



(51) МПК

*C12N 5/04* (2006.01)*C12N 15/05* (2006.01)*A01H 1/04* (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,  
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21), (22) Заявка: 2006135294/13, 05.10.2006

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
05.10.2006

(45) Опубликовано: 10.06.2008 Бюл. № 16

(56) Список документов, цитированных в отчете о  
поиске: CN 1748472 A, 22.03.2006. KR  
20040011625, 11.02.2004. RU 2133621 C1,  
27.07.1999.

Адрес для переписки:

690022, г.Владивосток, пр-кт 100 лет  
Владивостока, 159, Тихоокеанский институт  
биоорганической химии ДВО РАН, зав.  
патентным отделом Н.И. Стадниченко

(72) Автор(ы):

Федореев Сергей Александрович (RU),  
Киселев Константин Вадимович (RU),  
Дубровина Александра Сергеевна (RU),  
Веселова Марина Владимировна (RU),  
Кулеш Надежда Ивановна (RU),  
Булгаков Виктор Павлович (RU),  
Журавлев Юрий Николаевич (RU)

(73) Патентообладатель(и):

БИОЛОГО-ПОЧВЕННЫЙ ИНСТИТУТ  
ДАЛЬНЕВОСТОЧНОГО ОТДЕЛЕНИЯ РАН (БПИ  
ДВО РАН) (RU),  
ТИХООКЕАНСКИЙ ИНСТИТУТ  
БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ  
ДАЛЬНЕВОСТОЧНОГО ОТДЕЛЕНИЯ РАН  
(ТИБОХ ДВО РАН) (RU)

## (54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ РЕЗВЕРАТРОЛА

(57) Реферат:

Изобретение относится к биотехнологии.  
Клеточную культуру винограда амурского *Vitis*  
*amurensis* Rupr. трансформируют

агробактериальным вектором, содержащим ген  
*rolB*, с последующим выделением целевого  
продукта. Способ обеспечивает существенное  
повышение выхода резвератрола. 3 ил., 1 табл.

RU 2 3 2 6 1 6 5 C 1

RU 2 3 2 6 1 6 5 C 1



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,  
PATENTS AND TRADEMARKS

(19) **RU** <sup>(11)</sup> **2 326 165** <sup>(13)</sup> **C1**

(51) Int. Cl.

*C12N 5/04* (2006.01)

*C12N 15/05* (2006.01)

*A01H 1/04* (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21), (22) Application: 2006135294/13, 05.10.2006

(24) Effective date for property rights: 05.10.2006

(45) Date of publication: 10.06.2008 Bull. 16

Mail address:

690022, g.Vladivostok, pr-kt 100 let  
Vladivostoka, 159, Tikhookeanskij institut  
bioorganicheskoj khimii DVO RAN, zav.  
patentnym otdelom N.I. Stadnichenko

(72) Inventor(s):

Fedoreev Sergej Aleksandrovich (RU),  
Kiselev Konstantin Vadimovich (RU),  
Dubrovina Aleksandra Sergeevna (RU),  
Veselova Marina Vladimirovna (RU),  
Kulesh Nadezhda Ivanovna (RU),  
Bulgakov Viktor Pavlovich (RU),  
Zhuravlev Jurij Nikolaevich (RU)

(73) Proprietor(s):

BIOLOGO-POCHVENNYJ INSTITUT  
DAL'NEVOSTOCHNOGO OTDELENIJa RAN (BPI  
DVO RAN) (RU),  
TIKHOKEANSKIJ INSTITUT  
BIOORGANICHESKOJ KHIMII  
DAL'NEVOSTOCHNOGO OTDELENIJa RAN  
(TIBOKh DVO RAN) (RU)

(54) **METHOD FOR PRODUCING REZVERATROL**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology.

SUBSTANCE: cell culture of Amur grape (*Vitis amurensis* Rupr.) undergoes transformation with an

agrobacterial vector comprising a *rolB* gene,  
followed by extraction of the target product.

EFFECT: increasing the yield of rezveratrol.  
3 dwg, 2 ex, 1 tbl

RU 2 3 2 6 1 6 5 C 1

RU 2 3 2 6 1 6 5 C 1

Изобретение относится к биотехнологии и может быть использовано для получения резвератрола - ценного биологически активного вещества.

Резвератрол обнаружен во многих растениях, однако виноград - это основной его источник. Резвератрол - это постоянная составляющая полифенольной фракции красных вин. Одно из его самых ценных свойств - мощная противоопухолевая активность, поскольку резвератрол эффективно действует против многих видов рака и предотвращает возникновение рака. Резвератрол также является известным антимуутагеном, антиоксидантом, обладает противовоспалительным, антибактериальным, противовирусным и противогрибковым действием [Aggarwal et al., Role of resveratrol in prevention and therapy of cancer: preclinical and clinical studies. *Anticancer Res.* 2004. 24(5A):2783-2840]. Многочисленные исследования свидетельствуют о способности резвератрола положительно влиять на сердечно-сосудистую, нервную системы, печень [Fremont L. Biological effects of resveratrol. *Life Sci.* 2000. 66(8):663-673].

Недавно появились данные о мощном положительном эффекте резвератрола на продолжительность жизни многих живых организмов, таких как дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*, нематода *Caenorhabditis elegans* и дрозофила *Drosophila melanogaster* [Howitz et al. Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. *Nature.* 2003. 425(6954); 191-196. Wood et al. Sirtuin activators mimic caloric restriction and delay ageing in metazoans. *Nature.* 2004. 430(7000):686-689].

В настоящее время нет эффективного способа получения резвератрола. Возможно получение резвератрола из дикорастущих растений винограда, но содержание его в растениях невелико, 0,01-0,05% от сухой биомассы. Кроме того, ресурсосведческие исследования показывают, что интенсивные заготовки дикорастущих лекарственных растений приводят к повсеместному истощению их запасов, исчезновению популяций и некоторых видов растений. Поскольку культурные сорта винограда *Vitis vinifera* выращиваются в больших масштабах во многих странах мира, предпринимались попытки получения резвератрола из ягод и листьев, в листьях растений культурных сортов винограда содержание резвератрола составляет 0,00012-0,00033% от сухой массы, в ягодах 0,000069-0,001%. В связи с таким низким выходом растения обрабатывались различными элиситорами, повышающими синтез вторичных метаболитов. Использование метилжасмоната и облучение ультрафиолетом, а также сочетание этих методов не повлияло на выход резвератрола в ягодах, а содержание его в листьях повысилось до 0,023-0,028% [Larronde et al. Airborne methyl jasmonate induces stilbene accumulation in leaves and berries of grapevine plants. *Am. J. Enol. Viticult.* 2003. 54(1):63-66].

Однако такой выход резвератрола является недостаточным для его промышленного получения. Поэтому поиск альтернативных сырьевых источников является актуальной проблемой. Применение биотехнологического приема, заключающегося в культивировании клеток с целью получения биологически активных веществ, позволяет решить эту проблему.

Известны культуры клеток винограда, содержащие резвератрол. Однако во всех описанных культурах резвератрол либо не обнаруживается [Sgabi et al., Phenol metabolism is differentially affected by ozone in two cell lines from grape (*Vitis vinifera* L.) leaf. *Plant Science.* 2003. 165:951-957], либо содержится в очень небольших количествах (0,00023-0,00046% от сухой массы клеток) [Tassoni et al. Jasmonates and Na-orthovanadate promote resveratrol production in *Vitis vinifera* cv. Barbera cell cultures. *New Phytol.* 2005. 166(3):895-905]. Для клеточных культур других видов растений максимальное содержание резвератрола найдено в каллусах арахиса 0,01% [Ku et al., Production of stilbenoids from the callus of *Arachis hypogaea*: a novel source of the anticancer compound piceatannol. *J. Agric. Food Chem.* 2005. 53(10):3877-3881].

При воздействии различных индукторов вторичного метаболизма на каллусные или суспензионные культуры клеток удалось повысить выход резвератрола. Клетки суспензионной клеточной культуры *V. vinifera* отвечали на обработку метилжасмонатом и

ортованадатом натрия 5-6-кратным увеличением продукции резвератрола, что составило 0,0023-0,0092% [Tassoni et al. Jasmonates and Na-orthovanadate promote resveratrol production in *Vitis vinifera* cv. Barbera cell cultures. *New Phytol.* 2005. 166(3):895-905]. Клеточные культуры *Arachis hypogaea* отвечали трехкратным увеличением продукции

5 резвератрола на обработку клеток ультрафиолетовым излучением, но содержание резвератрола не превысило 0,03% от сухого веса клеток, и при этом эффект исчезал через 24 часа после обработки. Метаболическая инженерия дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* не привела к ожидаемому авторами высокому содержанию резвератрола в среде, максимальный выход резвератрола составил 1,5 мкг/л [Becker et al. Metabolic  
10 engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for the synthesis of the wine-related antioxidant resveratrol. *FEMS Yeast Res.* 2003. 4(1):79-85].

Недавно получены самые интересные на сегодня данные с точки зрения практической биотехнологии, где выход резвератрола составил 100 мг/л в метаболически модифицированной *Escherichia coli*, экспрессирующей растительную стильбенсинтазу и 4-кумарил CoA лигазу [Watts et al. Biosynthesis of plant-specific stilbene polyketides  
15 in metabolically engineered *Escherichia coli*. 2006. *BMC Biotechnol.* 6:22]. Применение этой модельной системы для промышленного производства резвератрола возможно, однако и этот метод имеет определенные недостатки: дело в том, что бактерии способны быстро мутировать, поэтому высока вероятность быстрого сбоя в продукции резвератрола  
20 используемыми клетками.

В качестве прототипа выбран способ получения резвератрола из культуры клеток дикорастущего винограда *Vitis amurensis* Rupr., [Zamboni et al., Elicitor-induced resveratrol production in cell cultures of different grape genotypes (*Vitis* spp.). *VITIS.* 2006. 45 (2):63-68]. Каллусы этого вида винограда продуцируют резвератрол в  
25 количествах, превышающих его содержание в каллусах культурных сортов винограда *Vitis vinifera*.

Каллусы *Vitis amurensis* экстрагируют метанолом 12 ч в темноте при комнатной температуре. Экстракт центрифугируют и резвератрол определяют методом ВЭЖХ. Количество транс-резвератрола в каллусах составляет 0,012% от сухой массы каллусов.

30 Недостатком этого способа является низкий выход целевого продукта, который хотя и превышает содержание резвератрола в каллусах культурных сортов (0,00023-0,00046%), но является недостаточным для практических целей.

Задача изобретения - создание нового, экономически выгодного способа получения резвератрола.

35 Технический результат, обеспечиваемый изобретением, заключается в повышении выхода резвератрола.

Поставленная задача решена тем, что в известном способе получения резвератрола из клеточной культуры винограда амурского (*Vitis amurensis* Rupr.) согласно изобретению клеточную культуру трансформируют агробактериальным вектором, содержащим ген *rolB*, с  
40 последующим выделением целевого продукта.

Целевой продукт выделяют из полученной трансгенной культуры клеток *V. Amurensis* стандартным хроматографическим методом.

Ген *rolB* выделен ранее из плазмид *Agrobacterium rhizogenes* и встроен под контроль сильного промотора 35S [Spena et al. Independent and synergistic activity of *rol A*, *B* and *C* loci in stimulating abnormal growth in plants. *EMBO J.* 1987. 6(13):3891- 3899].  
45 Ген кодирует тирозин-фосфатазу и используется для модуляции процессов вторичного метаболизма в культурах растительных клеток. В одних случаях он существенно стимулирует синтез вторичных метаболитов [Bulgakov et al. Effect of salicylic acid, methyl jasmonate, ethephon and cantharidin on anthraquinone production by *Rubia cordifolia* callus cultures transformed with the *rolB* and *rolC* genes. *J. Biotechnol.* 2002. 97: 213-221], в других - ингибирует [Bulgakov et al. The impact of plant *rolC* oncogene on ginsenoside production by ginseng hairy root cultures. *Phytochemistry.* 1998. 49:1929-1934]. Причина этого явления неизвестна, так как действие тирозин-

фосфатаз в целом на вторичный метаболизм не изучено. Поэтому не является очевидным то, что генная трансформация клеточных культур растений однозначно приведет к увеличению выхода того или иного продукта.

Культуру каллусов растения *V. amurensis* Rupr., экспрессирующих ген *rolB*, получают следующим образом. Побеги дикорастущей лианы *V. amurensis* стерилизуют в 0,2% растворе диоксида (этанолртути хлорид и цетилпиридиния хлорид) в течение 5-8 мин. После трехкратного отмывания в стерильной дистиллированной воде из побегов вычленивают экспланты диаметром 3-5 мм и толщиной 1-2 мм. Экспланты помещают в пробирки 200×20 мм, содержащие по 15 мл стандартной питательной среды  $W_{B/A}$  [Bulgakov et al. J. Biotechnol. 2002. 97: 213-221]. Через 10 дней культивирования в темноте при 23-26°C и относительной влажности воздуха 60-70% из эксплантов образуются первичные каллусы. Через месяц со дня посадки каллусы отделяют от экспланта и пассируют на свежие питательные среды  $W_{B/A}$  для получения устойчивых каллусных линий и достижения необходимого масштаба размножения каллусов. Полученные каллусные линии содержат 0,020-0,026% резвератрола от сухой массы.

Затем активируют синтез резвератрола путем встройки гена *rolB* в ДНК клеток каллуса винограда. Для этого в ДНК каллусов винограда переносят ген *rolB* путем агробактериальной трансформации, выполняемой стандартным методом [Драйпер и др., и др. Генная инженерия растений. М.: Мир, 1991 г., 458 с.].

Используют известный агробактериальный трансформирующий вектор GV3101/pMP90RK/pPCV002-CaMVB [Spena et al., 1987. Independent and synergistic activity of *rol A*, *B* and *C* loci in stimulating abnormal growth in plants. EMBO J. 6(13):3891-3899], содержащий плазмиду pPCV002-CaMVB с генами *nptII* и *rolB* (фиг.1).

Штаммы агробактерий получали путем трансформацией плазмидами по описанной ранее методике [Bulgakov et al., 2002. J. Biotechnol 97: 213-221]. Плазмиды были любезно предоставлены профессором А. Спена (Германия). Используемый штамм агробактерий поддерживается в коллекционной культуре микроорганизмов группы биоинженерии Биолого-почвенного института ДВО РАН.

Наличие встройки гена *rolB* в ДНК клеток винограда и экспрессия гена проверяются стандартным методом, т.е. при помощи обратнo-транскриптазной полимеразной цепной реакции [McPherson M.J., Moller S.G. PCR, Bios Scientific Publishers, 2000, p.288.] (фиг.2).

После получения трансгенной культуры ее выращивают на питательной среде  $W_{B/A}$  в темноте при относительной влажности воздуха 50-70% и температуре 23-26°C в течение 30-40 суток. После указанного периода каллусы извлекают из культуральных сосудов и высушивают. Сухая каллусная ткань служит источником резвератрола, который можно выделить из нее стандартным хроматографическим методом.

Продуктивность резвератрола - параметр, который объединяет рост культуры и содержание в ней биологически активных веществ, - таким способом увеличилась более чем в 60 раз по сравнению с ранее полученными нетрансгенными клетками винограда амурского.

Для доказательства, что увеличение содержания резвератрола в VB культуре является действием гена *rolB*, получают векторную культуру VV. Для этого каллусы трансформируют путем кокультивации агробактерий GV3101/pMP90RK/pPCV002, в которых отсутствует ген *rolB* (фиг.1) с каллусными клетками винограда амурского. Успешность встройки доказывают с помощью ПЦР на наличие гена *nptII* по описанной ранее методике [Bulgakov et al., 2002 Effect of salicylic acid, methyl jasmonate, ethephon and cantharidin on anthraquinone production by *Rubia cordifolia* callus cultures transformed with the *rolB* and *rolC* genes. J. Biotechnol 97: 213-221].

В полученной культуре VV содержание резвератрола осталось на низком уровне, как и в нетрансгенных культурах клеток, в то время как содержание резвератрола в культуре VB составило 3%.

Таблица 1. Содержание и продуктивность резвератрола в клеточных культурах винограда амурского.		
Культура	Содержание резвератрола, % от сухой массы клеток	Продуктивность резвератрола, мг/л питательной среды

VV	0,03±0,01	3
VB	3,00±0,31	190

Таким образом, перенос гена *rolB* в культуру клеток винограда и его экспрессия вызвали увеличение продукции резвератрола.

На фиг.1 представлены схематические карты плазмид, используемых в работе. NOS промотор - промотор нопалинсинтазного гена; Ocs терминатор - терминатор октапинсинтазного гена; NOS терминатор - терминатор нопалинсинтазного гена; 35S - промотор вируса мозаики цветной капусты; *prtII* - ген неомицинофосфотрансферазы,; *rolB* - ген *rolB*.

На фиг.2 представлено доказательство экспрессии гена *rolB* в культуре *Vitis amurensis* с помощью ПЦР. VV - отсутствие сигнала на РНК, выделенной из культуры *Vitis amurensis*, не содержащей ген *rolB*; VB - сигнал гена *rolB* на РНК, выделенной из *rolB* трансгенной культуры; Pс - позитивный контроль, сигнал гена *rolB* с плазмиды pPCV002-CaMVb.

На фиг.3 представлены спектры ВЭЖХ экстрактов из каллусных культур *Vitis amurensis*. А - нормальные каллусы; Б - трансформированные геном *rolB* каллусы. 1 - дигидрохверцетин (внутренний стандарт), 2 - резвератрол.

Способ иллюстрируется следующими примерами.

Пример 1. Каллусы винограда массой 1 г помещают в 250 мл колбы с 40 мл жидкой питательной среды  $W_{B/A}$  [Bulgakov et al., 2002. J. Biotechnol 97: 213-221]. Суспензию каллусов культивируют в темноте при 24°C, относительной влажности воздуха 60% и перемешивании 60 об/мин. Через 3 суток в колбы добавляют по 50 мкл агробактерий *A. tumefaciens* (штамм GV3101/pMP90RK/pPCV002-CaMVb) в суспензионной среде LB (NaCl 10 г/л; пептон 10 г/л; дрожжевой экстракт 5 г/л; pH 7,5), оптическая плотность бактерий  $OD_{260}=0,65$ . Клетки *V. amurensis* инкубируют с агробактериями 2 суток, затем добавляют антибиотик цефотаксим в концентрации 250 мг/л для удаления агробактерий. Спустя 2 недели после добавления цефотаксима суспензию растительных клеток высаживают на твердую питательную среду  $W_{B/A}$ , содержащую антибиотики: цефотаксим 250 мг/л и канамицин 10 мг/л, для отбора трансгенных клеток. Через месяц активно растущие агрегаты пересаживают на свежие питательные среды с содержанием канамицина 20 мг/л и цефотаксима 250 мг/л. Таким путем отбор трансгенных клеток осуществляют с помощью селекции в присутствии канамицина в концентрации 20 мг/л в течение 5 месяцев. Далее отбирают активно растущие канамицин-устойчивые агрегаты, из которых получают пассируемые линии, которые далее культивируют на агаризованной среде без антибиотиков с 30-дневным интервалом. По истечении периода культивирования каллусы извлекают из культуральных сосудов, высушивают при 60°C в течение 24 ч и взвешивают.

Получают 6,4±0,5 г сухих каллусов с одной колбы. Чистый резвератрол получают из спиртового экстракта 6,4 г трансгенных клеток *V. amurensis* путем его упаривания и последующего хроматографирования на силикагеле (хлороформ - этиловый спирт 6:1). Получают целевой продукт в количестве 0,18 г. Таким образом, выход сухого остатка с содержанием резвератрола 98-99% составляет около 3% от веса сухой массы клеток *V. amurensis*.

Содержание резвератрола в нетрансформированных каллусах *V. amurensis* составляет 0,026±0,30% от сухой массы клеток (фиг.3А), в трансформированных геном *rolB* каллусах *V. amurensis* - 3,15±0,30 от сухой массы клеток (фиг.3Б).

Аналитическую ВЭЖХ проводят на хроматографе Agilent Technologies (серия 1100), снабженного системой насосов высокого давления QuatPump G 1311 A, дегазатором DEGASSER G1322A, инжектором G1328B и детектором VWD G1314A. Результаты анализов обрабатывались программой ChemStation® program var. 09. Условия хроматографирования: колонка (250×4 мм), заполненная сорбентом Hypersil BDS-C<sub>18</sub>, 5 мкм; градиентное элюирование: раствор 1% уксусной кислоты - 0-25 min, 5-50% B; 25-30 min, 50-90% B; 30-35 min, 90-95% B при  $\lambda$  - 280 нм.

Образец (100 мг) сухих каллусов экстрагируют этиловым спиртом (3 мл) при нагревании (60°C) в течение 2 часов. Экстракт отфильтровывают через фильтр с диаметром пор 4,5Å. Экстракт (450 мкл) смешивают с 50 мкл дигидрокверцетина (1 мг/мл), используемого в качестве внутреннего стандарта. В хроматограф вводят аликвоту 5 мкл испытуемого раствора. Расшифровку хроматограмм, определение относительного времени удерживания резвератрола осуществляют с помощью модельного соединения, выделенного и идентифицированного методом ЯМР-спектроскопии из растения *V. amurensis*.

Пример 2. Способ осуществляют, как описано в примере 1, но выделение целевого продукта осуществляют на сефадексе LH-20 (хлороформ - этиловый спирт 7:1). Получают резвератрол в количестве 0,18 г.

#### Формула изобретения

Способ получения резвератрола из клеточной культуры винограда амурского (*Vitis amurensis* Rupg.), отличающийся тем, что клеточную культуру трансформируют агробактериальным вектором, содержащим ген *rolB*, с последующим выделением целевого продукта.

20

25

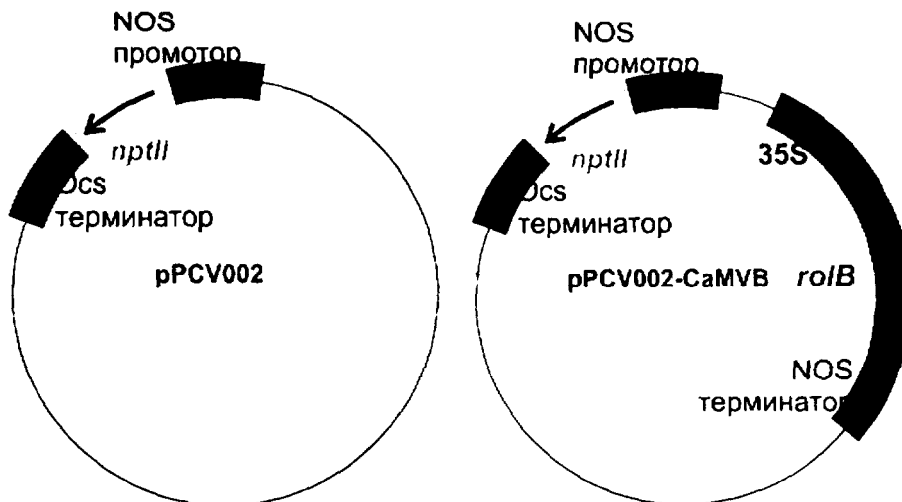
30

35

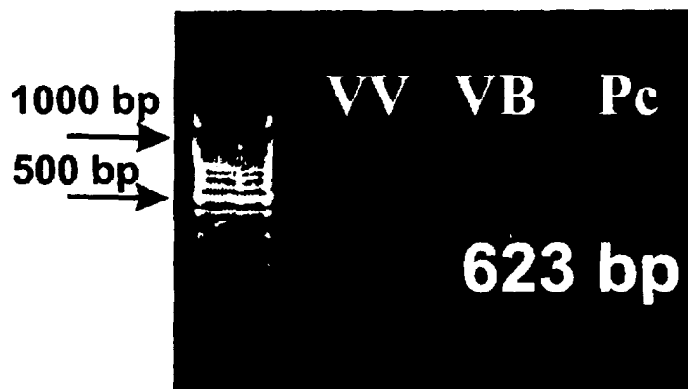
40

45

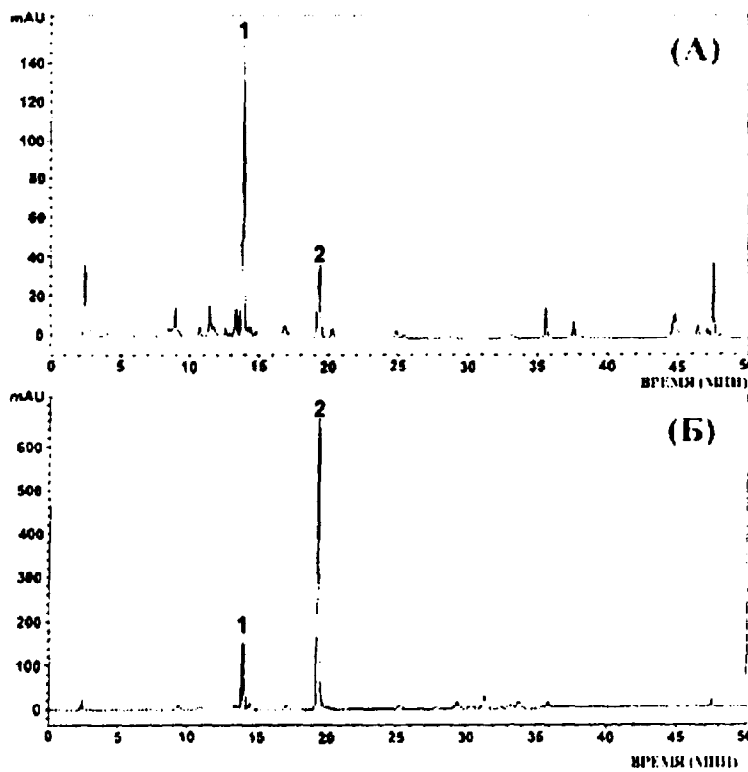
50



Фиг. 1



Фиг. 2



Фиг. 3