

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



(19) RU (11)

2162708 (13) C1

(51) МПК⁷ A61K38/55

**ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

Статус: по данным на 08.09.2014 - прекратил действие, но может быть восстановлен
Пошлина: учтена за 13 год с 17.08.2011 по 16.08.2012

(21), (22) Заявка: **99117895/13, 16.08.1999**

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
16.08.1999

(45) Опубликовано: **10.02.2001**

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: **ЗВЯГИНЦЕВА Т.Н. и др. Ингибиторы амилаз актиний Карибского моря. Ингибитор амилаз белковой природы из Stoichactis helianthus. - Химия природных соединений, 1982, N 3, с.343- 350. SUETSUNA KUNIO et all, Structur of an L-amylase inhibitor produced by marine actinomycete and its lowering effects in vivo of glucose and lipid in blood. Suisan daigarro renryu hororu = J.Shimonoseri. Fish - 1994-42 N 4, с.171-183. ZHANG N.Y. et.all. Purification and characterization of a neu class of insect L-amylase inhibitors from barley. Cereal chemistry, 1997, 74, 2, с.119- 122.**

Адрес для переписки:
**690022, г.Владивосток, пр-т 100-летия
Владивостока 159, ТИБОХ ДВО РАН**

(71) Заявитель(и):

Тихоокеанский институт биоорганической химии Дальневосточного научного центра РАН

(72) Автор(ы):

**Ермакова С.П.,
Звягинцева Т.Н.,
Скобун А.С.,
Сова В.В.**

(73) Патентообладатель(и):

Тихоокеанский институт биоорганической химии Дальневосточного научного центра РАН

(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ БЕЛКОВЫХ ИНГИБИТОРОВ ГЛЮКАНАЗ

(57) Реферат:

Изобретение относится к биохимии, биотехнологии и экологии, может быть использовано при возделывании марикультуры и регуляции биотехнологических процессов. Способ включает обработку бурых водорослей этанолом, затем хлороформом. Из водно-этанольного экстракта извлекают неактивную фракцию липидов. Экстракт высаждают этанолом. Надосадочную жидкость высушивают. Полученный осадок растворяют в воде, раствор фракционируют с помощью гидрофобной хроматографии на полихrome-1 (политетрафтортилене) и элюции с колонки сначала водой, а затем ступенчатым градиентом спирта в воде. Продукт высушивают. Способ позволяет получить ингибиторы ламинариназы из бурых водорослей. 1 ил. , 3 табл.

Изобретение относится к биохимии, биотехнологии и экологии и касается способа получения биологически активных веществ из бурых водорослей, а именно ингибиторов эндо-1,3-β-D-глюканаз (ламинариназ) - ферментов пищеварительного тракта морских моллюсков.

Эти ингибиторы могут выполнять в водорослях функцию защиты от морских травоядных организмов (ежей, моллюсков и т.д.), являясь для них токсинами и выполняя экологическую роль как регуляторы межвидовых взаимодействий водоросль/травоядное животное. Они могут быть использованы при возделывании марикультуры или, возможно, как вещества, защищающие от обрастаний и т.д. Кроме того, морские ферменты и их ингибиторы могут использоваться соответственно как катализаторы и регуляторы различных биотехнологических процессов. Возможность использования марикультуры и отходов промышленного рыболовства для производства таких ферментов и ингибиторов увеличивает экономическую эффективность процессов их получения и применения.

Проблема, как защищаются водоросли от поедающих их животных, представляет большой интерес [1-3]. Практически все обнаруживаемые в водорослях вторичные метаболиты, например полифенолы [1, 2], дитерпеноиды [3] и т.д.? в настоящее время испытываются на токсичность по отношению к морским животным. Однако в настоящее время эта проблема остается практически полностью нерешенной.

Нами предложен другой подход к возможному решению этой проблемы. Известно, что из семян зерновых, бобовых и других растений выделен ряд белковых ингибиторов амилаз (эндо-1--->4- α -D-глюканаз) пищеварительного тракта травоядных и насекомых [4-6]. Роль этих веществ в защите растений от травоядных интенсивно обсуждается в литературе. Эти пептиды или белки накапливаются в больших количествах в проросших зернах и представляют собой токсины, вызывая гибель насекомых и пищевые отравления или гибель животных, их поедающих.

Известен способ получения белковых ингибиторов из семян фасоли, включающий экстракцию измельченных семян водой, горячую обработку экстракта в кислой среде, фракционирование сульфатом аммония, хроматофокусирование и гельфильтрацию [7]. Получают белковый ингибитор PPA (α -амилаза печени свиньи) в виде двух изоформ (43 кДа), которые отличаются друг от друга изоточками и содержанием нейтральных сахаров.

Наиболее близкий к предлагаемому техническому решению способ, позволяющий выделять из источника морского происхождения белковый ингибитор глюканаз пищеварительного тракта моллюсков (*Spisula sachalinensis*, *Chlamys albidus* и *Patinopecten* sp.), разработан для актинии *Stoichactis heliantchus* [8].

Способ-прототип включает экстракцию 0,9%-ным водным раствором хлористого натрия гомогенизированной целиком актинии, гельфильтрацию суммарного экстракта на сефадексе G-50, хроматографию на КМ- целлюлозе и рехроматографию на том же сорбенте. Полученный таким образом ингибитор является пептидом. Он имеет типичный белковый спектр с λ max 280 нм, молекулярная масса ингибитора, определенная гель-фильтрацией, оказалась около 7,5 кДа. Ингибирующая активность вещества исчезала под действием трипсина. Свойства этого пептида оказались подобными свойствам, выделенным из злаковых белковых ингибиторов амилаз пищеварительного тракта животных. Так, ингибитор из актинии имеет широкий интервал рН-стабильности (5-9), является термостабильным (сохраняет активность при нагревании до 100° в течение 3-5 мин).

Однако выделенный из актинии ингибитор белковой природы специфичен по отношению к амилазам и не действует на ламинариназы. Способ-прототип довольно трудоемкий, так как требует проведения диализа растворов для освобождения от соли и связан с необходимостью использования дорогостоящих анионообменных смол.

Задача изобретения - разработка способа получения ингибиторов эндо-1,3-β-D-глюканаз (ламинариназ) морских моллюсков.

Для решения поставленной задачи согласно заявляемому способу в качестве источника для получения белковых ингибиторов эндо-1,3-β-D-глюканаз используют бурые водоросли.

Бурые водоросли являются одним из наиболее богатых и легко возобновляемых источников интересных по структуре и биологической активности полисахаридов: ламинаранов, фукоиданов и альгиновых кислот.

Ламинараны - низко-молекулярные 1 ---> 3; 1 ---> 6- β -D-глюканы - также широко распространены и играют такую же роль в море, как амилоза на Земле. Ламириназы или эндо 1 ---> 3-β-D-глюканазы - ферменты, их расщепляющие, входят в ферментные системы пищеварительного тракта морских организмов. Естественно было предположить, что защита водорослей от животных, их поедающих, должна быть связана с синтезом веществ, ингибирующих ферменты пищеварительного тракта этих животных и прежде всего ламинариназ, аналогично тому, как наземные растения защищаются от насекомых и травоядных, синтезируя ингибиторы амилаз.

В результате поиска, проведенного нами, ингибиторы ламинариназ морских моллюсков впервые были обнаружены практически во всех исследованных бурых водорослях.

Заявляемый способ показан на чертеже и включает:

1. Обработку свежей бурой водоросли этанолом (1:1, по весу). Водно-спиртовой экстракт содержит соли, полифенолы, низкомолекулярные вещества (в том числе маннит, моно-, олигосахариды, аминокислоты, пептиды, пигменты, липиды, иодсодержащие вещества, витамины групп А, В и т.д.). В водный спирт экстрагируется около 30-35% веществ от сухого веса водоросли, в том числе сюда полностью переходят вещества, обладающие ингибирующим действием на ламинариказы морских моллюсков.

2. Далее водно-спиртовой экстракт несколько раз обрабатывают хлороформом, в который экстрагируется неактивная липидная фракция. Хлороформенный слой отделяют и отбрасывают. Активную водно-спиртовую фракцию концентрируют под вакуумом и высаждают 80%-ым этанолом нерастворимые в спирте вещества (в основном это олигосахариды со СП от 7-8 до 12-14 - по данным ^{13}C -ЯМР и углеводного анализатора). Ингибирующая активность остается в супернатанте. Супернатант концентрируют под вакуумом досуха.

3. Полученный осадок растворяют в воде и наносят на колонку с гидрофобным носителем полихромом-1 (политетрафторэтиленом). Вещества с полихрома-1 последовательно элюируют сначала водой, а затем ступенчатым градиентом спирта в воде (5-, 10-, 20- и 40%-ный водный этанол). Размеры колонки подбирают так, чтобы время контакта носителя с активными веществами не превышало 2 часов. Активные фракции высушивают лиофильно. Гидрофобный носитель регенерируют последовательно этанолом и водой.

Ингибирующая способность, выходы и структурные характеристики различных фракций, полученных в результате этого способа, приведены в таблице 1. Ингибирующая способность фракции I, элюируемой с полихрома-1 водой, исчезала в течение 3-4 часов. По всей видимости вещества этой фракции являются лабильными и по этой причине нами они не изучались. Идентификацию веществ полученных активных фракций II и III проводили с помощью различных методов (таблица 1). Так, углеводы были обнаружены и количественно определены с помощью фенолсернокислотного метода [9]. Они были идентифицированы как смесь 1,3; 1,6- β -D-глюкоолигосахаридов с помощью ^{13}C -ЯМР-спектроскопии [10]. В спектрах ^{13}C -ЯМР ингибирующих фракций II и III были обнаружены только сигналы, характерные для этих олигосахаридов: C1 (103 - 104 м.д.), C3 (β -1,3, 85-87 м. д.), C6 (β -1,6, 69.5 м.д.) и C6 атомов (61-62 м.д.). Спектры ^{13}C -ЯМР получены на приборе Bruker WM-250 в D_2O при 40°C. В качестве внутреннего стандарта использовали метанол. Моносахаридный состав фракций II и III определяли после гидролиза 2N HCl (100°C, 1 час) углеводным анализатором "Biotronik" (Германия). Единственным обнаруженным компонентом углеводной части оказалась глюкоза. В УФ-спектрах ингибирующих фракций была обнаружена полоса поглощения с λ_{max} 278 нм, характерная для белков или пептидов, содержащих ароматические аминокислоты: тирозин и/или триптофан. Содержание белка в активных фракциях II и III было невелико и составляло 20% и 28% соответственно (метод Лоури). Аминокислотный анализ этих фракций после гидролиза 6N HCl (100°C, 48 час) был проведен с помощью аминокислотного анализатора "Biotronik". Основными аминокислотами в составе ингибирующих фракций оказались глутаминовая и аспарагиновая кислоты (возможно, глутамин и аспарагин).

Как видно из таблицы 1, способ впервые дает возможность получения из природной смеси веществ бурых водорослей фракций, ингибирующих ламинариказы - ферменты пищеварительного тракта морских моллюсков. По данным предварительного анализа эти фракции представляют собой смесь веществ белковой природы и углеводов, а именно 1,3; 1,6- β -D-глюкоолигосахаридов. Для дальнейшего исследования была выбрана фракция II, элюируемая с полихрома-1 5%-ным водным этанолом.

Была изучена специфичность ингибирующих веществ фракции II по отношению к различным ферментам (таблица 2). Как видно из таблицы, вещества фракции II специфичны по отношению к ферментам пищеварительного тракта морских моллюсков и не ингибируют глюканызы микроорганизмов.

Вопрос, белки или углеводы отвечают за активность этой фракции, был решен с помощью специфических ферментов. Для разрушения ламинариолигосахаридов, содержащихся во фракциях, были использованы β -глюкозидаза из дрожжей и 1,3- β -D-глюканаза из морского гриба *Chaetomium indicum*, на активность которых вещества фракций II и III не влияли (таблица 2). Ингибирующая активность фракции II после разрушения углеводной части под действием этих ферментов практически не изменилась (таблица 3). По всей видимости, ее углеводная составляющая не принимает участия в ингибировании 1,3- β -D-глюканаз морских моллюсков. Далее было изучено действие трипсина и проназы на фракцию II. После действия трипсина, равно как и проназы, разрушающих белковую составляющую фракции, ее ингибирующее действие исчезало полностью (таблица 3). Следовательно, ингибиторы этой фракции имеют белковую природу.

Было изучено влияние pH, T и других параметров на ингибирующее действие фракции II. Так, интервал pH-стабильности ее достаточно широк - 3-8. Фракция II выдерживает нагревание до 100°C в течение 3-5 мин практически без изменения ингибиторного действия. В сухом виде вещества фракции II не изменяют своих свойств при хранении в течение полугода при температуре не выше 4°C.

Сведения, подтверждающие возможность осуществления изобретения.

Пример 1.

8 кг измельченной свежей водоросли *Laminaria sichorioides* заливают 5 кг этанола и выдерживают при комнатной температуре не менее суток. Водоросль отделяют и отбрасывают. Водно-спиртовой экстракт концентрируют досуха под вакуумом. Осадок растворяют в воде (1 л) и обрабатывают раствор несколько раз хлороформом в делительной воронке. Хлороформенный слой отделяют. К водному раствору добавляют 4 объема этанола, образовавшийся осадок отцентрифугуют и отбрасывают. Надосадочную жидкость, содержащую ингибирующие вещества, концентрируют досуха под вакуумом. Получают 140 г осадка (17% от сухого веса водоросли).

Полученный осадок (1/4 часть) растворяют в воде и наносят на колонку с гидрофобным носителем полихромом-1 (политетрафторэтиленом). Проводят элюцию водой (около 1 л; фракция I) до отрицательной реакции на сахара (фенол-сернокислотный метод). Ступенчатым градиентом спирта в воде элюируют последовательно фракцию II (5%-ный водный этанол; около 0,5 л), две неактивные фракции (10- и 20%-ный водный этанол, примерно по 0,5 л), фракцию III (40%-ный водный этанол; около 0,5 л), каждый раз отмывая носитель до отрицательной реакции на сахара и ингибирующую активность. Затем регенерируют носитель последовательно 80%-ным водным этанолом и водой.

Процедуру повторяют еще три раза до полной переработки экстракта.

Активные фракции II и III концентрируют под вакуумом досуха или высушивают лиофильно и хранят при температуре не выше 4°C. Время контакта ингибиторов с носителем около 2-х часов, I₅₀ для фракций II и III соответственно 2 и 3 мкг. Выходы фракций II и III - 16,5 г (2% от сухого веса водоросли) и 12,5 г (1,5% от сухого веса водоросли) соответственно.

Пример 2.

8 кг измельченной свежей водоросли *Laminaria japonica* заливают 5 кг этанола и выдерживают при комнатной температуре не менее суток, водоросль отделяют и отбрасывают, водно-спиртовой экстракт концентрируют досуха под вакуумом. Далее все операции соответствуют примеру 1. I₅₀ для фракций II и III - 4 и 6 мкг соответственно. Выходы фракций II и III - 5 и 3 г соответственно.

Пример 3.

8 кг измельченной свежей водоросли *Fucus evanescens* заливают 5 кг этанола и выдерживают при комнатной температуре не менее суток, водоросль отделяют и отбрасывают, водно-спиртовой экстракт концентрируют досуха под вакуумом. Далее все операции соответствуют примеру 1. I₅₀ для фракций II и III - 4 и 5 мкг соответственно. Выходы фракций II и III - 6 и 2,5 г соответственно.

Литература

1. Peckol P. Krane J. M. Yates J.L. Interactive Effects of Inducible Defense and Resource Availability on Phlorotannins in the North. - Atlantic Brown Alga *Fucus vesiculosus*. Marine Ecology-Progress Series. 1996. 138. 1-3. 209-217.
2. Targett N.M., Vrolijk N.H. Tropical marine herbivore assimilation of phenolic rich plants *Ecologia*. 1995. 103. 2 170-179.
3. Gronun G. , Paul J.V., Hay M.E., Fenical V. Are tropical herbivores more resistant than temperate herbivores to seaweed chemical defenses? Diterpenoid metabolites from *Dictyota acutiloba* as feeding deterrents for tropical versus temperate fishes and urchins. *J. Chem. Ecol.* 23. 2. 289-302. 1997.
4. Lakisch M. , Layer P., Rizza R.A., Dimagno N.P. Acute postprandial gastrointestinal and metabolic effects of wheat amylase inhibitor (WAI) in normal, obese, and diabetic humans. *Pancreas*. 1998. 17. 2. 176-181.
5. Zhang N.Y., Jones B.I., Tao N.P. Purification and characterization of a new class of insect α -amylase inhibitors from barley. *Cereal Chemistry*. 1997. 74.2. 119-122.
6. Reis C. M., Calvet M.M., Sales M.P., Fernandes K.V.S., Gomes B.M. α -amylase inhibitors of legume seeds and their involvement in the resistance to Bruchid beetles. *Arquivos de Biologia et Tecnologia*. 1997. 40.2 413-418.
7. Leberreanton V., Bompardgilles C., Payan F., Rouge P. Characterization and functional properties of the α -amylase inhibitor (alpha-AI) from kidney bean (*Phaseolus vulgaris*) seeds. *BBA-Protein Structure and Molecular Enzymology*. 1997. 1343. 1. C. 31-40.
8. Звягинцева Т.Н., Сова В.В., Перера И., Елякова Л.А. Ингибиторы амилаз актиний Карибского моря. Ингибитор амилаз белковой природы из *Stoichactis helianthus*. *Химия природн. соедин.* 1982. N 3. C. 343-350.
9. Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J.K, Reibers P.A., Smith F., *Anal. Chem.* 28 (1956) 350.
10. Звягинцева Т. Н., Широкова Н.И., Елякова Л.А., *Биоорган, химия*, 20 (1994) 1349.

Формула изобретения

Способ получения белковых ингибиторов глюканаз, отличающийся тем, что буровые водоросли обрабатывают этанолом, затем из водно-этанольного экстракта хлороформом извлекают неактивную фракцию липидов, выделенный водно-этанольный экстракт концентрируют и осаждают раствором этанола, полученную надосадочную жидкость высушивают с последующим растворением в воде, раствор фракционируют гидрофобной хроматографией на полихроме-1, элюируют с колонки сначала водой, затем

ступенчатым градиентом спирта в воде и высушивают.

РИСУНКИ

[Рисунок 1](#), [Рисунок 2](#), [Рисунок 3](#)

ММ4А Досрочное прекращение действия патента из-за неуплаты в установленный срок пошлины за поддержание патента в силе

Дата прекращения действия патента: **17.08.2012**

Дата публикации: [10.06.2013](#)
