

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202091492** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки  
2020.09.09

(51) Int. Cl. *A01N 65/03* (2009.01)  
*A01P 21/00* (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
2018.12.17

---

(54) **СПОСОБ ИДЕНТИФИКАЦИИ И ВЫДЕЛЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ ИЗ ЭКСТРАКТОВ МОРСКИХ ВОДОРΟΣЛЕЙ**

---

(31) 17 62345

(32) 2017.12.18

(33) FR

(86) PCT/EP2018/085254

(87) WO 2019/121539 2019.06.27

(71) Заявитель:  
ЛАБОРАТУАР ГОЭМАР (FR)

(72) Изобретатель:

Конан Селин, Потэн Филипп, Гибуало  
Анн, Бесс Саманта, Жубер Жан-Мари  
(FR)

(74) Представитель:

Ловцов С.В., Вилесов А.С., Гавриков  
К.В., Коптева Т.В., Левчук Д.В.,  
Стукалова В.В., Ясинский С.Я. (RU)

---

(57) Предложен способ выделения и очистки биологически активных соединений из экстрактов, полученных из морских водорослей. Способ включает стадии: (а) циркуляция экстракта через ультрафильтрационную мембрану с подходящим уровнем отсечения по молекулярной массе; (b) сбор фильтрата из экстракта для получения первой фракции фильтрата и ретентата, и (с) промывка ретентата для получения одной или более дополнительных фракций фильтрата. Затем может быть оценена биологическая активность первой фракции фильтрата и дополнительных фракций фильтрата, чтобы определить их эффективность в отношении роста растений. Также описана одна или более биологически активных молекул, выделенных из вида водорослей, причем одна или более биологически активных молекул имеют молекулярную массу в диапазоне примерно от 0,15 до 1,0 кДа и обладают возможностью усиления или улучшения роста растений.

**A1**

**202091492**

**202091492**

**A1**

## **СПОСОБ ИДЕНТИФИКАЦИИ И ВЫДЕЛЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ ИЗ ЭКСТРАКТОВ МОРСКИХ ВОДОРОСЛЕЙ**

### **ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ**

[001] Настоящее изобретение в целом относится к способу очистки и выделения биологически активных соединений, ответственных за стимуляцию роста растений, из экстрактов морских водорослей.

### **УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ**

[002] Одна из задач современного сельского хозяйства заключается в том, чтобы удовлетворить общественный спрос на устойчивость, качество и безопасность сельскохозяйственного производства и приспособиться к увеличению численности населения мира путем повышения урожайности и устойчивости растений к изменяющейся окружающей среде.

[003] Для улучшения питания растений могут быть использованы биостимуляторы, которые влияют на параметры урожайности и качества. Растительные биостимуляторы обычно входят в одну из этих категорий, то есть гормонсодержащие продукты, продукты на основе растительных экстрактов, продукты на основе микроэлементов, продукты, содержащие аминокислоты, и продукты, содержащие гуминовую кислоту, но не могут быть абсолютно ограничены только этими категориями. Растительные биостимуляторы используют для обработки сельскохозяйственных культур в условиях товарного производства ввиду их способности увеличивать темпы роста, повышать стрессоустойчивость, повышать скорость фотосинтеза и повышать устойчивость к болезням. Обычно считается, что растительные биостимуляторы действуют за счет активации или подавления ключевых генов биологических путей.

[004] Как определено Европейским советом производителей биостимуляторов (European Biostimulant Industry Council, EBIC), растительные биостимуляторы содержат вещество (вещества) и/или микроорганизмы, функция которых при применении к растениям или ризосфере заключается в стимулировании естественных процессов для усиления/улучшения усвоения питательных веществ, эффективности питательных веществ, устойчивости к абиотическому стрессу и качества урожая. Биостимуляторы не

оказывают прямого действия на вредителей и, следовательно, не подпадают под действие нормативной базы пестицидов.

[005] Биостимуляторы имеются на рынке в различных составах и с различными ингредиентами, но обычно их подразделяют на основе их источника и содержимого. Эти группы включают гуминовые вещества (humic substances, HS) и продукты, содержащие аминокислоты (amino acid containing products, AACP).

[006] Биостимуляторы имеются на рынке в разнообразных составах и с различными ингредиентами, но обычно подразделяются на семь основных групп на основе своего источника и содержимого. Эти группы включают гуминовые вещества (гуминовые кислоты и фульвокислоты), гидролизаты белков и другие N-содержащие соединения, экстракты морских водорослей и растительные экстракты, хитозан и другие биополимеры, неорганические соединения, полезные грибы и полезные бактерии.

[007] Несмотря на наличие на рынке многочисленных удобрений и растительных биостимуляторов, по-прежнему существует потребность в улучшенных продуктах, способных удовлетворить различные потребности. Поэтому необходимы новые продукты и способы улучшения ростовой реакции и развития растений.

[008] Водоросли и продукты, полученные из морских водорослей, широко используются в системах растениеводства вследствие наличия в этих продуктах ряда веществ, стимулирующих рост растений. Таким образом, потенциал биостимуляции многих из этих продуктов не был полностью использован из-за отсутствия научных данных о факторах роста, имеющихся в водорослях, и различных способах их воздействия на рост растений.

[009] Хотя было изучено физиологическое воздействие экстрактов морских водорослей на защиту растений и рост растений, мало что известно о конкретных биологически активных соединениях в экстрактах морских водорослей, которые ответственны за эти стимуляторы растений. Было бы желательно ускорить идентификацию указанных биоактивных компонентов в водорослях, включая, например, экстракты бурых водорослей.

[0010] Phaeophyceae или бурые водоросли представляют собой большую группу, главным образом, морских многоклеточных морских водорослей, включая многие виды морских водорослей, расположенные в обоих водных полушариях. Они играют важную

роль в морской среде, как в качестве пищи, так и в качестве среды обитания. Многие бурые водоросли, такие как представители отряда Fucales, обычно растут вдоль скалистых берегов. Во всем мире известно более 1500 видов бурых водорослей. Некоторые виды, такие как *Ascophyllum nodosum*, важны для товарного использования, а также оказывают воздействие на окружающую среду.

[0011] В патенте США В US 7611716, выданном Michailovna и др., описан способ обработки морских водорослей для получения в едином процессе экстрактов, содержащих кислотные и нейтральные полисахариды, и экстракта, содержащего низкомолекулярные биологически активные соединения, которые могут быть использованы в медицине, пищевой, парфюмерной и косметической промышленности. Однако в этой ссылке описан только способ обработки морских водорослей, и он не обеспечивает какой-либо способ идентификации потенциальных растительных биостимулирующих соединений, содержащихся в них.

[0012] В патенте США US 3856569, выданном Strong, описан способ очистки и концентрирования необходимого полисахарида, такого как каррагинин или альгинат, из водных растворов, полученных из морских водорослей (Rhodophyceae и Phaeophyceae), путем подвергания растворов ультрафильтрации. Однако и в этой ссылке описан только способ обработки морских водорослей, и он не обеспечивает какой-либо способ идентификации растительных биостимулирующих соединений, содержащихся в них.

[0013] Из-за растущего спроса на продукты, которые являются органическими, экологически чистыми и безвредными для здоровья человека, потребность в природных биостимуляторах возросла. Кроме того, существует потребность в аналогичных или более эффективных биостимуляторах, чем традиционные биостимуляторы, которые уже используют. Кроме того, в данной области техники остается потребность в улучшенном способе выделения и очистки биостимулирующих соединений, в том числе из экстрактов, полученных из морских водорослей.

### **СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

[0014] Целью настоящего изобретения является идентификация и очистка веществ, которые можно использовать в качестве биостимуляторов растений.

[0015] Другой целью настоящего изобретения является идентификация и очистка биологически активных соединений в различных экстрактах морских водорослей, которые отвечают за стимуляцию роста растений.

[0016] С этой целью в одном варианте осуществления настоящее изобретение в целом относится к одной или нескольким биологически активным молекулам, выделенным из видов водорослей, причем одна или несколько биологически активных молекул имеют молекулярную массу в диапазоне примерно от 0,15 кДа до 1,0 кДа.

[0017] В другом варианте осуществления настоящее изобретение в целом относится к способу выделения и очистки биологически активных соединений в экстракте, полученном из морских водорослей, причем способ включает стадии:

[0018] а) циркуляция экстракта через ультрафильтрационную мембрану с подходящим уровнем отсечения по молекулярной массе;

[0019] б) сбор фильтрата из экстракта морских водорослей для получения первой фракции фильтрата и ретентата, и

[0020] с) промывка ретентата для получения одной или более дополнительных фракций фильтрата.

### **КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ**

[0021] Для более полного понимания изобретения сделана ссылка на следующее описание, связанное с прилагаемыми фигурами, на которых:

[0022] На фиг. 1a и 1b изображено фракционирование с помощью эксклюзионной хроматографии по размеру (Size Exclusion Chromatography, SEC), выполненное на фильтруемом экстракте RM-3496, и хроматограмма образцов, введенных в SEC для оценки средней молекулярной массы молекул, представленных в разных фракциях.

[0023] На фиг. 2 изображены диаграммы размаха, показывающие эффективность SEC-фракционирования для экстракта RM-3496 на салатах.

[0024] На фиг. 3a и 3b показаны диаграммы размаха, показывающие массу свежих побегов и массу свежих корней *in vitro* культур *Arabidopsis thaliana*, обработанных фракцией F3, по сравнению с необработанным контрольным образцом, экстрактом RM-3496 и восстановленным экстрактом RM-3496.

[0025] На фиг. 4 изображен вид процесса ультрафильтрации в соответствии с одним аспектом настоящего изобретения.

[0026] На фиг. 5 изображены диаграммы размаха, показывающие массу свежих побегов салатов, обработанных различными ультрафильтрованными фракциями, ретентатами и экстрактами.

[0027] На фиг. 6 изображены диаграммы размаха, показывающие массу свежих побегов пшеницы, обработанных различными ультрафильтрованными фракциями, ретентатами и экстрактами.

### **ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ПРЕДПОЧТИТЕЛЬНЫХ ВАРИАНТОВ РЕАЛИЗАЦИИ**

[0028] Под растительными биостимуляторами подразумевают органический материал, содержащий вещество (вещества) и/или микроорганизмы, функция которых при применении к растениям или ризосфере заключается в стимулировании естественных процессов для усиления/улучшения усвоения питательных веществ, эффективности питательных веществ, устойчивости к абиотическому стрессу и качества урожая.

[0029] При представлении элементов настоящего изобретения или предпочтительного (предпочтительных) варианта (вариантов) его осуществления формы единственного числа и термин «указанный» предназначены для обозначения того, что имеется один или более элементов. Термины «содержащий», «включающий» и «имеющий» обозначают «включающий» и означают, что могут иметься дополнительные элементы, помимо перечисленных элементов.

[0030] Используемый в настоящем документе термин «примерно» относится к измеряемому значению, такому как параметр, величина, временная длительность и т. п., и подразумевается, что он включает отклонения +/- 15% или менее, предпочтительно отклонения +/- 10% или менее, более предпочтительно отклонения +/- 5% или менее, еще более предпочтительно отклонения +/- 1% или менее, и еще более предпочтительно отклонения +/- 0,1% или менее от конкретного приведенного значения, в той мере, в которой такие отклонения целесообразно выполнять в описанном в настоящем документе изобретении. Кроме того, также следует понимать, что значение, к которому относится атрибут «примерно», само по себе конкретно раскрыто в настоящем документе.

[0031] В настоящем изобретении описан способ очистки и выделения биостимулирующих соединений из экстрактов, полученных из морских водорослей, которые способны увеличивать скорость роста и урожайность широкого спектра сельскохозяйственных культур.

[0032] Как описано в настоящем документе, в одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к способу очистки биологически активных соединений, ответственных за стимуляцию роста растений, в экстрактах морских водорослей, путем метаболомного профилирования экстрактов морских водорослей.

[0033] С этой целью в одном варианте осуществления настоящее изобретение в целом относится к одной или более биологически активных молекул, выделенных из видов водорослей, причем одна или более биологически активных молекул имеют молекулярную массу в диапазоне примерно от 0,15 кДа до 1,0 кДа. Одна или более биологически активных молекул представляют собой молекулы, способные улучшать рост растений. В одном варианте осуществления вид водорослей представляет собой вид бурых водорослей. Бурые водоросли могут включать в себя вид водорослей, выбранный из группы, включающей виды *Ascophyllum nodosum*, *Fucus vesiculosus*, *Sargassu* и комбинации одного или более из вышеперечисленных. В одном варианте осуществления одна или более биологически активных молекул не содержат сульфатированный полисахарид или ламинарин.

[0034] Настоящее изобретение также в целом относится к способу улучшения роста растений, включающему стадию нанесения композиции, содержащей выделенную одну или более биологически активных молекул по меньшей мере на одно из: почву, растения или семена. Улучшение роста растений включает по меньшей мере одно из следующего: содействие прорастанию семян, стимулирование развития корней, продление вегетационного периода, увеличение периода продуктивности или увеличение периода сбора урожая.

[0035] Настоящее изобретение в целом также относится к способу выделения и очистки биологически активных соединений в экстракте, полученном из морских водорослей, причем способ включает стадии:

[0036] а) циркуляция экстракта через ультрафильтрационную мембрану с подходящим уровнем отсечения по молекулярной массе;

[0037] б) сбор фильтрата из экстракта для получения первой фракции фильтрата и ретентата, и

[0038] с) промывка ретентата для получения одной или более дополнительных фракций фильтрата.

[0039] Способ дополнительно включает стадию оценки биологической активности первой фракции фильтрата и дополнительных фракций фильтрата для определения их эффективности в отношении роста растений. Эффективность роста растений включает по меньшей мере одно из следующего: содействие прорастанию семян, стимулирование развития корней, продление вегетационного периода, увеличение периода продуктивности или увеличение периода сбора урожая. Согласно одному варианту осуществления экстракт получают из видов бурых водорослей. Экстракт может быть получен из водорослей видов *Ascophyllum nodosum*, *Fucus vesiculosus* или *Sargassum*.

[0040] В одном предпочтительном варианте осуществления ретентат включает активные молекулы, выбранные из группы, состоящей из сульфатированных полисахаридов и ламинарина, которые представляют собой активные молекулы, способные облегчать абиотический стресс, такой как избыток соли, в сельскохозяйственных культурах. Первый фильтрат содержит биологически активные молекулы, имеющие молекулярную массу в диапазоне примерно от 0,15 кДа до 1,0 кДа.

[0041] Ультрафильтрационная мембрана может иметь уровень отсека по молекулярной массе (molecular weight cutoff, MWCO) менее 3 кДа, предпочтительно MWCO менее 2 кДа и наиболее предпочтительно MWCO менее 1 кДа.

[0042] *Ascophyllum nodosum* (водоросль, растущая на скале) представляет собой вид фукусных бурых водорослей, встречающимся в Северной Атлантике, и используется в качестве источника биостимулятора для сельскохозяйственных культур с целью улучшения роста растений, продуктивности растений и качества продуктов питания.

[0043] Для обессоливания и очистки этих экстрактов морских водорослей в соответствии с полярностью и размером молекул были проанализированы несколько способов очистки. Для каждой процедуры очистки фракции анализировали на листьях салата для гарантии, что биологическая активность сохранялась в другой обессоленной фракции или оставалась связанной с солями. Эта стадия очистки была применена к экстракту морских водорослей (RM-2705, экстракт фукусов, поставляемый Goëmar), и



неполярные очищенные фракции показали высокий уровень чистоты. Большинство биомолекул (около 69 %) были совместно элюированы солями, чтобы показать, что биологически активные молекулы были расположены в одной из неполярных очищенных фракций. После этого различные фракции были испытаны на листьях салата по сравнению с цельным экстрактом. Однако результаты показали, что биологически активные молекулы, ответственные за стимуляцию роста растений, имелись в полярной фракции, которая также содержала соли. Было установлено, что фракционирование в соответствии с полярностью молекул, содержащихся в экстрактах RM-2705 и RM-3496, не подходит для обессоливания и очистки экстрактов морских водорослей. Действительно, для всех используемых способов фракционирования биологически активные молекулы оставались связанными с солями.

[0044] Таким образом, возникла проблема, связанная с поиском другого способа обессоливания экстрактов морских водорослей при сохранении биостимулирующей активности роста растений. Были исследованы различные способы очистки, включая экстракцию жидкости жидкостью (Liquid Liquid Extraction, LLE) с помощью этилацетата, твердофазную экстракцию (Solid Phase Extraction, SPE) с помощью различных сорбентов (нормальная фаза: цианопропил-диоксид кремния и обратная фаза Amberlite® XAD2), экстракцию твердого вещества жидкостью (Solid Liquid Extraction, SLE) с помощью бутанола и эксклюзионную хроматографию (SEC).

[0045] Кроме того, для получения информации, касающейся стабильности биологически активных молекул, была проанализирована теплоустойчивость активности экстракта RM-2705 на листьях салата. Результаты показали теплоустойчивость биологически активных молекул, и автоклавирование или кипячение обработанных экстрактов увеличивало массу свободных побегов салата.

[0046] Фракционирование в соответствии с полярностью оказалось неэффективным при очистке биологически активных молекул, поэтому экстракт морских водорослей фракционировали в соответствии с размером частиц его молекул при попытке его обессоливания.

[0047] Было установлено, что все указанные способы оказались неэффективными для этой цели, за исключением эксклюзионной хроматографии (SEC) со смолой Superdex®30, также называемой гель-фильтрационной хроматографией (Gel Filtration Chromatography,

GF). Было обнаружено, что SEC является единственным эффективным способом обессоливания и очистки фильтрата морских водорослей.

[0048] Исходя из этого, экстракт морских водорослей (RM-3496) фракционировали с помощью процесса SEC-фракционирования, и молекулы элюировали в соответствии с их размером (или молекулярной массой), как показано на фиг. 1 а. Смолы ASuperdex30® (GE Healthcare, Björkgatan, Швеция) использовали для обеспечения достаточного разделения молекул с молекулярной массой ниже 10 кДа. Чем меньше молекулы (т. е., с меньшими молекулярными массами), тем больше они захватываются пористыми шариками геля и элюируются позже. Таким образом, молекулярные массы молекул уменьшаются от первой фракции (то есть, F1) до последней фракции (то есть, F6). Фракции F1 и F2 состояли из более крупных молекул, которые проходят через колонку быстрее, чем соли, и молекулы с очень низкой молекулярной массой элюируются во фракциях F5 и F6.

[0049] Для оценки диапазонов молекулярной массы молекул, содержащихся в различных фракциях, в систему SEC вводили смесь образцов (0,5 % мас./об.). Хроматограмма образцов изображена на фиг. 1.b. а) ламинарин (примерно от 3 до 5 кДа), б) рафиноза (594 Да), в) сахароза (343,3 Да), г) соль лимонной кислоты (343,3 Да), д) маннит (182,2 Да) и е) глицин (75,1 Да). Согласно этим результатам фракция F1 содержала молекулы с высокой молекулярной массой (выше 4 кДа), фракция F2 содержала ламинарин (примерно от 3 до 4 кДа), который элюировался между фракциями F1 и F2.

[0050] Ультрафильтрат, полученный после ультрафильтрации экстракта RM-2705 в системе ультрафильтрации с мембраной с уровнем отсечения 1 кДа, вводили в систему SEC. Хроматографический профиль ультрафильтрата показал только хроматографические пики, соответствующие пикам фракций F3, F4, F5 и F6, полученным при SEC-фракционировании экстракта RM-2705. Таким образом, фракция F3 содержала молекулы с молекулярной массой от 1 кДа до 0,18 кДа, фракция F4 содержала молекулы с молекулярной массой менее 0,2 кДа, такие как маннит (182,2 Да), а фракции F5 и F6 содержали соли и молекулы с очень низкой молекулярной массой, такие как глицин (75 Да). Спектры ядерного магнитного резонанса (nuclear magnetic resonance, NMR) различных фракций подтвердили наличие сульфатированных полисахаридов (полимеров фукозана) в первой фракции F1, в то время как вторая фракция F2 содержит ламинарин

(примерно от 3 до 4 кДа), а четвертая фракция F4 содержит маннит (182,2 Да). Последние две фракции F5 и F6 содержали молекулы с очень низкой молекулярной массой и соли.

[0051] Различные фракции, полученные путем SEC-фракционирования, были протестированы на активность стимулирования роста растений на салатах по сравнению с экстрактом из цельных водорослей RM-3496. Перед инъекцией в хроматографии экстракт морских водорослей фильтровали, и фильтрованный экстракт также тестировали на салате, чтобы проверить его эффективность. Результаты показали, что биологически активные молекулы были обнаружены во фракции F3, как показано на фиг. 2. Значительная активность была обнаружена во фракции F3, которая содержала молекулы в диапазоне примерно от 0,15 кДа до 1 кДа.

[0052] Сочетание различных способов, используемых для обессоливания экстракта RM-2705, обеспечило информацию о физико-химических свойствах биологически активной молекулы (молекул). В частности, было определено, что биологически активные молекулы являются полярными, и их молекулярные массы находятся в диапазоне примерно от 0,15 до 1 кДа. Таким образом, эта информация исключает из стимулирующих рост биологически активных полимеров полимеры фукозана, которые представляют собой основные сульфатированные полисахариды в кислотном экстракте *Ascophyllum nodosum*, ламинарин (от 3 до 4 кДа), бета-1,3-глюкановый стимулятор реакций и маннит (182 Да), полиол, который может составлять до 8-10 % экстракта по сухой массе.

[0053] Для подтверждения биологической активности очищенной фракции F3 была разработана и воспроизведена несколько раз культура *in vitro* с использованием модельного растения *Arabidopsis thaliana*. Эти тесты, показанные на фиг. 3 а, подтвердили биологическую активность фракции F3, в то время как наличие солей в экстракте RM-3496 нарушало рост *Arabidopsis thaliana* в этих условиях культивирования. Однако восстановленный RM-3496, соответствующий восстановлению экстракта морских водорослей с помощью фракций SEC, продемонстрировал стимулирующую рост активность. Более того, в этой биопробе *in vitro* фракция F3 и восстановленный RM-3496 также, по-видимому, усиливают рост корней, как показано на фиг. 3б.

[0054] Фракция F3 проявляла сильную стимулирующую рост активность, тогда как фракции F1 и F2 были неактивными. Однако во время проведения последней биопробы было показано, что в присутствии соли (100 мМ NaCl) фракция F3 больше не активна для

стимуляции роста, тогда как фракции F1 и F2 проявляют аналогичные эффекты, и что цельный экстракт RM 2705 придает солевыносливость. Эти результаты показывают, что экстракт RM-2705 содержит различные активные соединения с разными способами действия, включая (1) фракцию с низкой молекулярной массой (LMW), ответственную за стимуляцию роста, и (2) фракции, содержащие ламинарин и фукозаны, которые придают стрессоустойчивость (солевую, а также биотическую стрессоустойчивость).

[0055] Взятые вместе, эти результаты показывают, что фракционирование экстракта RM-2705 может обеспечить по меньшей мере два типа продуктов с различными типами действия и, таким образом, различными вариантами применения, при использовании одного и того же сырья.

[0056] Поскольку SEC невозможно осуществить в промышленном масштабе, было также желательно разработать другой способ, предусматривающий получение фракционированных продуктов из экстрактов морских водорослей, которые могут обеспечивать активность стимулятора роста растений в более широком масштабе.

[0057] Одним из вариантов SEC является ультрафильтрация (ultrafiltration, UF), процесс фракционирования, в котором экстракт морских водорослей фильтруют через ультрафильтрационные мембраны с подходящим уровнем отсека по молекулярной массе (MWCO), которые в одном варианте осуществления могут представлять собой MWCO 1 кДа, чтобы получить фракцию, содержащую биологически активные молекулы в нужном диапазоне, примерно от 0,15 кДа до 1,0 кДа. Таким образом, в одном варианте осуществления экстракт морских водорослей может быть ультрафильтрован с использованием мембраны MWCO 1 кДа.

[0058] В одном варианте осуществления и в самом широком смысле настоящее изобретение обеспечивает способ очистки композиции биостимулятора, полученной из экстракта морских водорослей, включающий стадию ультрафильтрации с использованием полупроницаемой ультрафильтрационной мембраны для отделения представляющих интерес молекул от остальной части смеси, в соответствии с их молекулярной массой, размером и формой.

[0059] Стадия ультрафильтрации может быть проведена с использованием ультрафильтрационного оборудования, в котором раствор экстракта морских водорослей, содержащий примерно от 1 % по массе до 15 % по массе сухого вещества, более

предпочтительно, примерно от 2 % по массе и до 7 % по массе сухого вещества, подвергают ультрафильтрации с использованием мембраны с подходящим уровнем отсека по молекулярной массе (MWCO). В одном варианте осуществления способ ультрафильтрации включает в себя тангенциальную ультрафильтрацию.

[0060] Фильтрат собирают вследствие его биостимулирующих свойств при рециркуляции ретентата (или концентрата), который оставляют для других применений в конце процесса. Хотя обычно это не является обязательным или необходимым, при желании дополнительная очистка ретентата (или концентрата) может быть достигнута путем добавления свежей воды со скоростью, соответствующей той, с которой вода вместе с молекулами, имеющими молекулярную массу, меньшую, чем или равную 1 кДа, удаляется из ультрафильтрата.

[0061] Как показано на фиг. 4, ультрафильтрация может осуществляться с помощью процесса, в котором в резервуар (1) для раствора загружают партию экстракта морских водорослей. Раствор циркулирует через магистраль (2) и насос (3) во впускной коллектор (4) ультрафильтрационного блока (5). Ультрафильтрационный блок (5) содержит один или более картриджей, расположенных параллельно, для обеспечения соответствующей площади ультрафильтрационной мембраны. Затем ультрафильтрат выходит из ультрафильтрационного (5) блока через выпускную магистраль (6) и накапливается в резервуаре (7). Ультрафильтрационный концентрат выходит из ультрафильтрационного (5) блока через выпускной коллектор (8) и возвращается по магистрали (9) в резервуар (1) для раствора.

[0062] Мембрана, содержащаяся в ультрафильтрационном блоке (5), может представлять собой полимерную или керамическую мембрану. В одном варианте осуществления мембрана представляет собой трубчатую керамическую мембрану, содержащую множество каналов. Например, мембрана может содержать примерно от 15 до 50 каналов, более предпочтительно, примерно от 19 до 39 каналов, и может иметь длину примерно от 50 до 150 см. В других вариантах осуществления при осуществлении на практике изобретения также могут быть использованы спиральные мембраны и мембраны с поперечным потоком. Площадь мембраны обычно составляет примерно от 0,20 до 0,6 м<sup>2</sup>, более предпочтительно, примерно от 0,30 до 0,40 м<sup>2</sup>.

[0063] Ретентат несколько раз промывают, чтобы удалить большую часть молекул с молекулярным весом, меньшим, чем уровень отсечения мембраны. Ультрафильтраты содержат молекулы с молекулярной массой, меньшей, чем у уровень отсечения мембраны. В одном случае уровень отсечения составляет 3 кДа, более предпочтительно 2 кДа и наиболее предпочтительно 1 кДа. Молекулы, которые содержатся в ультрафильтратах, имеют низкую молекулярную массу, меньшую, чем MWCО, например, 1 кДа, и их обычно называют метаболитами. Ретентаты содержат молекулы с молекулярной массой, большей, чем уровень отсечения мембран, например, 1 кДа. Молекулы, которые содержатся в ретентате, имеют высокую молекулярную массу (например, ламинарин примерно от 3 до 4 кДа, или фукоиданы с молекулярной массой, большей, чем примерно 30 кДа, и другие биополимеры бурых водорослей с высокой молекулярной массой).

[0064] Было обнаружено, что все виды водорослей подкласса *Fucales* проявляют многообещающую активность, и могут быть подвергнуты воздействию описанных в настоящем документе способов. Эти виды водорослей включают, но не ограничиваются ими, виды семейств *Fucaceae*, *Sargassaceae* и *Durvilleaceae*. Другие виды из подклассов *Fucales* и *Laminariales* включают, но не ограничиваются ими, *Ascoseirales*, *Asterocladales*, *Desmarestiales*, *Dictyotales*, *Dictyotophycidae*, *Discosporangiales*, *Discosporangiophycidae*, *Ectocarpales*, *Fucales*, *Fucophycidae*, *Ishigeales*, *Ishigeophycidae*, *Laminariales*, *Nemodermatales*, *Onslowiales*, *Phaeophyceae* ordo incertae sedis, *Phaeosiphoniellales*, *Ralfsiales*, *Scytothamnales*, *Sphacelariales*, *Sporochnales*, *Stschapoviales*, *Syringodermatales*, *Tilopteridales*, среди прочих.

[0065] Кроме того, хотя настоящее изобретение описано, и показано, что оно демонстрирует положительные результаты для видов водорослей подкласса *Fucales*, способ не ограничивается этими видами водорослей и может также использоваться для выделения и анализа фильтратов любых водорослей или других видов, которые могут действовать как биостимуляторы, для определения биологической активности таких фильтратов.

[0066] Используемый на фигурах в настоящем документе термин «фильтрат» относится к фильтрату и ультрафильтратам, полученным после одной или более ультрафильтраций через ультрафильтрационный блок.

[0067] Используемый на фигурах в настоящем документе термин «ретентат» относится к ретентату без промывки и ретентатам, полученным после одной или более промывок.

Примеры:

[0068] Пример 1:

[0069] Экстракт RM-3496 подвергали ультрафильтрации в лабораторном масштабе с помощью мембраны MWCO 1 кДа, а ретентат трижды промывали водой. Ультрафильтрат, содержащий молекулы с молекулярной массой менее 1 кДа, и ретентат, содержащий молекулы с молекулярной массой более 1 кДа, были испытаны на салатах и пшенице. Таким образом, различные фильтраты и ретентаты применяли на салатах и пшенице. Экстракты GF142 и GS142 (поставляемые Laboratoires Goëmar) были изготовлены с использованием одного и того же процесса из *Fucus vesiculosus* и *Sargassum natans*, соответственно. На фиг. 5 и 6 показаны результаты, которые отображают диаграммы размаха, показывающие массу свежих побегов контрольных растений, растений, обработанных четырьмя различными экстрактами морских водорослей (RM-2705, RM-3496, GF142 и GS142), растений, обработанных молекулами с высокими молекулярными массами, соответственно ретентатам (retentat), названным: RM-3496.ретентат, GF142.ретентат и GS142.ретентат, а растения, обработанные молекулами с низкими молекулярными массами, соответствуют фильтратам (filtrate), названным: RM-3496.фильтрат, GF142.фильтрат и GS142.фильтрат. Эти результаты подтверждают эффективность экстрактов морских водорослей и демонстрируют стимулирующую рост активность в фильтратах, при этом ретентаты оказываются неэффективными в стимулировании роста растений.

[0070] Пример 2:

[0071] Десять литров водного экстракта из *Ascophyllum nodosum* (pH 2.76) помещали в резервуар для раствора экспериментальной установки ультрафильтрации, снабженной трубчатой керамической ультрафильтрационной мембраной длиной 58 см (диаметр: 25 мм, 23 канала, уровень отсечения 1 кДа) (поставлена Tami Industries). Раствор нагнетали через ультрафильтрационную трубку с полной рециркуляцией концентрата обратно в резервуар. Шесть литров фильтрата собирали и идентифицировали как F1. Ретентат (4 л) дважды промывали 5 л воды для получения 2 фильтратов (F2 = 5 л; F3 = 5 л). Различные

фильтраты (F1, F2, F3) были дополнительно оценены по их биостимулирующим свойствам.

[0072] Пример 3:

[0073] Пять литров водного экстракта из *Fucus vesiculosus* (pH 2,42) помещали в резервуар для раствора экспериментальной установки ультрафильтрации, снабженной трубчатой керамической ультрафильтрационной мембраной длиной 58 см (диаметр: 25 мм, 23 канала, уровень отсечения 1 кДа) (поставлена Tami Industries). Раствор нагнетали через ультрафильтрационную трубку с полной рециркуляцией концентрата обратно в резервуар. Фильтрат собирали и идентифицировали как F1. Ретентат (2,5 л) промывали один раз 2,5 л воды для получения 2,5 литров фильтрата (F2 = 2,5 л). Различные фильтраты (F1, F2) были дополнительно оценены по их биостимулирующим свойствам.

[0074] Пример 4:

[0075] Пять литров водного экстракта из *Sargassum natans* (pH 2,92) помещали в резервуар для раствора экспериментальной установки ультрафильтрации, снабженной трубчатой керамической ультрафильтрационной мембраной длиной 58 см (диаметр: 25 мм, 23 канала, уровень отсечения 1 кДа) (поставлена Tami Industries). Раствор нагнетали через ультрафильтрационную трубку с полной рециркуляцией концентрата обратно в резервуар. Фильтрат собирали и идентифицировали как F1. Ретентат (2,5 л) промывали один раз 2,5 л воды для получения 1 литра фильтрата (F2 = 2,5 л). Различные фильтраты (F1, F2) были дополнительно оценены по их биостимулирующим свойствам.

[0076] Пример 5:

[0077] RM-3496, изготовленный Laboratoires Goëmar из экстракта *Ascophyllum nodosum* и двух других экстрактов морских водорослей (GF142 и GS142, изготовленных Laboratoires Goëmar из *Fucus vesiculosus* и *Sargassum natans*, соответственно), подвергали ультрафильтрации и оценивали по их биостимулирующим свойствам.

[0078] Указанные три фукоидных экстракта были ультрафильтрованы через керамическую мембрану (поставленную TAMI Industries), имеющей подходящий MWCO (т. е. 1 кДа). Десять литров RM-3496 были ультрафильтрованы, и пять литров ультрафильтрата были собраны и представляли собой фильтрат 1, используемый в дополнительных экспериментах на салате и пшенице. Ретентат (5 л) дважды промывали 5 литрами воды, в то время как ретентаты GF142 и GS142 (2,5 л) промывали только один



раз 2,5 литрами воды. Измеряли сухую массу фильтратов, ультрафильтратов и ретентатов. В соответствии с процессом фракционирования экстракта RM-3496, общая сухая масса фильтратов (содержащих молекулы с молекулярной массой менее 1 кДа) составляла около 80% экстракта RM-3496, а ретентат составлял около 20% от экстракта RM-3496.

[0079] Подробности экспериментов по росту растений описаны ниже.

[0080] Обработки проводили с использованием различных экстрактов Goëmar (RM-2705, RM-3496, GF142 и GS142), и для всех экспериментов использовали коэффициент разведения 250 (эквивалентный 4 миллилитрам жидкого экстракта на литр питательного раствора). Различные фракции, полученные в результате SEC-фракционирования и фракционирования ультрафильтрацией, наносили на растения в соответствии с их выходами очистки, которые вычисляли по сухой массе. Несколько независимых биологических повторов были выполнены с различными фракциями с  $n$  растений путем обработок.

[0081] Эксперименты по выращиванию салата проводились с семенами салата *Lactuca sativa*, экотипы Fabietto или Janero (поставлены Voltz, Colmar, Франция). Салаты выращивали в ростовой камере на поворотном столе для получения как можно более однородного фенотипа растений при любых условиях обработки. Растения выращивали под йодно-натриевыми лампами высокого давления с фотосинтетически активным излучением  $150 \pm 10$  мкмоль фотонов на  $m^2$  с, с термопериодом 20/18 □ (день/ночь) и длительным дневным световым периодом 16 ч освещения. Чтобы контролировать поступление питательных веществ в растения и облегчить сбор корней, семена салата выращивали в песочных горшках. Растения поливали три раза в неделю поступающим в продажу питательным раствором (поставляемым Puteaux, Les Clayes-sous-Bois, Франция) с концентрациями азота, фосфата и калия в соотношении N/P/K 20:20:20 (1 г/л).

[0082] Листья салата обрабатывали дважды (один раз в неделю в дни 21-й и 28-й) различными экстрактами морских водорослей и добавляли фракции к питательному раствору, а основания горшков погружали в питательный раствор до наблюдения полного поглощения.

[0083] Растения собирали через 16 дней после первой обработки, и побеги и корни собирали отдельно. Были выполнены три независимых биологических повтора с различными экстрактами и фракциями морских водорослей. Двенадцать салатов ( $n = 12$ )

использовали при обработке для экспериментов SEC-фракционирования, в то время как восемнадцать салатов ( $n = 18$ ) использовали при обработке для экспериментов ультрафильтрации.

[0084] Семена *Arabidopsis thaliana* экотипа Columbia (Col-0, полученные из центра семеноводства ABRC) выращивали в культурах in-vitro. Семена сначала подвергали поверхностной стерилизации и высевали в квадратные чашки Петри, содержащие базальную среду Half-Murashige и Skoog (MS), дополненную 1 % (вес/объем) сахарозы (30 мМ) и 0,6 % (вес/объем) Phytagel™. Чашки Петри выращивали при холодном флуоресцентном освещении с интенсивностью  $225 \pm 10$  мкмоль фотонов на  $m^2$  с, с длинным световым периодом 16 ч при  $21 \pm 0,5$  °C. Расположение чашек Петри под неоновыми лампами менялось каждый день, во все время эксперимента, чтобы рандомизировать эксперимент.

[0085] Проростки с равномерным ростом отбирали и переносили через 6 дней после прорастания в среду для обработки. Для каждого состояния готовили 6 чашек Петри, содержащих по 6 проростков в каждой.

[0086] Растения собирали через 9 дней после переноса в среду обработки. Было выполнено четыре независимых биопробы, и шесть повторов ( $n = 6$ ) были использованы при обработке для экспериментов по SEC-фракционированию.

[0087] Эксперименты по выращиванию пшеницы проводились с семенами озимой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) сорта Altigo (поставляется Limagrain, Saint-Beauzire, Франция). Пшеницу выращивали в ростовой камере на поворотном столе для получения как можно более однородного фенотипа растения. Чтобы контролировать поступление питательных веществ в растения, семена пшеницы выращивали в горшках с вермикулитом. Растения выращивали в ростовой камере под йодно-натриевыми лампами высокого давления с фотосинтетически активным излучением  $150 \pm 10$  мкмоль фотонов на  $m^2$  с, с термопериодом 22/18 °C с длительным дневным фотопериодом 16 ч. Через десять дней после посева однородные растения распределяли по разным лоткам; 6 растений на лоток и два лотка на одно состояние. Растения поливали три раза в неделю тем же поступающим в продажу питательным раствором, который использовали для экспериментов с салатом.

[0088] Через две недели после посева пшеницу обрабатывали в пять приемов (каждые 2 или 3 дня) различными фракциями и экстрактами и собирали через 13 дней после первой обработки. Эффективность различных фракций оценивали путем сравнения массы свежих побегов. Были выполнены три независимых биологических повтора с различными экстрактами и фракциями морских водорослей. Двенадцать пшениц ( $n = 12$ ) использовали для обработки в экспериментах по ультрафильтрации.

[0089] В настоящем изобретении эффективность различных фракций и экстрактов при стимуляции роста растений оценивали посредством статистического подхода. Действительно, для каждой показанной биопробы соответствие нормальному закону (распределения) данных сначала проверялось с помощью критериев нормальности Шапиро-Вилка, с помощью графиков Q-Q и гистограмм плотности. Постоянство условий дисперсии этих данных также проверялось с помощью критерия Барлетта, перед проведением параметрических испытаний этих данных. Было проведено несколько биопроб (от трех до четырех независимых повторов во времени) для оценки различных обработок стимуляции роста растений с количеством  $N$  растений в обработке. Затем был проведен параметрический двухфакторный дисперсионный анализ (двухфакторный Анова) для определения существенной разницы (с ошибкой первого рода 5 %) между средними значениями различных обработок для каждой биопробы и между средствами каждой обработки для различных биопроб. Согласно результатам анализа Анова, для данных были выполнены параметрический ретроспективный анализ с HSD-критерием Тьюки или многократное парное сравнение, для ранжирования и определения того, какие средства значительно отличались друг от друга. Результаты теста Тьюки показаны на диаграммах размаха с выделением жирными буквами. Средства обработки, которые значительно отличаются друг от друга, отображают разные выделенные жирным буквы. Эти средства обозначены на каждом элементе диаграммы размаха точкой.

[0090] Соединения, описанные в настоящем документе, могут быть использованы на различных культурах, включая, например, соевые бобы, кукурузу, злаки (то есть пшеницу, ячмень, рожь и овес), рапс, канолу, подсолнечник, сахарную свеклу, картофель, сухие бобовые (т. е., чечевица, сухие бобы и т. д.), сахарный тростник, плодовые овощи, в том числе помидоры, баклажаны, перец, тыква и т. д., луковичные овощи, в том числе лук и лук-порей, кочанные и листовые овощи, в том числе салат, шпинат и сельдерей, кочанная

капуста, косточковые плоды, семечковые плоды, цитрусовые, кофе, какао, ореховые деревья, ягоды, виноград (столовый и винный), среди прочего.

[0091] Наконец, также следует понимать, что приведенная ниже формула изобретения предназначена для охвата всех родовых и отличительных признаков изобретения, описанных в настоящем документе, и всех положений в объеме изобретения, которые, в зависимости от языка, могут находиться среди них.

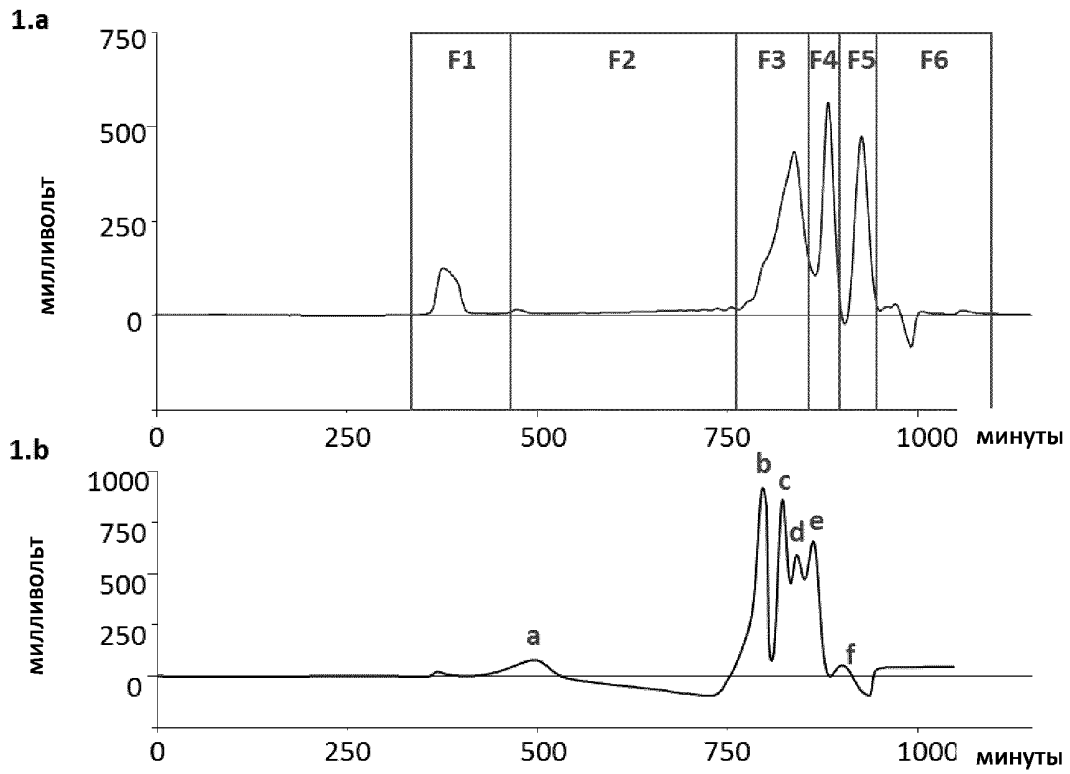
**ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ**

1. Одна или более биологически активных молекул, выделенных из видов водорослей, причем одна или более биологически активных молекул имеют молекулярную массу в диапазоне примерно от 0,15 кДа до 1,0 кДа.
2. Одна или более биологически активных молекул по любому из предшествующих пунктов формулы, отличающаяся тем, что одна или более биологически активных молекул обладает возможностью улучшения роста растений.
3. Одна или более биологически активных молекул по любому из предшествующих пунктов формулы, отличающаяся тем, что виды водорослей представляют собой виды бурых водорослей.
4. Одна или более биологически активных молекул по любому из предшествующих пунктов формулы, отличающаяся тем, что бурые водоросли включают виды водорослей, выбранные из группы, включающей виды *Ascophyllum nodosum*, *Fucus vesiculosus*, *Sargassum* и комбинации одного или более из вышеуказанных.
5. Одна или более биологически активных молекул по любому из предшествующих пунктов формулы, отличающаяся тем, что одна или более биологически активных молекул не содержат сульфатированный полисахарид или ламинарин.
6. Способ улучшения роста растений, включающий стадию нанесения композиции, содержащей выделенную одну или более биологически активных молекул по любому из пп. 1-5 по меньшей мере на одно из: почву, растения или семена.
7. Способ по п. 6, отличающийся тем, что улучшение роста растений включает по меньшей мере одно из следующего: содействие прорастанию семян, стимулирование развития корней, продление вегетационного периода, увеличение периода продуктивности или увеличение периода сбора урожая.
8. Способ выделения и очистки биологически активных соединений в экстракте, полученном из морских водорослей, включающий стадии:

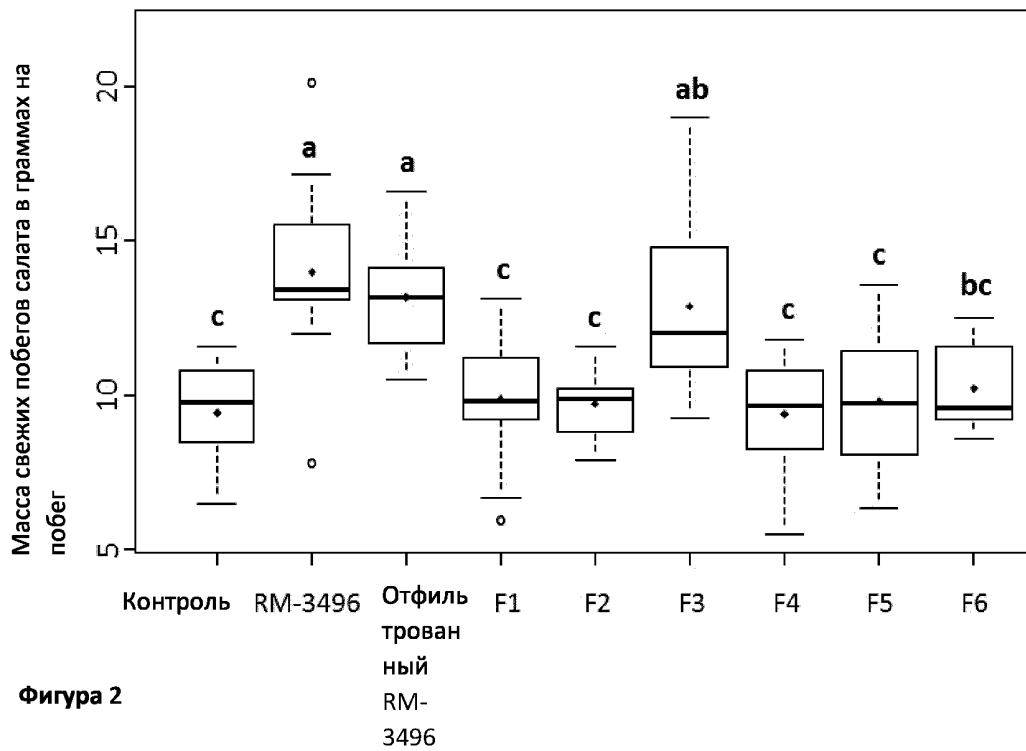
- a) циркуляция экстракта через ультрафильтрационную мембрану с подходящим уровнем отсечения по молекулярной массе;
  - b) сбор фильтрата из экстракта для получения первой фракции фильтрата и ретентата, и
  - c) промывка ретентата для получения одной или более дополнительных фракций фильтрата.
9. Способ по п. 8, отличающийся тем, что дополнительно включает стадию оценки биологической активности первой фракции фильтрата и дополнительных фракций фильтрата для определения их эффективности в отношении роста растений.
10. Способ по п. 9, отличающийся тем, что эффективность роста растений включает в себя по меньшей мере одно из следующего: содействие прорастанию семян, стимулирование развития корней, продление вегетационного периода, увеличение периода продуктивности или увеличение периода сбора урожая.
11. Способ по любому из пп. 8-10, отличающийся тем, что экстракт получают из видов бурых водорослей.
12. Способ по любому из пп. 8-11, отличающийся тем, что экстракт получают из водорослей видов *Ascophyllum nodosum*, *Fucus vesiculosus*, или *Sargassum*.
13. Способ по любому из пп. 8-12, отличающийся тем, что ретентат содержит активные молекулы, выбранные из группы, состоящей из сульфатированных полисахаридов и ламинарина, и  
при этом активные молекулы обладают возможностью облегчения абиотического стресса у сельскохозяйственных культур.
14. Способ по любому из пп. 8-13, отличающийся тем, что первый фильтрат содержит биологически активные молекулы, имеющие молекулярную массу в диапазоне примерно от 0,15 кДа до 1,0 кДа.
15. Способ по любому из пп. 8-14, отличающийся тем, что ультрафильтрационная мембрана имеет уровень отсечения по молекулярной массе менее 3 кДа.

16. Способ по любому из пп. 8-15, отличающийся тем, что ультрафильтрационная мембрана имеет уровень отсечения по молекулярной массе менее 2 кДа.

17. Способ по любому из пп. 8-16, отличающийся тем, что ультрафильтрационная мембрана имеет уровень отсечения по молекулярной массе менее 1 кДа.

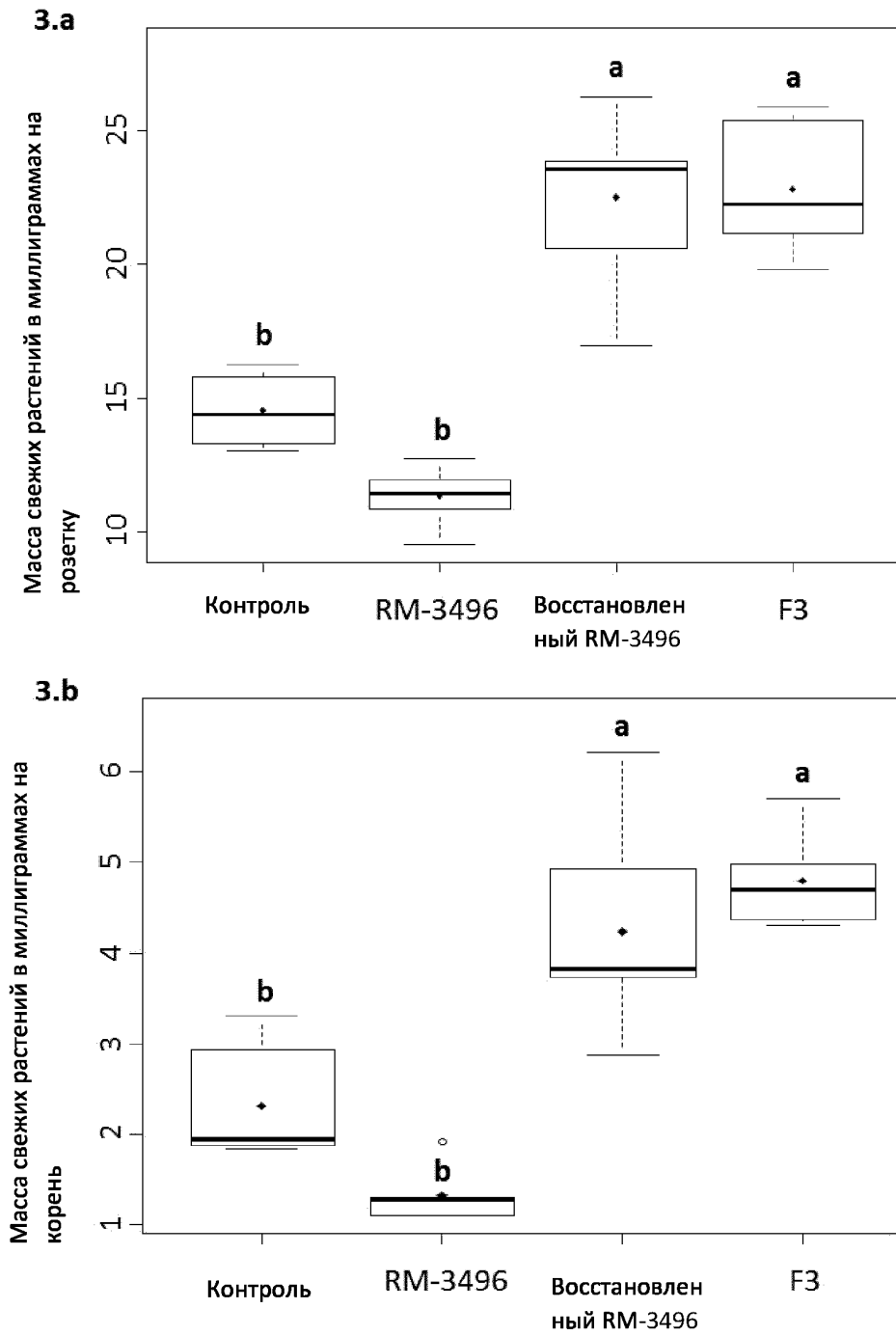


Фигура 1

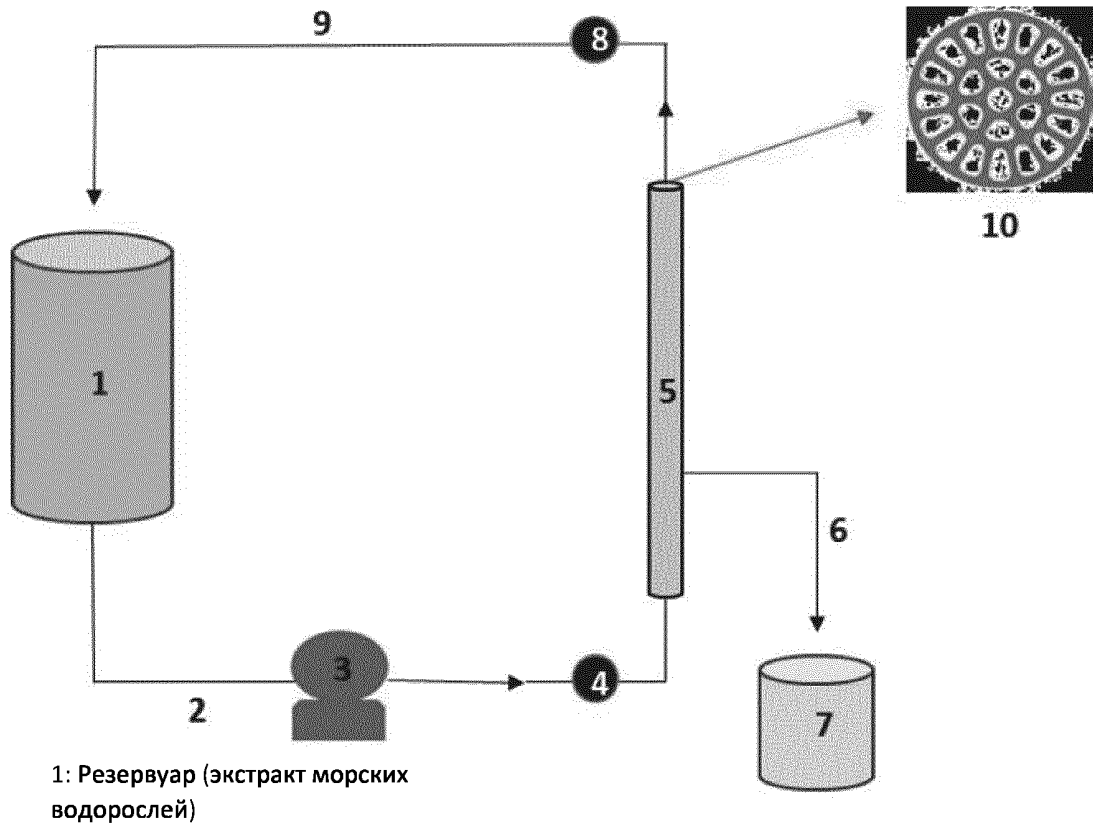


Фигура 2

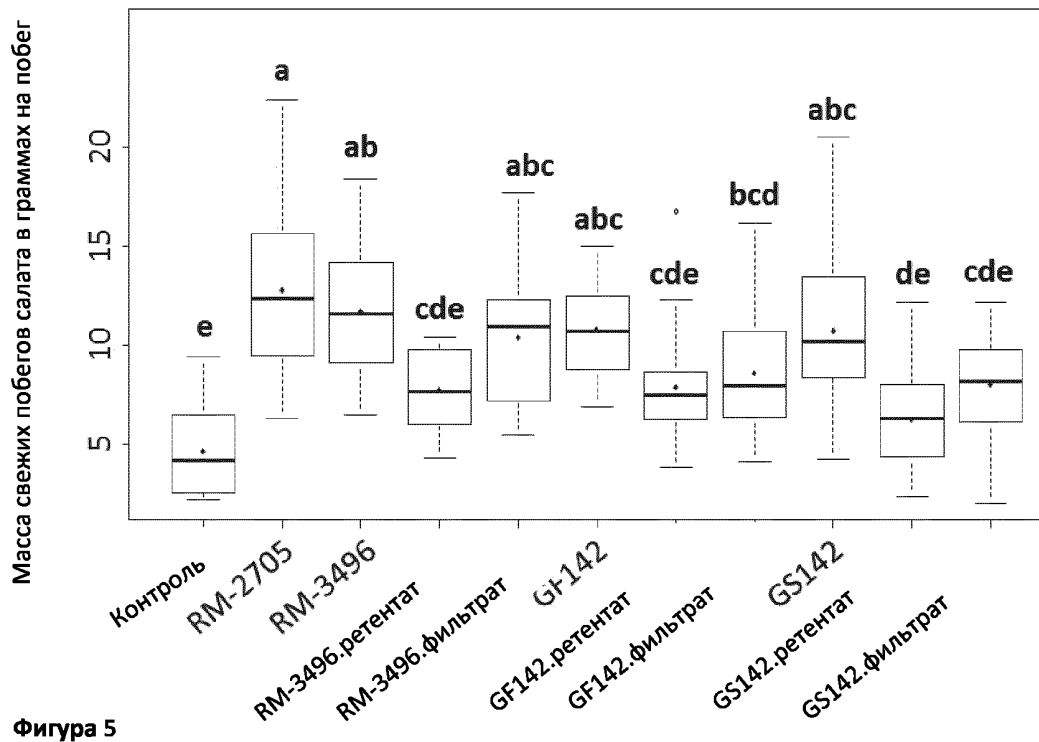




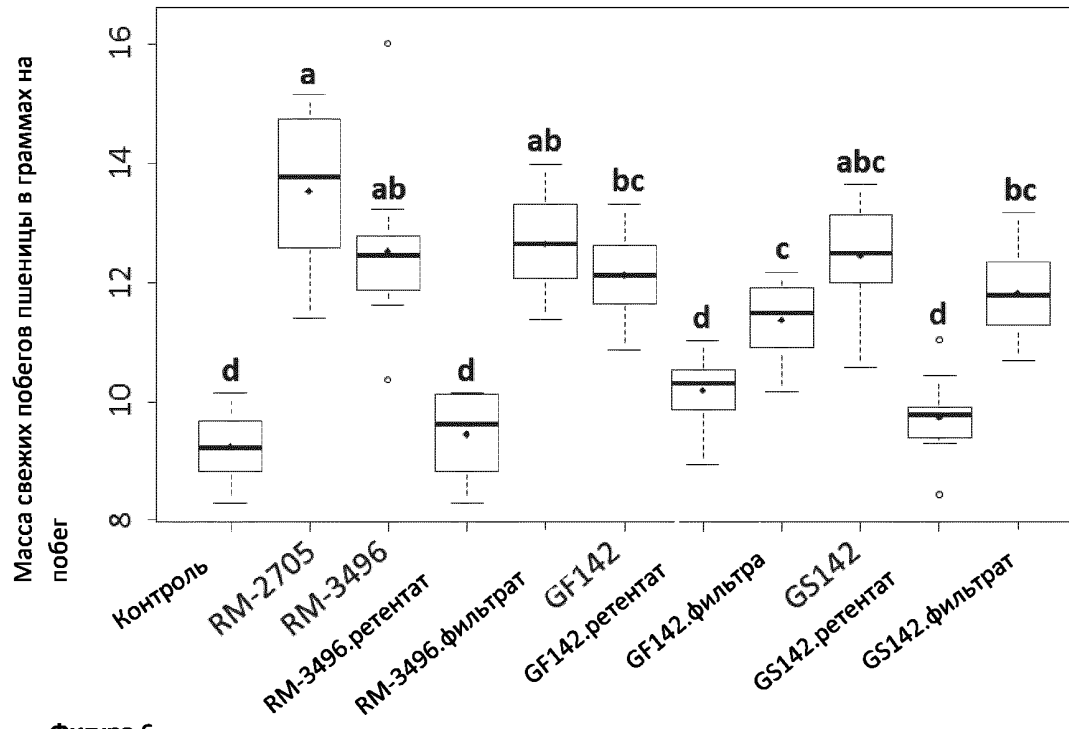
Фигура 3



Фигура 4



Фигура 5



Фигура 6