



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21), (22) Заявка: 2004135771/13, 06.12.2004

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
06.12.2004

(45) Опубликовано: 20.07.2006 Бюл. № 20

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: RU 2039819 C1, 20.07.1995. RU 2034028 C1, 20.10.1997. RU 2112036 C1, 27.05.1997. RU 2121503 C1, 28.02.1998. RU 2225441 C1, 10.03.2004. WO 97/00860, 12.02.1987. EP 0402321, 12.12.1990. САХАРОВ И.Ю. и др. Очистка и характеристика коллагенолитической протеиназы из гепатопанкреаса *Paralithodes camtschatica*. Биохимия, 1998, с.1844-1849.

Адрес для переписки:

690022, г.Владивосток, пр-т 100 лет
Владивостока, 159, Тихоокеанский институт
биоорганической химии ДВО РАН, патентный
отдел, Н.И. Стадниченко

(72) Автор(ы):

Артюков Александр Алексеевич (RU),
Мензорова Наталья Ильинична (RU),
Козловская Эмма Павловна (RU),
Кофанова Нина Николаевна (RU),
Козловский Алексей Стефанович (RU),
Рассказов Валерий Александрович (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Тихоокеанский институт биоорганической химии
Дальневосточного отделения Российской
Академии наук (RU)

(54) ФЕРМЕНТНЫЙ ПРЕПАРАТ ИЗ ГЕПАТОПАНКРЕАСА ПРОМЫСЛОВЫХ ВИДОВ КРАБОВ И СПОСОБ ЕГО ПОЛУЧЕНИЯ

(57) Реферат:

Изобретение относится к полиферментным препаратам из морского животного сырья и способам их получения и может найти применение в биотехнологии, медицине, косметологии, ветеринарии, сельском хозяйстве, в научных исследованиях и производстве биохимических реактивов. Препарат получают путем гомогенизации гепатопанкреаса промысловых видов крабов в буферных растворах, удаления твердых примесей центрифугированием гомогената, флокуляции липидов хитозаном. Причем гомогенат дополнительно очищают центрифугированием. Ультрафильтрацию раствора ферментного препарата ведут на мембране, пропускающей вещества с молекулярной массой 15 кДа и ниже, а затем на мембране, задерживающей вещества с молекулярной массой 50 кДа и выше.

Раствор, содержащий ферментативные активности, лиофилизируют. В состав полиферментного препарата входят коллагенолитические и металлотависимые протеиназы с молекулярной массой меньше 30 кДа, рибонуклеазы, дезоксирибонуклеазы, фосфодиэстеразы, фосфатазы, амилазы, липазы и β -глюканазы. Изобретение обеспечивает расширение арсенала полиферментных препаратов, увеличение выхода ферментного препарата за счет увеличения количества типов ферментов, входящих в полиферментный комплекс (протеазы, нуклеазы, гликозидазы и липазы), повышения уровня активности гидролаз, расширение спектра возможного использования полиферментного препарата в различных отраслях промышленности. 2 з.п. ф-лы.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,
PATENTS AND TRADEMARKS

(51) Int. Cl.

C12N 9/48 (2006.01)*C12N 9/64* (2006.01)**(12) ABSTRACT OF INVENTION**(21), (22) Application: **2004135771/13, 06.12.2004**(24) Effective date for property rights: **06.12.2004**(45) Date of publication: **20.07.2006 Bull. 20**

Mail address:

**690022, g.Vladivostok, pr-t 100 let
Vladivostoka, 159, Tikhookeanskij institut
bioorganicheskij khimii DVO RAN, patentnyj
otdel, N.I. Stadnichenko**

(72) Inventor(s):

**Artjukov Aleksandr Alekseevich (RU),
Menzorova Natal'ja Il'inichna (RU),
Kozlovskaja Ehmna Pavlovna (RU),
Kofanova Nina Nikolaevna (RU),
Kozlovskij Aleksej Stefanovich (RU),
Rasskazov Valerij Aleksandrovich (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Tikhookeanskij institut bioorganicheskij
khimii Dal'nevostochnogo otdelenija
Rossijskoj Akademii nauk (RU)**

(54) ENZYME PREPARATION FROM HEPATOPANCREAS OF COMMERCIAL CRAB SPECIES AND METHOD FOR PRODUCTION OF THE SAME

(57) Abstract:

FIELD: multienzymatic preparation from sea animal raw materials, useful in biotechnology, medicine, cosmetology, veterinary, agriculture, etc.

SUBSTANCE: claimed preparation is obtained by homogenizing of hepatopancreas of commercial crab species in buffer solutions; solid contaminant removing by homogenate centrifugation and lipid flocculation with chitosan, wherein homogenate is additionally purified by centrifugation. Ultrafiltration of enzyme preparation solution is carried out on membrane permeable for substances

of molecular mass 15 kDa or less and further on membrane non-permeable for substances of molecular mass 50 kDa or more. Solution having enzymatic activity is lyophilized. Multienzymatic preparation contains collagenolytic and metal-dependent proteinases having molecular mass less than 30 kDa, rybonucleases. Deoxyribonucleases, phosphodiesterases, phosphatases, amylases, lipases, and β -glucanases.

EFFECT: enhanced assortment of multienzymatic preparations.

2 cl, 4 ex

RU 2 280 076 C1

RU 2 280 076 C1

Изобретение относится к полиферментным препаратам из морского животного сырья и способам их получения и может найти применение в биотехнологии, медицине, косметологии, ветеринарии, сельском хозяйстве, в научных исследованиях и производстве биохимических реактивов.

5 У ракообразных (крабов, раков и креветок) гепатопанкреас является органом, совмещающим функции печени и поджелудочной железы. Из-за особенностей питания отряда Decapoda гепатопанкреас секретирует большое количество пищеварительных ферментов, гидролизующих все классы природных полимеров и обладающих широкой специфичностью и необычно высокой активностью. Гепатопанкреас является доступным,
10 дешевым и нетоксичным сырьем для получения ферментных препаратов. В настоящее время из гепатопанкреаса крабов выделяют в высокоочищенном или гомогенном состоянии коллагенолитические протеиназы, аминопептидазу, трипсин, эластазу и Са, Mg-зависимую ДНКазу.

В то же время получаемые из гепатопанкреаса крабов полиферментные препараты,
15 содержат, как правило, гидролазы одного типа, а именно коллагенолитические протеиназы. На основе коллагенолитических протеиназ разработаны ранозаживляющие препараты "Коллалитин", "Морикраза", "Коллаза", "Коллагеназа КК".

Известны следующие способы получения ферментных препаратов из гепатопанкреаса промысловых видов крабов:

20 1. Способ получения комплекса протеолитических ферментов, включающий гомогенизацию сырья в водном растворе и осаждение целевого продукта сульфатом аммония. Комплекс ферментов содержит трипсин, карбоксипептидазы А и Б, лейцинаминопептидазу, щелочные и нейтральные протеазы [SU 546648 A1, 15.02.77].

25 2. Способ получения комплекса протеолитических ферментов из пищеварительных органов наземных и морских животных, включающий экстракцию комплекса из измельченных органов раствором хлористого кальция, очистку от твердых примесей центрифугированием и микрофильтрацию через мембраны. Полученный продукт (протеолитический комплекс) содержит щелочные, нейтральные и кислые протеазы, трипсин, хомотрипсин, коллагеназу [RU 2034028 C1, 30.04.95].

30 3. Способ получения ферментного препарата, включающий экстракцию фермента из замороженного гепатопанкреаса камчатского краба раствором хлорида щелочного металла; отделение осадка пропусканием через фильтры с размером пор 10 мм, 0,5 мм и 0,1 мм; микрофильтрацию на мембранах с размером пор 0,45 мкм; ультрафильтрацию на мембранах с пределом пропускания 10 кДа. Ферментный препарат, названный
35 "Коллалитином", содержит коллагенолитические протеазы [RU 2096456 C1, 20.11.97].

Недостатком этого способа является длительность процесса, что снижает выход продукта и уровень его активности. Коллагеназа представлена тремя изоферментами с молекулярной массой в пределах от 18 до 27 кДа.

40 4. Наиболее близким к заявляемому способу по технической сущности является способ получения ферментного препарата из гепатопанкреаса промысловых видов крабов, обладающего коллагенолитической активностью (коллагеназы). Способ предусматривает гомогенизацию сырья путем автолиза в буферных растворах, с последующим добавлением к гомогенату раствора хитозана до его конечной концентрации 0,01-0,4%, отделением нерастворимого материала и последовательной ультрафильтрации ферментного раствора
45 сначала на мембране, отсекающей балластные вещества с мол.м 100 кДа и более, а затем на мембране, отсекающей вещества с мол.м. 30 кДа и менее, собирая фермент, не проходящий через мембрану. Раствор, содержащий ферментативную активность, лиофилизируют [RU 2039819 C1, 20.07.95].

Способ-прототип довольно прост в исполнении, не продолжителен по времени, не
50 требует токсичных реагентов. Однако в препарате, полученном способом-прототипом, определен только один тип гидролаз, а именно коллагенолитические протеиназы.

На основе этого комплекса в Тихоокеанском институте биоорганической химии ДВО РАН создано ранозаживляющее средство широкого спектра действия "Коллагеназа КК", в

котором коллагеназа представлена, по крайней мере, тремя изоферментами [RU 2093166 C1, 20.10.97].

В настоящее время область применения известного ферментного комплекса ограничена только его способностью деградировать белки. В то же время во многих случаях успешное
5 решение конкретной проблемы требует использования полиферментных препаратов с более широким спектром действия. Например, для осуществления полной энзиматической деструкции животных и растительных клеток при использовании продуктов гидролиза в биотехнологической, микробиологической и пищевой промышленности.

Задача настоящего изобретения - создать полиферментный препарат, способный
10 гидролизовать 4 класса природных биополимеров, такие как белки, нуклеиновые кислоты, полисахариды и липиды с целью его более широкого и эффективного применения; расширить арсенал комплексных ферментных препаратов, получаемых из гепатопанкреаса промысловых видов крабов и разработать способ его получения.

В результате решения поставленной задачи создан новый полиферментный препарат,
15 содержащий коллагенолитические протеиназы, который согласно изобретению дополнительно содержит металлозависимые протеиназы, рибонуклеазы, дезоксирибонуклеазы, фосфодиэстеразы, фосфатазы, амилазы, липазы и β -глюканазы. Его получают путем гомогенизации гепатопанкреаса промысловых видов крабов в буферных растворах, удаления твердых примесей центрифугированием гомогената,
20 флокуляции липидов хитозаном, ультрафильтрации раствора ферментного препарата на мембране, пропускающей вещества с молекулярной массой 15 кДа и ниже, а затем на мембране, задерживающей вещества с молекулярной массой 50 кДа и выше.

Комплексный препарат содержит набор коллагенолитических протеиназ с молекулярной
25 массой от 18 до 36 кДа, щелочную ДНКазу (42 кДа), кислую ДНКазу (32 кДа), РНКазы (меньше 20 кДа), фосфодиэстеразы, гликозидазы и липазы - (до 35 кДа). Содержание белка в препарате не менее 80% (по методу Лоури). Препарат не содержит ионов тяжелых металлов, примесей, вредных и токсичных веществ.

Технический результат обеспечивается тем, что новый ферментный комплексный
30 препарат содержит 4 типа гидролаз - протеазы, нуклеазы, гликозидазы и липазы, то есть обладает более широким спектром ферментативных активностей по сравнению с известным препаратом, обладающим только одним типом гидролазной активности, а именно - коллагенолитической.

В связи с вышесказанным предлагаемый полиферментный препарат может быть
35 использован на практике с большей эффективностью, чем известные. Например, при использовании препарата в медицине при лечении гнойно-некротических процессов, вызванных бактериальной или вирусной инфекцией, эта эффективность будет обеспечиваться уникальным сочетанием литического действия коллагеназ, протеиназ и нуклеаз и противовирусного эффекта ДНКаз и РНКаз.

Кроме того, предлагаемый комплекс может служить источником для получения
40 традиционными биохимическими методами индивидуальных ферментов или ферментных комплексов направленного действия, например комплекса ДНКазы и РНКазы. Совместное присутствие в предлагаемом ферментном препарате ДНКазы и РНКазы позволит создать для медицины, ветеринарии, сельского хозяйства противовирусные препараты, которые обеспечат возможность одновременно ингибировать размножение ДНК- и РНК-содержащих
45 вирусов у человека, животных и растений.

Новый препарат расширяет арсенал комплексных ферментных препаратов.

Поставленная задача решена также способом получения ферментного препарата,
содержащего коллагенолитические протеиназы, включающим гомогенизацию
50 гепатопанкреаса промысловых видов крабов, добавление к гомогенату раствора хитозана, отделение нерастворимого материала с последующей ультрафильтрацией полученного раствора и лиофилизацией целевого продукта, в котором согласно изобретению гомогенат подвергают дополнительной очистке путем центрифугирования, а ультрафильтрацию осуществляют на мембране, пропускающей вещества с молекулярной массой 15 кДа и

ниже, собирая ферментный препарат, не проходящий через мембрану. Затем полученный концентрат ферментного препарата, содержащего 4 типа гидролаз, пропускают через мембрану, задерживающую вещества с молекулярной массой 50 кДа и выше. В результате получают препарат, дополнительно содержащий коллагенолитические и

5 металлотависимые протеиназы с молекулярной массой меньше 30 кДа, рибонуклеазы, дезоксирибонуклеазы, фосфодиэстеразы, фосфатазы, амилазы, липазы и β -глюканазы.

Во время проведения процесса получения ферментного комплекса поддерживают рН ферментного раствора 5,5-9,5, т.к. авторами экспериментально установлено, что ферментный препарат наиболее активен и стабилен в этом диапазоне рН. При рН ниже 5,5
10 и выше 9,5 активность комплекса и его отдельных компонентов резко снижается, а при рН ниже 4,5 и выше 10,5 часть ферментов необратимо инактивируется.

Способ может быть осуществлен как при низкой температуре, например 5°C (в условиях холодной комнаты), так и при комнатной температуре.

Хитозан добавляют к гомогенату в виде раствора солевой формы с органической или
15 минеральной кислотами. Введение стадии дополнительной очистки путем центрифугирования гомогената позволяет снизить концентрацию хитозана до 0,001%, что, в свою очередь, уменьшает потери белка, связанные с сорбцией белка на хитозане, а в результате - повышает выход ферментного комплекса.

Использование мембран с пропускающей способностью ниже 50 кДа дает возможность
20 убрать балластные биополимеры с молекулярной массой выше 50 кДа, и, таким образом, повысить удельную активность ферментов, присутствующих в комплексе.

Совокупность существенных признаков заявляемого способа обеспечивает получение технического результата, который заключается в увеличении выхода ферментного
25 препарата за счет увеличения количества типов ферментов, входящих в полиферментный комплекс (протеазы, нуклеазы, гликозидазы и липазы), и в повышении уровня активности гидролаз.

Примеры осуществления изобретения.

Пример 1. Гепатопанкреас камчатского краба (10 кг) измельчают, добавляют 30 л фосфатного буфера с рН 7,5 и выдерживают смесь при перемешивании в течение 6 ч, при
30 температуре 20°C. Гомогенат центрифугируют при 2000 г и добавляют к супернатанту при интенсивном перемешивании раствор хитозана в 10% уксусной кислоте, доводя конечную концентрацию хитозана до 0,001%, рН раствора при флокуляции - 6,5. Образовавшийся хорошо сформированный осадок отделяют от раствора фильтрацией через плотную хлопчатобумажную ткань (бязь) или центрифугированием раствора в проточной
35 центрифуге при 7000 г. Затем осуществляют обессоливание, концентрирование экстракта и удаление примесных веществ с молекулярной массой меньше 15 кДа из осветленного экстракта на ультрафильтрационной установке с мембранными элементами 15 кДа, собирая ферментный препарат, не проходящий через мембраны. Затем осуществляют удаление примесных веществ с молекулярной массой выше 50 кДа из
40 сконцентрированного и обессоленного экстракта на ультрафильтрационной установке с мембранными элементами 50 кДа (рН раствора ферментов - 7,5). Раствор, содержащий ферментативные активности, лиофилизируют.

Получают 80 г комплексного ферментного препарата. Препарат содержит 0,8 мг белка на мг препарата. Липиды в препарате отсутствуют.

Пример 2. Гепатопанкреас промысловых видов крабов (10 кг) измельчают и помещают в
45 30 л воды, доводя рН раствора бикарбонатом до значения 8,3 и выдерживают при перемешивании в течение 6 ч, при температуре 5 С°. Затем раствор центрифугируют при 3000 г и добавляют к супернатанту при интенсивном перемешивании раствор хитозана в 0,5 н. соляной кислоте, доводя конечную концентрацию хитозана до 0,001%, рН раствора
50 при флокуляции - 7,0. Далее процесс проводят так, как описано в примере 1, при рН буферного раствора 8,3.

Получают 78,0 г комплексного ферментного препарата. Препарат содержит 0,85 мг белка на мг препарата. Липиды в препарате отсутствуют.

Пример 3. Гепатопанкреас камчатского краба (1 кг) измельчают, добавляют 3 л ацетатного буфера с рН 5,5 и выдерживают смесь при перемешивании в течение 6 ч, при температуре 5°C. Гомогенат центрифугируют при 2000 г и добавляют к супернатанту при интенсивном перемешивании раствор хитозана в 25,0% уксусной кислоте, доводя конечную концентрацию хитозана до 0,001%. Далее процесс проводят так, как описано в примере 1, при рН буферного раствора 5,5.

Получают 7,2 г комплексного ферментного препарата. Препарат содержит 0,75 мг белка на мг препарата. Липиды в препарате отсутствуют.

Пример 4. Гепатопанкреас камчатского краба (1 кг) измельчают и помещают в 3 л воды, доводя рН раствора бикарбонатом до значения 9,5, и выдерживают при перемешивании в течение 6 ч, при температуре 20 С°. Затем раствор центрифугируют при 2000 г и добавляют к супернатанту при интенсивном перемешивании раствор хитозана в 1,0 н. соляной кислоте, доводя конечную концентрацию хитозана до 0,001. Далее процесс проводят так, как описано в примере 1, при рН буферного раствора 9,5.

Получают 7,4 г комплексного ферментного препарата. Препарат содержит 0,78 мг белка на мг препарата. Липиды в препарате отсутствуют.

Ферментный препарат, получаемый заявляемым способом, имеет следующие характеристики:

порошок желтовато-серого цвета, растворимый в дистиллированной воде или буферном растворе, с легким специфическим запахом; препарат не содержит ионов тяжелых металлов, примесей, вредных и токсичных веществ; препарат практически не теряет активности в течение 4-х лет хранения в лиофильно высушенном состоянии при температуре +10°C;

удельная коллагенолитическая активность (коллаген I типа) составляет не менее 1,5 Ед/мг препарата/мин (определение удельной коллагенолитической активности проводят по методике МА 123.12.002-92);

удельная активность трипсиноподобной протеиназы (N-бензоил-аргинина-р-нитроанилид) составляет не менее 3,3 Ед/мг препарата/мин (определение протеиназной активности проводят по методу Эрлангера);

удельная общая протеолитическая активность (казеин) составляет не менее 0,7 Ед/мг препарата/мин (определение протеолитической активности проводят по стандартной методике в соответствии с ГОСТ 20264.2-88);

удельная активность щелочной РНКазы составляет не менее 35 Ед/мг препарата/час;

удельная активность кислой РНКазы составляет не менее 10 Ед/мг препарата/час;

удельная ДНКазная активность составляет не менее 400 Ед/мг препарата/час;

удельная активность щелочной фосфатазы составляет не менее 0,04 Ед/мг препарата/мин;

удельные активности щелочной и кислой фосфодиэстераз составляют не менее 0,003 Ед/мг препарата/мин;

удельная активность β-глюканазы составляет не менее 0,01 Ед/мг препарата/мин;

удельная амилазная активность составляет не менее 0,01 Ед/мг препарата/мин;

удельная липазная активность составляет не менее 250 Ед/мг препарата/мин.

Определение активностей ферментов проводят по методикам, приведенным в каталогах фирмы Sigma.

В процессе исследований было установлено, что молекулярная масса ферментов комплекса, обладающих наибольшей активностью, составляет 15-42 кДа. Наиболее активными компонентами комплекса являются сериновые коллагенолитические протеиназы, металлопротеиназы, щелочная ДНКазы, щелочная и кислая РНКазы, амилаза.

Формула изобретения

1. Способ получения ферментного препарата из гепатопанкреаса промысловых видов крабов, содержащего коллагенолитические протеиназы, предусматривающий гомогенизацию гепатопанкреаса промысловых крабов в буферном растворе, добавление

раствора хитозана в кислоте, отделение нерастворимого материала с последующей ультрафильтрацией полученного раствора и лиофилизацией целевого продукта, отличающийся тем, что гомогенат подвергают дополнительной очистке путем центрифугирования, а ультрафильтрацию осуществляют на мембране, пропускающей

5 вещества с молекулярной массой 15 кДа и ниже, собирая ферментный препарат, не проходящий через мембрану, затем сконцентрированный и обессоленный экстракт пропускают через мембрану, задерживающую вещества с молекулярной массой 50 кДа и выше, с получением препарата, дополнительно содержащего металлозависимые

10 протеиназы, рибонуклеазы, дезоксирибонуклеазы, фосфодиэстеразы, фосфатазы, амилазы, липазу и β -глюканазу.

2. Способ по п.1, отличающийся тем, что гомогенизацию и очистку осуществляют при рН ферментного раствора 5,5-9,5 и температуре 5-20°C.

3. Ферментный препарат из гепатопанкреаса промысловых видов крабов, содержащий коллагенолитические протеиназы, отличающийся тем, что он дополнительно содержит

15 металлозависимые протеиназы, рибонуклеазы, дезоксирибонуклеазы, фосфатазы, фосфодиэстеразы, амилазы, липазу и β -глюканазу и получен способом по п.1 или 2.

20

25

30

35

40

45

50