



**ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2010124456/10, 15.06.2010

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
15.06.2010

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 15.06.2010

(45) Опубликовано: 10.12.2011 Бюл. № 34

(56) Список документов, цитированных в отчете о
поиске: SU 936701 А, 23.04.1985. SU 1708845 А1,
30.01.1992. RU 2103365 С1, 27.01.1998.

Адрес для переписки:

630055, г.Новосибирск, б-р Молодежи, 30-6,
В.И. Ямковому

(72) Автор(ы):

**Ямковая Татьяна Витальевна (RU),
Вансовская Ирина Валерьевна (RU),
Загребельный Станислав Николаевич (RU),
Панин Лев Евгеньевич (RU),
Ямковой Виталий Иванович (RU)**

(73) Патентообладатель(и):

**Общество с ограниченной
ответственностью "ВИТАЛАНГ" (RU)****(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ВЫСОКОПОЛИМЕРНОЙ РНК ИЗ ОТРАБОТАННЫХ ПИВНЫХ ДРОЖЖЕЙ**

(57) Реферат:

Изобретение относится к области биохимии. Предложен способ получения высокополимерной дрожжевой РНК из отработанных пивных дрожжей. Сконцентрированные центрифугированием отработанные пивные дрожжи суспендируют в водном растворе олеиновой кислоты, оттитрованной щелочью до pH 7-8. Суспензию выдерживают при 98-102°C в течение 40-60 мин. Отстаивают горячий лизат в течение 20-24 ч при комнатной температуре. Надсадочную жидкость сливают с помощью сифона. Затем к слитой жидкости добавляют NaCl до

концентрации 2-3 М. Суспензию выдерживают 20-96 ч при комнатной температуре. Затем ее центрифугируют без охлаждения на низкоскоростной центрифуге. Полученный шрот промывают последовательно 2-3 М раствором NaCl и 92-96%-ным этанолом путем его ресуспендирования при комнатной температуре и низкоскоростного центрифугирования. Изобретение способствует расширению сырьевой базы и упрощению технологии производства высокополимерной РНК.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.
C12P 19/34 (2006.01)
C07H 21/02 (2006.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION(21)(22) Application: **2010124456/10, 15.06.2010**(24) Effective date for property rights:
15.06.2010

Priority:

(22) Date of filing: **15.06.2010**(45) Date of publication: **10.12.2011 Bull. 34**

Mail address:

**630055, g.Novosibirsk, b-r Molodezhi, 30-6, V.I.
Jamkovomu**

(72) Inventor(s):

**Jamkovaja Tat'jana Vital'evna (RU),
Vansovskaja Irina Valer'evna (RU),
Zagrebel'nyj Stanislav Nikolaevich (RU),
Panin Lev Evgen'evich (RU),
Jamkovoij Vitalij Ivanovich (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Obshchestvo s ogranichennoj otvetstvennost'ju
"VITALANG" (RU)****(54) METHOD FOR PRODUCING HIGH-POLYMER RNA FROM USED BEER YEAST**

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: what is offered is a method for producing high-polymer yeast RNA of used beer yeast. Used beer yeast concentrated by centrifugation is suspended in an aqueous solution of oleic acid titrated by alkali to pH 7-8. The suspension is kept at 98-102°C for 40-60 minutes. The hot lysate is settled for 20-24 h at room temperature. A supernatant is poured out with using a siphon. Then NaCl is added to the poured out liquid to the

concentration 2-3 M. The suspension is kept for 20-96 h at room temperature. Then it is centrifuged without cooling in a low-speed centrifuge. The prepared cakes are consistently washed out in the NaCl solution 2-3 M and 92-96% ethanol by resuspension at room temperature and low-speed centrifugation.

EFFECT: invention promotes spread-out of the raw-material base and simplification of the high-polymer RNA technology.

1 ex

Изобретение относится к области биотехнологии, в частности к выделению физиологически активных соединений.

Известные способы получения РНК из дрожжей позволяют выделять низкополимерную РНК, например [1, 2]. Она давно применяется в медицине при лечении широкого круга заболеваний: от вирусных инфекций до расстройств памяти [3]. Однако этот препарат вводится пациентам в граммовых количествах всегда перорально и механизм его действия включает, скорее всего, поставку мономеров для синтеза эндогенных нуклеиновых кислот. Механизм действия высокополимерной дрожжевой РНК принципиально иной. Она гораздо менее токсична, чем низкополимерная, и вводится животным в миллиграммовых количествах путем инъекций, что приводит к избирательной индукции синтеза некоторых белков, например гемоглобина [4].

Наиболее близким к предлагаемому является способ получения высокополимерной РНК из пекарских дрожжей путем суспендирования их в водном 0,3-1,2 М растворе 2-этилгексановой кислоты, содержащем 0,1-0,5 М NaCl (рН - 7,0-7,5), суспензию выдерживают при 92-98°C в течение 10-40 мин, охлаждают до комнатной температуры, центрифугируют при 4000 об/мин в течение 15 мин при 0-4°C, к надосадочной жидкости добавляют этанол до содержания 50-55 об.%, центрифугируют (4000 об/мин, 15 мин, 0-4°C), полученный осадок суммарной РНК растворяют в воде до содержания 150-200 OE_{260} /мл. Раствор осветляют центрифугированием при 20000 об/мин в течение 20 мин при 0-4°C. Затем к надосадочной жидкости добавляют NaCl до концентрации 2 М, выдерживают смесь при 0-4°C в течение 1-2 ч и осадок высокополимерной РНК отделяют путем центрифугирования, растворяют до 150-200 OE_{260} /мл, после центрифугирования полученного раствора (20000 об/мин, 20 мин, 0-4°C) к надосадочной жидкости добавляют NaCl до содержания 1,5 М и этанол до содержания 50-55 об.%. Осадок натриевой соли РНК собирают центрифугированием при 0-4°C, к надосадочной жидкости добавляют NaCl до 0,1-0,5 М и этанол до содержания 50-55 об.%, полученный осадок высокополимерной РНК отделяют и высушивают обычными методами [5].

Данный способ предполагает использование высококачественного сырья - пекарских дрожжей, что существенно ограничивает возможности его масштабирования и неприродного, редкого и высокотоксичного литического агента - 2-этилгексановой кислоты, что требует глубокой очистки конечного продукта, вследствие чего этот способ не экономичен и практически не масштабируем.

Целью изобретения является расширение сырьевой базы для производства биологически активной высокополимерной РНК, а именно замена высококачественного сырья на отходы пивного производства и замена неприродного, редкого и высокотоксичного литического агента на крупнотоннажный пищевой, что существенно удешевляет процесс, поскольку делает его практически безотходным.

Цель достигается тем, что отработанные пивные дрожжи концентрируют центрифугированием (2500-3500 g, 5-15 мин, без охлаждения), суспендируют в водном 1-2%-ном растворе олеиновой кислоты, оттитрованной щелочью до рН 7-8, суспензию выдерживают при 98-102°C в течение 40-60 мин, отстаивают горячий лизат в течение 20-24 ч при комнатной температуре, к слитой с помощью сифона надосадочной жидкости добавляют NaCl до концентрации 2-3 М, суспензию выдерживают 20-96 ч при комнатной температуре, центрифугируют (2500-3500 g, 5-15 мин, без охлаждения), осадок промывают 2-мя порциями 2-3 М раствора NaCl и 5-ю

порциями 92-96%-ного этанола путем последовательного его ресуспендирования при комнатной температуре и центрифугирования (2500-3500 g, 5-15 мин, без охлаждения). Из полученного шрота высокополимерную РНК экстрагируют дистиллированной водой и высушивают обычным методом. Попутно получают концентрат кормового белка и низкополимерную РНК.

При снижении центробежного ускорения ниже 2500 g и времени центрифугирования менее 5 мин осадок высокополимерной РНК образуется рыхлый и тянется за декантируемым супернатантом, а увеличение ускорения более 3500 g и времени центрифугирования более 15 мин не приводит к дополнительному его уплотнению.

Пример осуществления предлагаемого способа

Экстракция РНК. 1 кг сконцентрированных центрифугированием (3000 g, 10 мин, без охлаждения) отработанных пивных дрожжей (ОАО «Родник», г.Новосибирск; ООО «Тинькофф», г.Новосибирск; ООО «Петровичь», г.Ставрополь) суспендировали по порциям в течение 20 мин в 2 л кипящей воды, содержащей 45 г олеиновой кислоты (ЗАО «Купавнареактив», соответствует квалификации «ч» по ТУ 6-09-5290-86), оттитрованной 20 мл 2,5 М NaOH так, чтобы температура суспензии не опускалась ниже 98°C. Суспензию кипятили 40 мин при 98-102°C и частом перемешивании. По мере упаривания добавляли в нее кипящую воду до 3 л. Через 10, 20 и 30 мин после суспендирования последней порции дрожжей в кипящую суспензию добавляли по 10 мл 2,5 М NaOH. По окончании экстракции в суспензию добавляли кипяченую воду до 4,5 л, перемешивали, переносили в узкий цилиндрический сосуд на 5 л из термостойкого стекла, в котором она и отстаивалась при комнатной температуре в течение 22 ч.

Высаливание высокополимерной РНК и сбор концентрата кормового белка. Отстоявшийся супернатант (~ 2,9 л) сливали с помощью сифона в стеклянную емкость на 5 л. Киселеобразный дрожжевой шлам, собирающийся на дне сосуда и содержащий до 70% денатурированного белка, сушили при 58-62°C обычным способом. В супернатант же добавляли 620 г NaCl (ФГУП комбината «СИБСОЛЬ», г.Усолье-Сибирское, Иркутская обл., ГОСТ Р 51574-2000) и свежекипяченую воду до 3,5 л. Суспензию интенсивно перемешивали до полного растворения соли и оставляли для формирования осадка при комнатной температуре на 22 ч.

Промывка высоленной высокополимерной РНК 3 М раствором NaCl и этанолом и осаждение из отходов 3 М раствора NaCl низкополимерной РНК концентрированной HCl. Далее высоленный осадок-шрот, содержащий высокополимерную РНК, отделяли от супернатанта центрифугированием (3000 g, 10 мин, без охлаждения), промывали 2-мя порциями по 0,8 л 3 М раствора NaCl и 5-ю порциями по 200 мл 94%-ного этанола (ОАО «Спиртовой комбинат», г.Мариинск, Кемеровская обл., ГОСТ Р 51652-2000); при этом шрот отделяли от 3 М раствора NaCl и этанола центрифугированием (3000 g, 10 мин, без охлаждения). Отработанный спирт регенерировали двойной перегонкой. Содержащуюся же в супернатанте (~ 3,5 л) из-под высокополимерной РНК низкополимерную РНК осаждали добавлением 7 мл концентрированной HCl. Сформировавшийся в течение 2 сут при температуре 5-25°C осадок низкополимерной РНК выделяли центрифугированием (3000 g, 10 мин, без охлаждения), промывали 2-мя порциями по 400 мл 94%-ного этанола и сушили на воздухе при комнатной температуре.

Товарную высокополимерную РНК получали экстракцией ее из промытого шрота дистиллированной водой, осветлением экстракта центрифугированием (3000 g, 10 мин, без охлаждения) и заключительной лиофилизацией.

Из 1 кг сконцентрированных центрифугированием отработанных пивных дрожжей получали до 4,0 г высокополимерной РНК со следующими характеристиками: цвет лиофилизованного препарата - белый; растворимость в воде - удовлетворительная; весовая экстинкция, $OE_{260}/\text{мг}$ - 16-18; содержание КРФ, % $\leq 7,5$; прирост КРФ за 1 сут при 20-25°C в дистиллированной воде, % $\leq 3,0$; спектральные отношения: D_{230}/D_{260} - 0,40-0,55; D_{250}/D_{260} - 0,90-0,94; D_{280}/D_{260} - 0,50-0,60.

При сравнении характеристик выделенной предлагаемым способом высокополимерной РНК с аналогичными характеристиками Полирибоната (согласно ТУ 9291-002-44040845-2004 для Полирибоната сорта А: весовая экстинкция, $OE_{260}/\text{мг}$ ≥ 16 ; содержание КРФ, % ≤ 3 ; спектральные отношения: D_{230}/D_{260} - данных нет; D_{250}/D_{260} - 0,86-0,95; D_{280}/D_{260} - 0,44-0,50), выделенного по способу-прототипу [5], видно, что они отличаются в основном содержанием КРФ. У высокополимерной РНК, выделенной предлагаемым способом, этот показатель выше. Однако, как было показано в работе [4] на Полирибонате, большое значение КРФ для высокополимерной РНК не является критическим препятствием для проявления ее биологической активности.

Источники информации

1. Патент РФ №2103365.
2. Патент РФ №1708845.
3. Земсков В.М., Лидак М.Ю., Земсков А.М., Микстайс У.Я. // Низкомолекулярная РНК: получение, гидролиз и применение в медицине. - Рига: Зинатне, 1985. - 191 с.
4. Ямковая Т.В., Ямковой В.И., Панин Л.Е. Биологическая активность разных препаратов РНК из пекарских дрожжей. // Бюллетень Сибирского отделения РАМН. - Новосибирск, 2006. - №3(121). - С.117-121.
5. Авторское свидетельство SU 936701.

Формула изобретения

Способ получения высокополимерной РНК из дрожжей путем суспендирования их в кипящем растворе литического агента с последующим продолжительным кипячением суспензии, отстаиванием горячего лизата при комнатной температуре, осаждением высокополимерной РНК из супернатанта хлористым натрием и промывкой осадка раствором хлористого натрия и этанолом путем последовательного его ресуспендирования - центрифугирования и выделения конечного продукта из полученного шрота экстракцией водой, отличающийся тем, что сконцентрированные центрифугированием отработанные пивные дрожжи суспендируют в водном растворе олеиновой кислоты оттитрованной щелочью, суспензию выдерживают при 98-102°C в течение 40-60 мин, отстаивают горячий лизат в течение 20-24 ч при комнатной температуре, к слитой надосадочной жидкости добавляют NaCl до концентрации 2-3 М, суспензию выдерживают 20-96 ч при комнатной температуре, центрифугируют на низкоскоростной центрифуге без охлаждения, полученный шрот промывают последовательно 2-3 М раствором NaCl и 92-96%-ным этанолом путем его ресуспендирования при комнатной температуре и низкоскоростного центрифугирования.