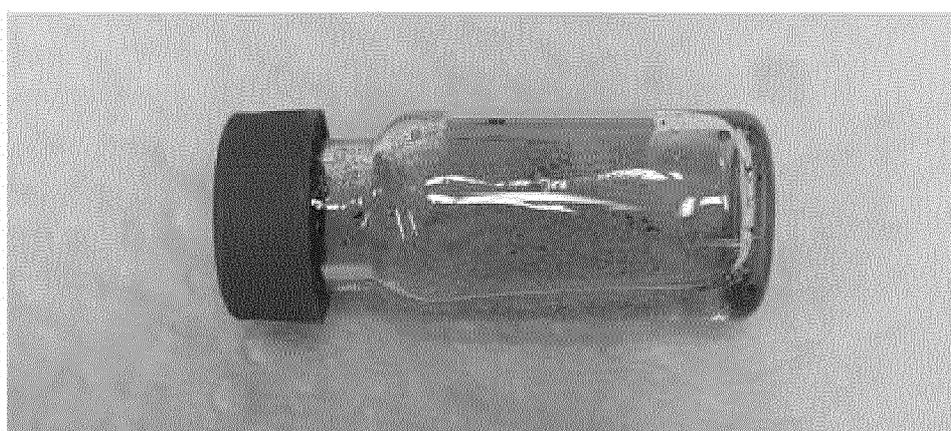
ФИГ. 6С



Фиг. 6D



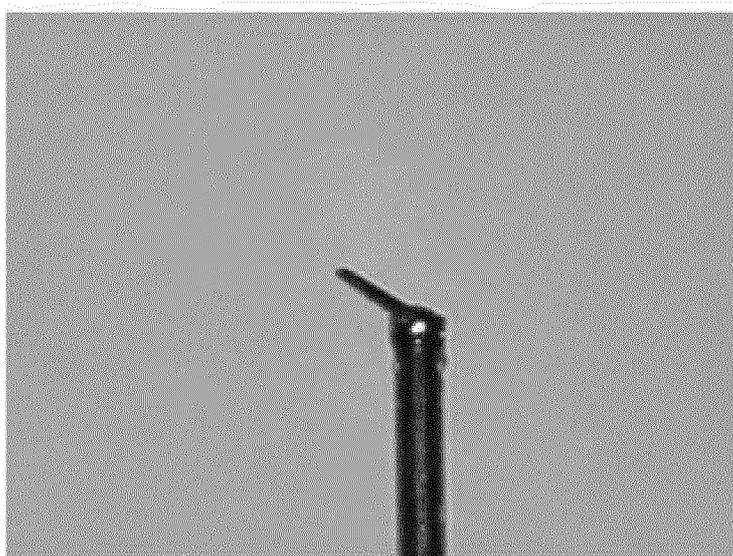
Фиг. 6E



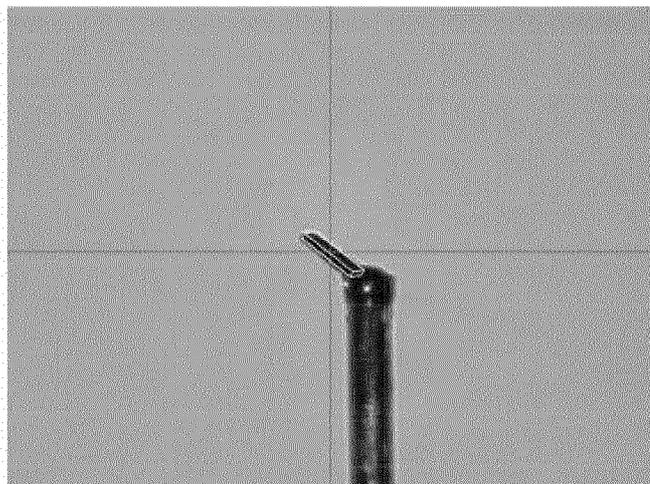
Фиг. 6F



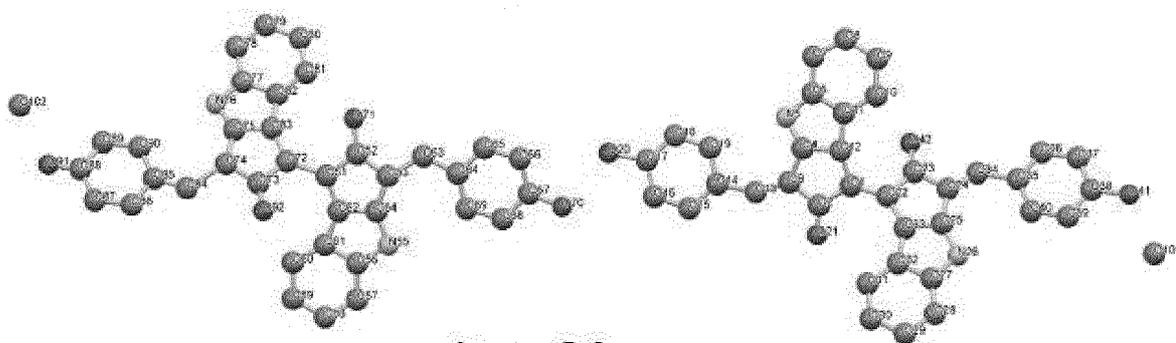
ФИГ. 6G



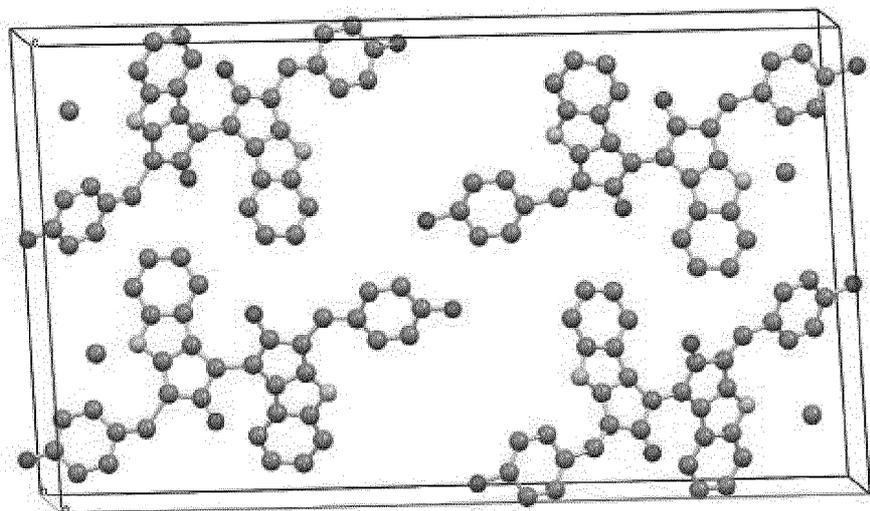
ФИГ. 7A



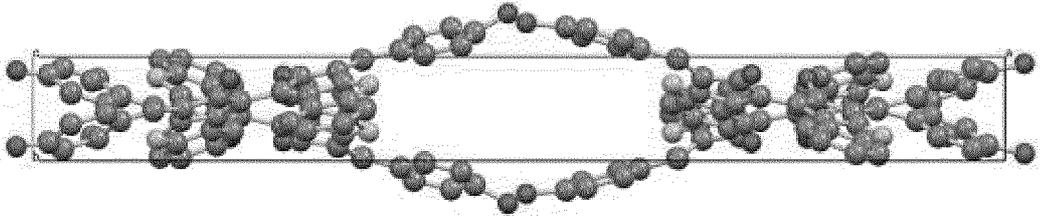
Фиг. 7В



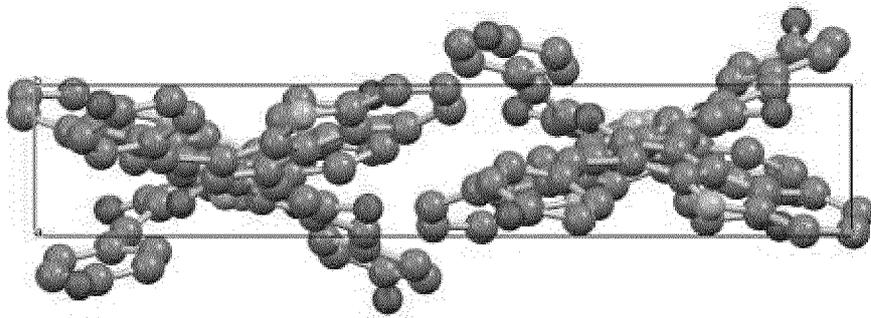
Фиг. 8А



Фиг. 8В



Фиг. 8С



Фиг. 8D