

Занятие семинарского типа № 12

ТЕМА ЗАНЯТИЯ: Получение аминокислот биотехнологическими методами. Микробиологическая трансформация стероидных соединений

УЧЕБНЫЙ МАТЕРИАЛ

1. Общая характеристика аминокислот и основных способов их получения

По данным ВОЗ, потребность человечества всего лишь в 4 незаменимых аминокислотах составляет, млн. т.: для лизина – 5, метионина – 4, треонина – 3,7 и триптофана – 2.

Аминокислоты – структурные единицы белков. Природные аминокислоты вовлечены в биосинтез ферментов, ряда гормонов, витаминов, антибиотиков, алкалоидов, токсинов и других азотсодержащих соединений (пурины, пиримидины, гемм и др.). В организме животного практически половина белковых аминокислот не синтезируется. Они называются незаменимыми аминокислотами и должны поступать в организм с пищей. Недостаток незаменимых аминокислот в пищевом или кормовом рационе приводит к нарушению обмена веществ, замедлению роста и развития. Данные о ежедневной потребности человека в незаменимых аминокислотах представлены в табл. 1.

Таблица 1

Потребность человека в незаменимых аминокислотах

Аминокислоты	Потребность, мг/кг массы тела в сутки	
	младенцы	взрослые
Валин	92	14
Гистидин	33	10
Изолейцин	83	12
Лейцин	135	16
Лизин	99	12
Метионин (и цистеин)	49	10
Фенилаланин (и тирозин)	141	16
Треонин	68	8
Триптофан	21	3

Пищевая ценность белка определяется сравнением доли незаменимых аминокислот в пище с этим же показателем при адекватном питании. Чем ближе обе величины, тем выше качество белка. Белки яйца и молока обладают высокой пищевой ценностью и используются в качестве эталона при оценке других белков. Многие белки растительного происхождения характеризуются дефицитом некоторых незаменимых аминокислот. Так, белки пшеницы и риса обеднены лизином и треонином, а белки кукурузы – лизином и триптофаном.

Введение синтетических незаменимых аминокислот в кормовые концентраты позволяет балансировать корма сельскохозяйственных животных по уровню белка. При добавлении 2–4 дефицитных аминокислот к 1 т комбикорма общий расход кормов уменьшается на 15–20 %, выход продукции увеличивается на 20 %. Добавление к кормам аминокислот способствует переводу животноводства на промышленную основу.

Аминокислоты, кроме применения в качестве пищевых добавок, приправ и усилителей вкуса, используют как сырье в химической, парфюмерной и фармацевтической промышленности и при производстве других ценных веществ: глицин

– подсластитель, антиоксидант, бактериостатик; аспарагиновая кислота – усилитель вкуса, сырье для синтеза аспартама; глутаминовая кислота – усилитель вкуса, препарат для лечения психических заболеваний; гистидин – противовоспалительное средство; метионин – пищевая и кормовая добавки; цистеин – фармацевтический препарат; треонин и триптофан – пищевые и кормовые добавки; фенилаланин – сырье для получения аспартама; лизин – пищевая и кормовая добавки, сырье для получения искусственных волокон и пленок.

Перечень лекарственных препаратов на основе аминокислот и их комплексов постоянно растет и расширяется. Очень хорошую перспективу для успешного развития имеют препараты для парентерального питания, содержащие комплексы аминокислот. Их назначают в том случае, когда питание «естественным» образом противопоказано, т.к. стимулирует секрецию пищеварительных желез. Так, при остром панкреатите человек не должен ни пить, ни есть, поскольку любая стимуляция секреции может привести к самоперевариванию поджелудочной железы.

Современная тенденция – использование препаратов, содержащих весь комплекс аминокислот (или, по меньшей мере, 18 из них), т.е. в оптимальном для человеческого организма соотношении. В основном это импортные препараты: аминоклазаль, кетостерил, валин (Германия); аминостерил КЕ (Финляндия); аминосола (Югославия). Некоторые из этих препаратов помимо аминокислот содержат также глюкозу и витамины. Соотношение аминокислот в них оптимальное. В организме человека в зависимости от возраста синтезируются белки соответствующего состава, например, аминокислотный состав этих препаратов для детей приближается к составу грудного молока матери, для взрослых он несколько иной.

Способы получения аминокислот

1. При гидролизе белоксодержащее сырье (отходы пищевой и молочной промышленности) нагревают с растворами кислот или щелочей при температуре 100–105 °С в течение 20–48 ч. Чаще всего используют 20 % раствор соляной кислоты, обеспечивающий глубокий гидролиз белка. Кроме того, для ускорения реакции гидролиза белков используют иммобилизованные протеолитические ферменты и ионообменные смолы. В ходе кислотного гидролиза белков происходят рацемизация и разрушение некоторых составляющих их аминокислот. При кислотном гидролизе полностью разрушается триптофан и достаточно значительны потери цистеина, метионина и тирозина (10–30 %). Лучшим способом уменьшения потерь аминокислот при гидролизе является проведение его в вакууме или в атмосфере инертного газа, а также соблюдение высокого соотношения количества кислоты, взятой для гидролиза, и массы белка (200:1). Рациональное использование сырья при гидролизе, характерное для многих других биотехнологических производств, обеспечивает создание безотходных технологий и способствует оздоровлению окружающей среды. Ранее методом гидролиза получали аминокислоты исключительно для фармацевтических и научных целей. В последнее время сфера использования белковых гидролизатов существенно расширилась. Их применяют в медицине, животноводстве, пищевой и микробиологической промышленности.

2. Существенный недостаток методов химического синтеза аминокислот состоит в получении целевых препаратов в виде рацемической смеси D- и L-стереоизмерных форм. Подавляющее большинство природных аминокислот относится к L-ряду. D-α-аминокислоты обнаружены лишь в составе гликопротеинов клеточных стенок бактерий, антибиотиков и некоторых токсинов. Проницаемость L-аминокислот в клетке в 500 раз превышает таковую ее антипода. Стереоспецифичны также транспорт и метаболизм аминокислот. Исключением в этом отношении является лишь метионин, метаболизм которого нестереоизбирателен, благодаря чему данная аминокислота получается

преимущественно путем химического синтеза. Разделение рацематов других аминокислот – дорогая и очень трудоемкая процедура.

3. Наиболее перспективен и экономически выгоден микробиологический синтез аминокислот. Более 60 % всех производимых в настоящее время промышленностью высокоочищенных препаратов белковых аминокислот получают именно этим способом, главное преимущество которого в сравнении с методами химического синтеза состоит в возможности получения L-аминокислот на основе возобновляемого сырья.

На всех этапах технологического процесса за время, прошедшее с момента первой практической реализации данного метода получения в СССР (конец 60-х гг.), был достигнут значительный прогресс:

- ✓ исследован широкий спектр сырьевых источников (меласса тростниковая и свеклосахарная, сахар-сырец, глюкозный сироп, фуражное зерно);
- ✓ расширена номенклатура производимых аминокислот (лизин, триптофан, глутаминовая кислота, лейцин, изолейцин, валин, фенилаланин);
- ✓ освоены полупериодический, объемно-доливной и непрерывный процессы биосинтеза аминокислот;
- ✓ разработаны математические модели и алгоритмы оптимального управления биосинтезом аминокислот;
- ✓ освоено использование мембранных методов при выделении аминокислот;
- ✓ предложено применение энергосберегающих методов при получении готовых препаратов;
- ✓ достигнута экологическая безопасность производства аминокислот;
- ✓ подготовлены исходные данные на разработку АСУ ТП производства кристаллических аминокислот и их кормовых концентратов.

Показатели, достигнутые к настоящему моменту в лабораторных условиях, обеспечивают при наличии инвестиций создание конкурентоспособных производств перечисленных выше аминокислот. Унификация биотехнологии аминокислот позволяет производить их на типовой модульной технологической линии.

В последние годы при производстве аминокислот все шире используют биотрансформацию предшественников аминокислот, особенно с помощью иммобилизованных ферментов или клеток микроорганизмов, предварительно получаемых химическим путем.

Промышленное производство аминокислот стало возможным после открытия способности у некоторых микроорганизмов выделять в культуральную среду значительные количества какой-либо одной аминокислоты (С. Киносита, 1955). При этом было установлено, что большинство из нескольких тысяч проанализированных диких штаммов микроорганизмов продуцировали аминокислоты во внешнюю среду, но в очень незначительных количествах. Не зафиксировано связи между таксономическим положением микроорганизма и способностью к продуцированию той или иной аминокислоты. Так, среди возможных продуцентов глутаминовой кислоты отмечены организмы, из которых 30 % – дрожжи, 30 % – стрептомицеты, 20 % – бактерии и 10 % – микроскопические грибы. И только один из обследованных штаммов микроорганизмов – *Corynebacterium glutamicum* был способен к сверхсинтезу глутамата. Этот штамм использовали при организации первого в мире крупномасштабного производства глутаминовой кислоты микробиологическим методом в Токио (1956). В России исследования в области промышленного синтеза аминокислот были начаты в 50-х гг. прошлого столетия по инициативе акад. А.А. Александрова.

Чаще всего для микробиологического синтеза аминокислот используют ауксотрофные мутантные штаммы, которые получают обычными методами селекции или генетической инженерии. С помощью мутагенных факторов у таких ауксотрофных штаммов индуцируется мутация, в результате которой прекращается или ингибируется

синтез одного из продуктов, оказывающих регуляторное воздействие на ферментные системы, катализирующие образование данной аминокислоты, в результате чего концентрация этой аминокислоты в клетках мутанта и в культуральной жидкости повышается. Распространенные объекты селекции продуцентов – микроорганизмы, относящиеся к родам *Brevibacterium*, *Micrococcus*, *Corynebacterium*, *Arthrobacter* и др.

В настоящее время применяют одно- и двухступенчатые схемы микробиологического синтеза аминокислот.

При одноступенчатом синтезе в промышленных ферментерах выращивают ауксотрофные мутанты, являющиеся сверхпродуцентами тех или иных аминокислот. После завершения рабочего цикла культуральную жидкость отделяют от биомассы, концентрируют и придают целевому продукту необходимую товарную форму.

При двухступенчатом синтезе аминокислоты вначале получают ее предшественник (часто путем химического синтеза), а затем с помощью ферментов, вырабатываемых микроорганизмами, превращают полученный предшественник в аминокислоту. При этом в качестве источника фермента могут быть использованы суспензия клеток микроорганизмов или ферментный раствор, полученный после разрушения клеток. В случае применения данной схемы получения, как правило, образуется только L-форма аминокислоты.

2. Продуценты аминокислот

В качестве продуцентов аминокислот, как правило, используют генетически измененные штаммы, обладающие способностью к сверхсинтезу. Лучшими продуцентами аминокислот являются ауксотрофные мутанты (микроорганизмы, лишенные целого ряда ферментных систем, поэтому очень требовательные к составу питательной среды, в которой обязательно должно присутствовать большое количество факторов роста). В качестве продуцентов аминокислот используют грамположительные бесспорные бактерии (*Corynebacterium*, *Brevibacterium*, *Micrococcus* и др.).

Биосинтез аминокислот осуществляется внутри бактериальной клетки, которые затем выделяются в культуральную жидкость. Наибольшее накопление аминокислот происходит в середине экспоненциальной фазы роста.

Секретом большинства технологических процессов с участием микроорганизмов является изменение условий среды. За счет этого и достигается синтез избыточных количеств целевого продукта. Необходимого дисбаланса метаболизма добиваются путем эмпирического изменения следующих факторов: концентрации субстрата, значения pH, концентрации продукта или путем установления критических уровней содержания некоторых веществ (ионов металлов, органических добавок и др.) в питательной среде.

При переводе биологических процессов получения аминокислот на коммерческую основу были выработаны новые способы необходимых изменений метаболизма у продуцентов, направленные на увеличение выхода промежуточных продуктов, образование которых в иных условиях находится под строгим метаболическим контролем.

При производстве аминокислот бактерии стали использовать с начала 50-х гг. XX в., при этом штаммы бактерий постоянно улучшали методами генетической инженерии, выделяя ауксотрофные мутанты и мутанты с измененными регуляторными свойствами. Для обеспечения образования аминокислот в больших количествах, в любом случае необходимо изменить систему регуляции обмена веществ. Для этого можно или стимулировать потребление субстрата на некоторых путях биосинтеза и выделение аминокислот в среду, или подавить побочные реакции и процессы деградации аминокислот.

Производство таких аминокислот, как L-глутамат, L-валин и др., при участии диких штаммов бактерий основано на использовании особенностей метаболизма присущих этим бактериям или на стимуляции образования аминокислот в ответ на изменение условий внешней среды.

Образовывать аминокислоты способны бактерии многих родов, причем они настолько продуктивны, что промышленное производство аминокислот становится рентабельным. Так, виды *Corynebacterium* или *Brevibacterium*, выращиваемые на углеродном сырье, этиловом спирте или ацетате при наличии достаточного количества биотина в питательной среде способны синтезировать до 30 г/л глутамата. Важным условием для накопления этой аминокислоты является полное или частичное подавление активности α -кетоглутаратдегидрогеназы. При этом образование целевого продукта увеличивается при добавлении β -лактамовых антибиотиков, ПАВ и жирных кислот. В результате изменения условий ферментация, в ходе которой образуется L-глутамат, может быть переключена на синтез L-глутамина или L-пролина. При высокой концентрации биотина и ионов аммония создаются благоприятные условия для образования L-пролина, а при высоких концентрациях ионов аммония и цинка в слабо кислой среде усиливается синтез L-глутамина.

Ауксотрофные мутанты не могут образовывать ингибиторы метаболического пути, работающие по принципу отрицательной обратной связи, т.к. у них отсутствует определенная ключевая ферментативная реакция, поэтому при выращивании мутантного штамма в среде с минимальной концентрацией необходимого питательного ингредиента они способны образовывать избыточные количества вещества-предшественника.

Ауксотрофные мутанты находят применение и в тех случаях, когда необходимо синтезировать соединения являющиеся конечными продуктами разветвленных цепей метаболических реакций. Так, L-аспартат является общим предшественником для L-лизина, L-треонина, L-метионина и L-изолейцина. Первая реакция в процессе образования этих аминокислот катализируется аспартокиназой, активность, которой может быть ингибирована по механизму отрицательной обратной связи при совместном действии L-лизина и L-треонина. У мутантов ауксотрофных по гомосерину или треонину (метионину) существенно уменьшается внутриклеточная концентрация L-треонина, что снимает блокаду с аспартокиназы и позволяет клеткам накапливать L-лизин.

Ауксотрофные мутанты способны накапливать и конечные продукты неразветвленных путей биосинтеза. В таких случаях приходится отбирать мутанты с частично нарушенной регуляцией биосинтеза, что обеспечивает высокий выход конечного продукта. Такие мутанты называются регуляторными, их отбирают по устойчивости к аналогам аминокислот или среди ревертантов ауксотрофов. В основе использования аналогов аминокислот лежит сходство с природными аминокислотами. Они ингибируют рост бактерий. Однако данный эффект может быть уменьшен за счет добавления соответствующей аминокислоты. Таким образом, аналоги выступают в роли искусственных, работающих по принципу отрицательной обратной связи, ингибиторов ферментов, обеспечивающих биосинтез природных аминокислот и одновременно подавляющих процесс их включения в белки. Появление мутантов, устойчивых к этим мощным ингибиторам, означает, что регуляторные ферменты соответствующего пути обмена становятся у них нечувствительными к аналогу. Для увеличения выхода можно воспользоваться как ауксотрофией, так и дефектами регуляции одновременно. Так, у *Corynebacterium glutamicum* и *Brevibacterium flavum* сверхпродукции L-треонина не наблюдается, т.к. не происходит сочетанного ингибирования аспартокиназы L-треонином и L-лизином по механизму отрицательной обратной связи, а L-треонин ингибирует гомосеридегидрогеназу. Мутант, устойчивый к аналогу треонина, синтезирует в избыточном количестве треонин, т.к. его ферменты, ингибированные этой аминокислотой, десенсибилизированы. Гомосеридегидрогеназа и киназа, принимающие участие в синтезе треонина также «выключаются» L-метиокином, поэтому ауксотрофы по метионину образуют L-треонин с еще большим выходом.

Регуляторные мутанты можно получить путем трансдукции. Таким путем у одного штамма последовательно может быть закреплена устойчивость к нескольким аналогам.

3. Частные биотехнологии аминокислот

Биотехнология глутаминовой кислоты

L-глутаминовая кислота (α -аминоглутаровая кислота, $\text{HOOC-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}_2\text{CH-COOH}$) – первая аминокислота, полученная на основе промышленного микробиологического синтеза. Глутаминовая кислота является важнейшей аминокислотой растительных и животных белков, не будучи незаменимой. Синтез глутаминовой кислоты происходит в цикле трикарбоновых кислот (рис. 1) в результате ферментативного восстановительного аминирования 2-кетоглутаровой кислоты НАДФ-зависимой глутаматдегидрогеназой:



2-кетоглутаровая кислота образуется из изолимонной кислоты под воздействием изоцитратдегидрогеназы. Необходимый для синтеза глутаминовой кислоты НАД(Ф)Н постоянно регенерируется в процессе окисления изолимонной кислоты в 2-кетоглутаровую кислоту.



Рис. 1. Схема синтеза глутаминовой кислоты *C. glutamaticum*

Возможность получения глутаминовой кислоты из углеводов на основе микроорганизмов впервые была продемонстрирована в 1957 г. японскими исследователями Киносита, Асаи и др. Продуцировать глутаминовую кислоту способны дрожжи, микроскопические грибы и бактерии. Бактерии обеспечивают наибольший выход по отношению к использованному углеродному субстрату (не менее 40–50 %).

Промышленное значение имеют бактериальные культуры: *Micrococcus*, *Brevibacterium* и *Corynebacterium*. Сверхсинтез кислоты у диких штаммов возможен в специальных физиологических условиях при торможении скорости роста и увеличении клеточной мембраны для глутаминовой кислоты. Такие условия обеспечивает определенная концентрация биотина в среде (1–5 мкг/л), а также присутствие некоторых антибиотиков. Внутриклеточная концентрация глутаминовой кислоты снижается в результате экскреции продукта в околоклеточную среду, поэтому регуляция синтеза конечным продуктом ослабевает. Сверхпродукция глутаминовой кислоты связана также с высокой концентрацией аммония в среде, высокой активностью НАД(Ф)Н-зависимой глутаматдегидрогеназы и отсутствием или дефектом α -кетоглутаратдегидрогеназы, катализирующей превращение 2-кетоглутарата в янтарную кислоту.

Глутаминовая кислота в основном используется в фармацевтической и пищевой промышленности, поэтому задача постферментационной стадии заключается в получении высокоочищенных препаратов. Для этого на первом этапе обработки культуральной жидкости в нее добавляют негашеную известь или известковое молоко. После этого избыток ионов осаждают кислотой, осадок удаляют центрифугированием. Фильтрат после осветления активированным углем и сорбции на ионообменных смолах концентрируют вакуум-выпариванием при температуре 40–60 °С. Осаждение кристаллов глутаминовой кислоты проводят в изоэлектрической точке (рН 3,2 при температуре 4–15 °С). В результате перекристаллизации чистота продукта достигает 99,6%. Кристаллы кислоты отделяют от маточного раствора центрифугированием, промывают и высушивают. Если необходимо получить глутамат натрия, кристаллы глутаминовой кислоты обрабатывают нитрием гидроксидом. Для этого влажные кристаллы растворяют в воде, нейтрализуют 50 % раствором едкого натра. Полученный раствор фильтруют, упаривают под вакуумом до содержания сухих веществ 60 % и направляют на перекристаллизацию. Полученные кристаллы глутамата натрия выделяют из маточного раствора центрифугированием и высушивают током горячего воздуха.

Глутамат натрия усиливает вкус многих пищевых продуктов, способствует длительному сохранению вкусовых качеств консервированных продуктов (овощей, рыбы, мясных продуктов). За рубежом глутамат натрия добавляют во все продукты не только при консервировании, но и при замораживании и просто хранении. В Японии, США и других странах глутамат натрия является обязательной принадлежностью стола аналогично соли, перцу, горчице. Глутаминовая кислота не только повышает вкусовую ценность пищи, но также стимулирует пищеварение. Важное свойство глутаминовой кислоты – служить защитным фактором при отравлениях внутренних органов (печени, почек), ослаблять действие токсинов и усиливать эффективность действия ряда фармакологических препаратов. В настоящее время производство глутаминовой кислоты является крупнотоннабиотехнологическим жным производством (около 400000 т/год), объемы ее производства возрастают с каждым годом. Ведущими странами-производителями глутаминовой кислоты и глутамата натрия являются Япония и США.

3.2. Биотехнология лизина

Лизин – алифатическая незаменимая аминокислота ($C_6H_{14}N_2O_2$) с выраженными свойствами основания, представляющая собой бесцветные кристаллы или белый порошок ($T_{пл}$ 224 °С). Данная аминокислота относится к числу соединений, которые живые организмы не производят самостоятельно, и поэтому должны получать в готовом виде для синтеза собственных структурных и функциональных белков. Источником лизина являются микроорганизмы и растения. При недостатке лизина наблюдается замедление роста и развития живых организмов.

Наиболее экономичным способом получения лизина является его микробиологический синтез. Впервые производство данной аминокислоты было налажено в Японии в середине 50-х гг. XX в., после в Голландии и США. Хотя следует отметить,

что США меньше других нуждается в синтетической аминокислоте, т.к. в данной стране выращивают большое количество сои, богатой лизином. Кстати, именно для того, чтобы освободиться от засилья американской сои, страны ЕЭС организовали крупную биотехнологическую фирму «Евролизин». В нашей стране становление лизинового производства относится к 70-м гг. XX в.

Лизин можно получать и химическим путем (из капролактама). Однако данный процесс является сложным, многостадийным и дорогостоящим. В тоже время, он недостаточно эффективен, т.к. половину готового продукта составляет D-изомер лизина, который не усваивается организмами, а процедура разделения D- и L-изомеров лизина очень трудоемкая и дорогостоящая.

Среди микроорганизмов лизин синтезируют бактерии, актиномицеты, сине-зеленые водоросли и т.п. Однако нормально растущая клетка «вырабатывает» очень небольшое количество лизина, достаточное только для собственных ее нужд. В начале 50-х гг. XX в. японские исследователи С. Киносита, К. Накаяма и С. Китада получили мутантные штаммы бактерий, вырабатывающие немного больше данной аминокислоты, чем нужно им самим. Поначалу максимальная концентрация лизина достигла 20 г в 1 л культуральной жидкости. В настоящее время во многих лабораториях мира научились получать высокопродуктивные штаммы, способные вырабатывать до 60 г/л и более аминокислоты. С этой целью исходные штаммы микроорганизмов подвергают облучению ультрафиолетовым светом, быстрыми нейтронами или обработке химическими мутагенами (этиленмин и др.), а затем из возникших под действием данных агентов мутантных штаммов селекционеры отбирают наиболее «работоспособные».

В нашей стране первые сверхпродуценты лизина получили в Институте биохимии им. А.Н. Баха АН СССР, но от лабораторных опытов до промышленного производства аминокислоты путь был не близким.

В СССР проблемой промышленного получения лизина занимались две группы ученых. Одна возникла в недрах Института атомной энергии им. И.В. Курчатова в лаборатории, изучавшей биологическое действие разных доз облучения, в которой работали биологи, биохимики, микробиологи и генетики. В числе других исследований в ней также осуществлялся поиск микроорганизмов-продуцентов аминокислот, в том числе и лизина. Руководил работой данной лаборатории С.И. Алиханян. В рамках проводившегося исследования было организовано небольшое опытное производство лизина на заводе по производству антибиотиков в молдавском городе Унгены. Другая группа ученых работала в Латвии, в Институте микробиологии им. А. Кирхенштейна под руководством академика М.Е. Бекера. Программы проводившихся научных исследований были разные: в Латвии собирались производить более простой в изготовлении кормовой концентрат лизина (ККЛ), а курчатовцы – кристаллический препарат лизина. По решению Главмикробиопрома было построено два одинаковых по мощности завода – для производства кормового концентрата лизина в Латвийском городе Ливаны и для кристаллического препарата в Чаренцаване (Армения) для того, чтобы сравнить предлагаемые технологии. Проектная мощность Ливанского биохимического завода на 1980 г. была перекрыта, он выпускал около 2000 т ККЛ в год вместо запланированных 1000 т., в Чаренцаване выпускали 100000 т кристаллического лизина в год, остальная продукция – ККЛ.

Основные методы получения лизина

Вначале оба препарата (кристаллический лизин и ККЛ) получают по общей технологии: микроорганизмы, вырабатывающие лизин, выращивают на питательной среде, в которой количественно преобладают источники азота и углерода, в том числе на основе отхода, образующегося при производстве сахара, – мелассе с добавлением солей аммония. При этом аминокислота, нарабатываемая бактериями, накапливается в

культуральной жидкости, дальнейшую переработку которой в зависимости от целевого продукта осуществляют одним из двух способов.

Согласно одной технологии культуральную жидкость пропускают через ионообменные колонки. При этом лизин, адсорбированный на ионообменной смоле, элюируют и подвергают кристаллизации. В результате получают кристаллический лизин, представляющий собой мелкий белый кристаллический порошок, содержащий более 95 % аминокислоты. Однако себестоимость получаемого таким путем кристаллического препарата высока. Кроме того, технология утилизации отходов данного производства полностью не отработана. В связи с этим Чаренцаванский завод обеспечивал невысокий выход кристаллического лизина.

Большую часть продукции в Чаренцаване и на других лизиновых предприятиях страны получают по другой технологии, согласно которой полученную на первом этапе культуральную жидкость выпаривают, сушат с наполнителем (пшеничные отруби и др.), получая при этом ККЛ, представляющий собой серовато-коричневый порошок или гранулы, содержащий 7–15 % аминокислоты. Разработанная технология отличается невысоким выходом лизина, однако значительно экономичнее получения кристаллического препарата. Этим способом нельзя наработать более концентрированный продукт, т.к. без наполнителя образуется очень гигроскопичный порошок, который трудно хранить и применять.

Проблема заключается в том, что в нашей стране не производятся специализированные высокопроизводительные сушилки для ККЛ, поэтому вместо сухого препарата заводы частично получают жидкий концентрат лизина (ЖКЛ), т.е. просто сгущают культуральную жидкость путем выпаривания. В ЖКЛ содержится около 7 % аминокислоты. ЖКЛ применяют в качестве кормовой добавки. Его подмешивают к силосу или к гидролизным дрожжам, при этом достигается значительный прирост массы сельскохозяйственных животных. Однако перевозить его на значительные расстояния затруднительно, т.к. очень быстро портится, поэтому заводы снабжают ЖКЛ близлежащие хозяйства.

Кроме того, биотехнологи научились получать более концентрированные препараты. Однако предложенная технология еще не переведена на промышленный уровень. Новая, усовершенствованная технология получения лизина разработана во ВНИИ генетика усилиями нескольких лабораторий. Культуральную жидкость, как и при производстве кристаллического лизина, пропускают через ионообменные колонки, после чего элюированную аминокислоту не кристаллизуют, а просто сушат, но без наполнителя (в нем нет необходимости, потому что в данном случае порошок получается негигроскопичным). Готовый препарат содержит до 70 % лизина. При этом решена и проблема с отходами. В связи с тем, что в них попадает вся биомасса (т.е. в основном белок), отходы сушат и получают на их основе отличную белковую добавку к кормам, а т.к. технология обходится без отходов, производство можно перевести на замкнутый цикл. Следует отметить и еще одно преимущество: согласно разработанному способу завод может работать на разном сырье, т.е. когда сезон переработки сахара закончится, и мелассы больше не будет, микроорганизмы будут культивировать на уксусной кислоте. При этом было установлено, что данный субстрат они усваивают эффективнее мелассы.

Схема микробиологического синтеза лизина

В основу данного производства положена технология, основанная на использовании одноступенчатого микробиологического синтеза, включающая промышленное культивирование ауксотрофных мутантных штаммов бактерий рода *Corynebacterium*, способных к синтезу лизина. Обычно у диких штаммов, на основе которых получены ауксотрофные мутанты, сверхсинтеза лизина не наблюдается, вследствие действия механизмов саморегуляции.

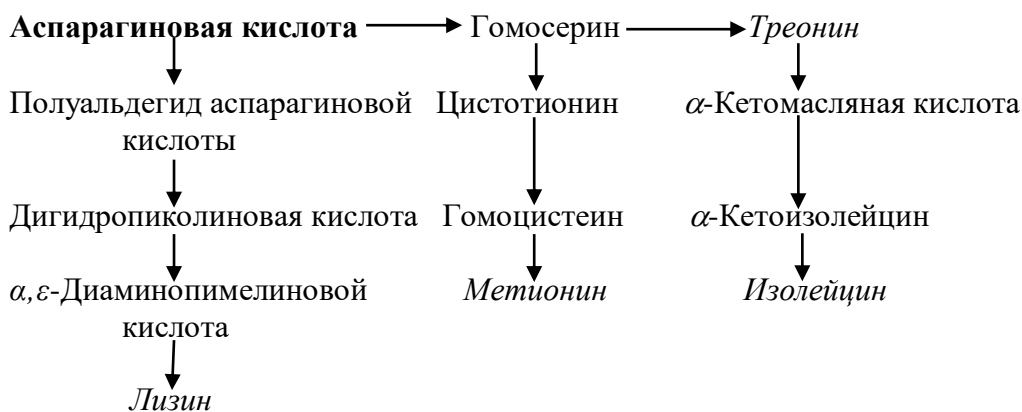


Рис. 2. Синтез лизина, метионина, треонина и изолейцина

В клетках бактерий лизин синтезируется из аспарагиновой кислоты (рис. 2) через ряд промежуточных этапов, связанных с образованием полуальдегида аспарагиновой кислоты, дигидропиколиновой кислоты и α, ϵ -диаминопимелиновой кислоты, являющейся непосредственным предшественником лизина. Кроме того, полуальдегид аспарагиновой кислоты является одним из предшественников в синтезе аминокислот – треонина, метионина и изолейцина.

Процесс синтеза лизина, треонина, метионина и изолейцина начинается фосфорилированием аспарагиновой кислоты с помощью аллостерического фермента аспараткиназы, активность которого ингибируется совместным действием двух аминокислот (лизина и треонина), если они накапливаются в клетках бактерий в избыточной концентрации. Если снизить концентрацию одной из этих аминокислот, то синтез другой будет осуществляться даже при условии, когда она накапливается в высокой концентрации.

Для снятия регуляции синтеза лизина необходимо прекратить образование треонина на стадии превращения полуальдегида аспарагиновой кислоты в гомосерин, катализируемое ферментом гомосериндегидрогеназой, что достигается посредством мутагенеза. Опыты показывают, что мутантные клетки, не образующие гомосериндегидрогеназы, при их культивировании на искусственной питательной среде обеспечивают высокий выход лизина. Дефицитные аминокислоты, которые не синтезируются мутантными клетками (гомосерин, треонин, метионин), вводятся в состав питательной среды в таком количестве, чтобы они не были регуляторами синтеза лизина.

При приготовлении питательной среды для культивирования производственных штаммов ауксотрофных мутантов, обладающих способностью к сверхсинтезу лизина, в качестве источника углерода используют смеси, включающие уксусную кислоту и свекловичную мелассу, в качестве источника азота – соли аммония, мочевины, кукурузный экстракт, гидролизаты дрожжей. Кроме дефицитных аминокислот, которые не синтезируются клетками мутантных штаммов, в питательную среду добавляют необходимые для жизнедеятельности микроорганизмов микро- и макроэлементы, витамины (биотин, витамины группы В и др.). В процессе культивирования обеспечивается подача стерильного воздуха с помощью специальных турбинных мешалок. Для предотвращения вспенивания субстрата и клеточной суспензии в среду добавляют пеногасители.

Посевной материал, предназначенный для промышленной ферментации, вначале выращивается в инокуляторах при температуре 28–32 °С, величине рН 7–7,2 в течение 18–24 ч. После полученная суспензия клеток подается в производственные ферментеры объемом 50–100 м³, в которых поддерживается постоянный режим аэрации, необходимое давление, осуществляется постоянный контроль основными параметрами процесса. Продолжительность ферментации составляет 55–72 ч. Накопление в культуральной жидкости лизина начинается через 25–30 ч после начала выращивания промышленной

культуры и к концу ферментации достигает 40–50 г/л. Культуральную жидкость отделяют от биомассы продуцента фильтрованием и используют для получения лизина. В данном случае возможно получение нескольких видов товарной продукции: жидкого концентрата лизина (ЖКЛ), сухого кормового концентрата лизина (ККЛ), высококонцентрированных кормовых и высокоочищенных кристаллических препаратов лизина для пищевой и фармацевтической промышленности.

ЖКЛ получают выпариванием культуральной жидкости с помощью вакуум-выпарной установки до концентрации сухого вещества 40 %. Для предотвращения деградации лизина в процессе нагревания в культуральную жидкость добавляют бисульфит натрия и соляную кислоту до значения pH 4,5–5,0, в результате образуется соль – монохлоргидрат лизина.

Для получения сухого кормового концентрата лизина ЖКЛ сушат горячим воздухом с помощью распылительной сушилки при температуре 90 °С до остаточной влажности продукта 4–8 %. Высушенный продукт содержит 15–20 % монохлоргидрата лизина, 15–17 % белков, 14 % аминокислот, витамины группы В и минеральные вещества. Для снижения гигроскопичности полученного продукта в него добавляют наполнители (мясокостную муку, негашеную известь, бентонит, пшеничные отруби и др.). Пасту, полученную в результате тщательного перемешивания, высушивают на вальцово-ленточной сушилке и гранулируют. Гранулированный ККЛ негигроскопичен, содержит 7–10 % лизина.

Для получения очищенного высококонцентрированного препарата лизина культуральную жидкость после фильтрования подкисляют соляной кислотой до величины pH 1,6–2,0. Раствор монохлоргидрата лизина, образовавшийся при взаимодействии с соляной кислотой, направляют на колонки с катионитом, где происходит сорбция аминокислоты и ее отделение от культуральной жидкости. Десорбцию аминокислоты проводят путем элюирования 0,5–5 % раствором аммиака. Элюат выпаривают под вакуумом при температуре 60 °С до концентрации сухого вещества 30–50 %. После раствор монохлоргидрата, подкисленный соляной кислотой, высушивают. В результате перекристаллизации полученной соли можно получить препараты с содержанием монохлоргидрата лизина 97–98 %.

В процессе производства лизина кроме основного продукта находят применение побочные продукты и отходы производства. После отделения культуральной жидкости в осадке остаются биомасса продуцента, а также фосфаты и другие ценные компоненты питательной среды, которые после высушивания могут быть использованы в качестве кормовой добавки.

Технологические стоки и промывные воды после выделения монохлоргидрата лизина, содержащие в растворенном состоянии аминокислоты, в том числе остаточный лизин и другие ценные компоненты, объединяют и полученную смесь упаривают, и затем высушивают в присутствии наполнителя до остаточной влажности 10 %. В результате получают кормовой препарат с высоким содержанием белков (до 40 %) и незаменимых аминокислот.

3.3. Биотехнология триптофана

При биотехнологическом производстве триптофана применяют одноступенчатый синтез с применением бактериальных ауксотрофных мутантов с нарушенной регуляцией синтеза аминокислот и двухступенчатый синтез, включающий вначале получение предшественника триптофана, а затем его ферментативное превращение в конечный продукт – триптофан.

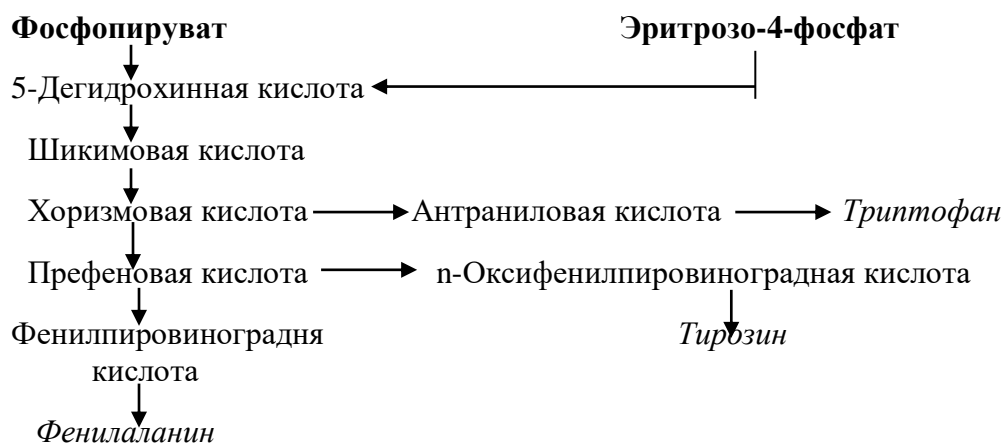


Рис. 3. Схема синтеза триптофана, фенилаланина и тирозина:

У бактерий триптофан образуется из эритрозо-4-фосфата и фосфоенолпировиноградной кислоты через ряд последовательных реакций (рис. 3), включающих образование шикимовой и хоризмовой кислот. Непосредственным предшественником триптофана является антраниловая кислота.

Биосинтез триптофана аллостерически ингибируется конечными продуктами, действующими на ферменты, которые катализируют начальные этапы превращений, связанные с образованием хоризмовой кислоты. Для смещения метаболических реакций по пути преимущественного образования триптофана необходимо блокировать превращение хоризмовой кислоты в префеновую, что достигается действием мутагенных факторов. У мутантов с пониженной активностью ферментов, катализирующих превращение хоризмовой кислоты в префеновую, наблюдается повышенный синтез триптофана, но для нормального развития этих мутантов, в питательную среду необходимо добавлять дефицитные аминокислоты (фенилаланин и тирозин) в количествах, не вызывающих регуляторное ингибирование ферментов синтеза триптофана.

Для промышленного получения триптофана разработаны технологии на основе использования ауксотрофных мутантных штаммов бактерий рода *Bacillus subtilis* с нарушенным синтезом фенилаланина и тирозина. Все технологические процессы организованы примерно по той же схеме, что и получение лизина с помощью мутантных штаммов *Corynebacterium*. Продолжительность ферментации составляет 48 ч при температуре 37 °С. При этом концентрация триптофана в культуральной жидкости достигает 10 г/л. После отделения от биомассы продуцента культуральную жидкость упаривают и высушивают при температуре 110–120 °С. Высушенный продукт называют кормовым концентратом триптофана (ККТ).

При получении высококонцентрированных препаратов триптофана культуральную жидкость подвергают дополнительной очистке. Для этого сначала ее подкисляют соляной кислотой до рН 1, а затем путем центрифугирования отделяют образовавшийся осадок. Далее центрифугат, содержащий триптофан, пропускают через ионообменные колонки, заполненные катионитом, в которых задерживается аминокислота. При этом культуральную жидкость, собранную на выходе из колонки, после высушивания применяют в качестве высокобелковой кормовой добавки, богатой триптофаном. Десорбцию триптофана из колонок проводят 5 % раствором аммиака в смеси изопропанола и воды. Полученный элюат направляют в вакуум-выпарительный аппарат. После этого осуществляют кристаллизацию аминокислоты при температуре 4–8 °С. Соль триптофана, выделенную в кристаллическом виде, промывают этанолом и высушивают под вакуумом при температуре 60 °С. Высушенный кристаллический препарат содержит не менее 99 % триптофана в виде хлорида.

Синтез триптофана в нашей стране производится преимущественно по двухступенчатой схеме: сначала в результате химического синтеза получают предшественник триптофана – анраниловую кислоту, которую затем с участием ферментов микробного происхождения превращают в триптофан.

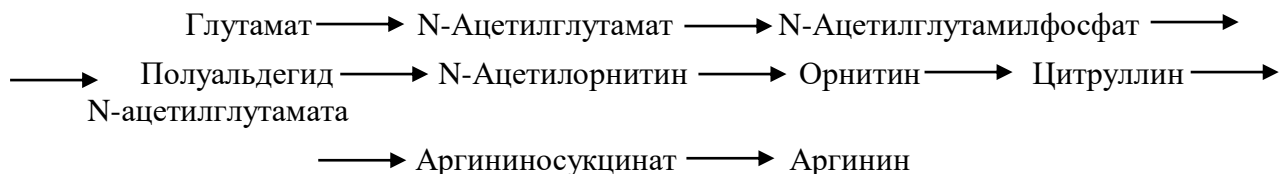
Биохимическое превращение анраниловой кислоты в триптофан происходит в 3 этапа: на первом этапе из анраниловой кислоты с участием фосфорибозилпирофосфата (ФРПФ) образуется аминокликозид-N-(5'-фосфорибозил)-анраниловой кислоты, который в результате внутримолекулярной перегруппировки и декарбоксилирования превращается в индол-3-глицерофосфат. На завершающем этапе под действием триптофансинтетазы из индол-3-глицерофосфата и аминокислоты серина образуется триптофан. В связи с тем, что в качестве активной группы у триптофансинтетазы служит пиридоксальфосфат, от наличия в среде данного кофермента зависит скорость превращения анраниловой кислоты в триптофан. В данном случае в качестве источника ферментов используют дрожжи.

Производственный процесс биохимического превращения анраниловой кислоты в триптофан проводится в 2 стадии.

На первой стадии производится наращивание биомассы дрожжей, являющихся продуцентами ферментов. Питательная среда для выращивания дрожжей готовится из свекловичной мелассы, мочевины и минеральных солей. Ферментация продолжается в течение 24 ч при температуре 30 °С. Затем в ферментер начинают вводить спиртовой 5 % раствор анраниловой кислоты и 50 % раствор мочевины. Через 3–4 ч после добавления анраниловой кислоты в ферментер дополнительно подается углеродный субстрат – меласса в виде 25 % раствора. На последующих этапах ферментации периодически производится подача анраниловой кислоты и мочевины (через 6 ч) и раствора мелассы (через 12 ч). Продолжительность ферментации составляет около 120 ч, а с учетом времени наращивания биомассы дрожжей – 144 ч. Содержание триптофана культуральной жидкости составляет 0,3–0,5 % (6 г/л). После сгущения (путем выпаривания) и сушки получают ККТ, содержащий 90 % сухого вещества, 48–54 % белков, 1–3 % триптофана, 1,5–1,9 мг (%) витамина В₁, 2,5–3,3 мг (%) витамина В₂, 62–68 мг (%) витамина РР.

3.4. Биотехнология аргинина, треонина и пролина

Для получения аминокислот – конечных продуктов неразветвленных метаболических путей, например, аргинина, ауksотрофные мутанты не используют. В этом случае применяют мутанты с дефектами регуляции биосинтеза аминокислоты, т.е. регуляторные мутанты. Помимо аргинина регуляторные мутанты используют для получения серина и цитруллина:



Успешное производство с участием микроорганизмов таких аминокислот, как глутаминовая кислота, глутамин и пролин, обеспечивается стимуляция образования аминокислот в ответ на изменение условий внешней среды. Метаболическим предшественником при биосинтезе глутаминовой кислоты служит α -кетоглутаровая кислота, возникающая в цикле Кребса из изолимонной кислоты под действием изоцитратдегидрогеназы. При выращивании бактерий родов *Corynebacterium* и *Brevibacterium* на углеродном сырье (гидролизат крахмала, тростниковая или свекловичная меласса), на этаноле или ацетате и при дефиците биотина в культуральной среде накапливается глутаминовая кислота с концентрацией 30 г/л. Важнейшее условие для образования этой аминокислоты – подавление активности глутаматдегидрогеназы.

При высоком содержании в среде биотина и солей аммония обеспечиваются условия для образования пролина, а при значительных концентрациях ионов аммония и ионов цинка в слабокислой среде – для синтеза глутамина.

Генетическая инженерия – важнейший прогрессивный способ изменения генетической программы организма в целях создания высокопродуктивных штаммов промышленных микроорганизмов. Успехи современной генетической инженерии существенно влияют на промышленную биотехнологию. Яркий пример больших возможностей генетической инженерии – создание во ВНИИ генетики и селекции промышленных микроорганизмов штамма *E. coli* для получения треонина. В результате были изменены не только регуляторные свойства аспартаткиназы, но и питательные потребности штамма. Введение в геном бактерии нового гена обеспечило бактерии возможность использования в качестве источника углерода сахарозу, основного дисахарида традиционного промышленного сырья – свекловичной мелассы. Перечисленные манипуляции наряду с амплификацией плазмид, содержащих оперон треонина, позволило значительно увеличить производительность штамма бактерии и получить за 40 ч ферментации 100 г L-треонина на 1 л культуральной жидкости. Учитывая исключительные способности штамма *E. coli* к сверхсинтезу L-треонина, японская фирма «Аджиномото» приобрела в 1982 г. лицензию на использование российского штамма – продуцента треонина для организации собственного производства.

3.5. Химико-ферментативные способы получения аминокислот

При получении ряда аминокислот химико-ферментативными способами используют ферменты, принадлежащие к разным классам. Эти процессы могут быть как одностадийными (конверсии), так и многостадийными. Источником ферментов для большинства процессов служат ферменты микроорганизмов – как индивидуальные, так и их природные смеси, содержащиеся в интактных (не растущих), высушенных и лизированных клетках, клеточных экстрактах и, наконец, в препаратах иммобилизованных клеток и ферментов.

Применение ферментов в производстве аминокислот обеспечивает стереоспецифичность процессов их синтеза, что выгодно отличает биотехнологические производства от химических. Рассмотрим некоторые примеры, иллюстрирующие данные положения.

3.5.1. Получение L-лизина

Процесс получения лизина основан на стереоспецифическом ферментативном гидролизе (конверсии) D-,L- α -амино- ϵ -капролактама, который сначала получают химическим путем из циклогексена.

Рацемат используют в качестве субстрата, который под действием фермента L- α -амино- ϵ -капролактамагидролазы (лактамаза) превращается в L-лизин, а оставшаяся непрореагировавшая его часть (D-форма) переводится при воздействии рацемазы в смесь антиподов.

Лактамаза найдена у некоторых видов дрожжей, в частности у *Candida laurentii*; у них синтез фермента индуцируется добавлением субстрата (рацемической смеси), а активность фермента поддерживается при добавлении в среду ионов Mg^{2+} , Mn^{2+} и Zn^{2+} . Рацемаза обнаружена у ряда бактерий, например у *Alcaligenes obae*. Для получения неочищенных ферментов целые клетки микроорганизмов обрабатывают ПАВ, вызывающими изменение проницаемости стенки клеток микроорганизмов-продуцентов. Разработаны иммобилизованные формы обоих ферментов. При производстве лизина в водный раствор D-,L- α -амино- ϵ -капролактама одновременно вводят источники лактамазы и рацемазы, содержащиеся в дрожжевых и бактериальных клетках. Процесс осуществляется при температуре 30–50 °С, pH 8,0–8,5 и оптимальном режиме аэрации. На выходе из реактора образуется преимущественно один продукт – лизин, который

выделяют из смеси, очищают и сушат. Описанная технология получения лизина, распространенная в США и Японии, по завершении процесса обеспечивает содержание аминокислоты в реакционной среде свыше 150 г/л. Кроме того, созданы мутанты, у которых целевой продукт – лизин далее не вовлекается в обмен веществ, что увеличивает выход искомого продукта.

3.5.2. Получение триптофана

Химико-ферментативный способ получения триптофана состоит в прямой конденсации индола, аммиака и пировиноградной кислоты. Реакцию катализирует пиридоксальзависимая триптофан-индоллиаза (триптофаназа). Фермент широко распространен в природе. Он обнаружен у бактерий *E. coli*, *Bacillus albei*, *Proteus rettgeri* и характеризуется широкой субстратной специфичностью. Кроме L-триптофана его субстратами служат L-цистеин, S-метил-цистеин, β -хлор-L-аланин, L-серин. Триптофаназа ускоряет реакции α,β -элиминирования и β -замещения, но ее действие может быть обращено и в сторону реакции конденсации. Добавление триптофана индуцирует образование фермента, а добавление индола ингибирует его синтез у бактерий, поэтому процесс получения триптофана ведут при избытке аммиака и пирувата.

Выход аминокислоты при реализации химико-ферментативного способа получения триптофана составляет 63 г/л.

Набор ферментов, используемых для получения аминокислот, достаточно разнообразен. К их числу относятся гидролазы, дегидрогеназы, лиазы, лигазы и изомеразы. Столь же разнообразен и перечень целевых аминокислот, производимых химико-ферментативным способом (L-аспарагиновая кислота, L-аланин, L-глутамин, L-лизин, L-тирозин, L-триптофан, L-цистеин, L-фенилаланин, L-метионин). Химико-ферментативный способ в сравнении с микробиологическим более специфичен, не требует процедуры очистки аминокислот от побочных продуктов и сточных потоков. Однако по стоимости сырья и ферментативных препаратов он еще уступает микробиологическому способу.

3.6. Получение аминокислот с помощью иммобилизованных ферментов

Большинство аминокислоты усваиваются только в L-форме, при этом попадание в организм D-формы нежелательно.

L- и D-формы – энантиомеры, разновидность изомеров, являющихся зеркальными отражениями друг друга. Смесь L- и D-форм в равных соотношениях называют рацемической. Рацемической смеси присущи все свойства чистого вещества, т.к. L- и D-изомеры во всех отношениях идентичны, кроме тех случаев, когда они вступают во взаимодействие с другим асимметрическим объектом.

Химический синтез всех аминокислот – давно решенная, несложная задача. Однако при химическом синтезе всегда получают рацемическую смесь аминокислот и, следовательно, необходима дополнительная стадия разделения энантиомеров. Химически это осуществить очень трудно. В то же время ферменты способны «узнавать», а значит и по-разному реагировать на L- и D-формы аминокислот или их производные. Преимущественное расщепление одного из энантиомеров под действием ферментов настолько предпочтительно, что, как правило, они быстро реагируют с L-изомером, совершенно не затрагивает D-изомер. Это свойство (энантиоселективность) было положено в основу ферментативного разделения рацемических смесей аминокислот.

При этом промышленный процесс выглядит следующим образом: исходными веществами служат модифицированные по аминогруппе D, L-аминокислоты, полученные в результате химического синтеза. На данную смесь воздействуют иммобилизованной аминокислотазой. При этом фермент гидролизует амидную связь только L-изомера. В результате образуется свободная L-аминокислота, обладающая более высокой растворимостью по сравнению с ацильным производным. Образовавшаяся смесь

свободной L-аминокислоты и ацилированной D-аминокислоты разделяют простыми физическими методами, основанными на их различной растворимости. Оставшийся после разделения D-изомер обычно при повышенной температуре рацемизируют, т.е. превращают в исходную D,L-смесь и снова направляют в реакцию с ацилазой. В результате добиваются высокой концентрации L-аминокислоты. Фермент аминацилаза малочувствителен к типу аминокислоты и поэтому одна установка с иммобилизованным ферментом может использоваться для получения самых разнообразных L-аминокислот.

Иммобилизацию аминацилазы проводят адсорбцией на специально подобранном полимерном носителе. Когда ее активность снижается, в реактор добавляют свежую порцию фермента (один раз в несколько месяцев), которая тут же адсорбируется на носителе.

Промышленность в больших количествах производит L-аспарагиновую кислоту, которую широко используют в пищевом производстве в качестве вкусовой добавки. Для ее синтеза разработан одностадийный ферментативный процесс, основанный на реакции присоединения аммиака к двойной связи фумаровой кислоты:



Данная реакция катализируется ферментом аспартазой. Выход целевого продукта (L-аспарагиновой кислоты) по данной технологии близок к 100 %. В настоящее время в технологии данной кислоты используют не индивидуальный фермент (аспартазу), а бактериальные клетки, иммобилизованные в геле.

L-тирозин получают в результате обратимой реакции конденсации фенола, аммиака и пировиноградной кислоты. В данном случае в качестве биокатализатора используют иммобилизованные клетки, содержащие тирозинфеноллазу. В связи с обратимостью реакции невозможно обеспечить выход целевого продукта выше 70–90 %. Процесс осуществляют, так чтобы целевой продукт (L-тирозин), обладающий низкой растворимостью, отделяют фильтрованием, а не прореагировавшие исходные вещества возвращаются повторно в цикл.

Если вместо фенола ввести в реакцию пирокатехин (1,2-диоксибензол), то целевым продуктом окажется L-диоксифенилаланин (ДОФА). Данная аминокислота – лекарственное средство для терапии болезни Паркинсона, и поэтому необходима в больших количествах. В связи с тем, что ДОФА очень чувствительна к кислороду воздуха, поэтому при ее получении путем химического синтеза или выделения из природных источников характеризуется низким выходом. Ферментативный синтез происходит значительно быстрее в мягких условиях и позволяет получить более чистый продукт.

Альтернативный путь получения ДОФА – это гидроксилирование L-тирозина в присутствии тирозиназы: L-тирозин + 0,5O₂ → L-ДОФА.

Однако в данном случае, встречается довольно характерная трудность, связанная с механизмом действия оксигеназ, к которым относится и тирозиназа, а также целый ряд других, так называемых кофакторных ферментов, при функционировании которых расходуется дополнительное вещество – кофактор. В рассматриваемом случае – это тетрагидроптеридин, который в ходе реакции окисляется, и, следовательно, требуется его дополнительная регенерация.

В реакциях получения тирозина можно использовать не только фенолы, но и другие гетероциклы. Так, при введении индола в присутствии триптофаназы получается триптофан: Индол + CH₃C(O)COOH + NH₃ → L-триптофан.

4. Общая характеристика стероидных соединений.

Стероиды – производные циклопентанопергидрофенантрена.

Стероиды – это твердые оптически активные вещества, обычно плохо растворимые в воде, подразделяющиеся на стеринны, витамины D, желчные кислоты, желчные спирты, сапонины, кардиотонические стероиды, стероидные алкалоиды, стероидные гормоны.

Для природных стероидов характерно присутствие гидроксильной группы или кетогруппы в положении 3 и боковой цепи или кислородной функции в положении 17.

Биогенетическим предшественником стероидов является *скавален*.

Соединения, содержащие стероидный скелет, чрезвычайно *широко распространены в живой природе*. Они обнаружены практически во всех без исключения организмах – от одноклеточных до высших растений и млекопитающих.

Стероиды выделяют: из спинного мозга и желчи рогатого скота, щелочного гидролизата дрожжей, растительных масел и животных жиров, отходов целлюлозно-бумажного производства, различных растений или синтезируют из неприродного сырья.

Основной областью применения стероидов является медицина.

Поражает широта и разнообразие биологических функций, выполняемых стероидами. Это и организация клеточных мембран (стерины), и стимуляция или ингибирование роста растений (стероидные алкалоиды и стероидные сапонины), и регуляция линьки у насекомых (экидистероиды). Кортикостероиды регулируют углеводный обмен у всех позвоночных (глюкокортикоиды) и солевой обмен у наземных позвоночных (минералокортикоиды). Процесс размножения в значительной степени регулируется половыми гормонами (эстрогенами, андрогенами и гестагенами). Помимо основных функций стероиды выполняют также большое число второстепенных функций, например, участвуют в процессах регуляции биосинтеза.

Все эти многочисленные биологические функции выполняются стероидами, сравнительно мало на первый взгляд отличающимися друг от друга по химическому строению. Действительно, стероидные соединения различаются в основном лишь боковой цепью при C₁₇, состоящей у холестерина из восьми атомов углерода и сокращающейся у андрогенов и эстрогенов до одной гидроксильной группы. Другие различия касаются числа и местоположения простых заместителей (гидроксильной, аминной, карбонильной группы) в ядре и появления или исчезновения двойных связей.

Примечательной особенностью стероидных соединений служит то, что они, судя по всему, появляются на самых ранних стадиях биологической эволюции. Во всяком случае, представители стероинов и некоторых других классов стероидов обнаружены у бактерий и простейших; имеются и палеонтологические данные об обнаружении стероидов в докембрийских отложениях.

Таким образом, выделяют *три основные особенности стероидов*:

- 1) ранее появление стероидных соединений в живой природе;
- 2) сохранение на всем протяжении эволюции характерного для стероидов циклопентанопергидрофенантренового скелета;
- 3) большая широта и разнообразие осуществляемых стероидными соединениями биологических функций.

Поэтому стероиды действительно довольно хорошо подходят на роль соединений, обеспечивающих *химическую основу биологической стабильности*. Маркером, осуществляющим пиктографическую основу информационной записи, служит их легко узнаваемый скелет – весьма устойчивый и обладающий большой информационной емкостью. В самом деле, молекула холестерина, например, содержит 8 асимметрических центров, поэтому для нее число возможных стереоизомеров составляет $2^8 = 256$. Введение лишь одного заместителя удваивает эту цифру, двух – учетверяет; к тем же последствиям приводит и появление различий в самих заместителях. В результате стероиды по информационной емкости на один углеродный атом скелета значительно превосходят полимерные молекулы.

5. Термин «биоконверсия». Значение процесса биоконверсии (биотрансформации) в практике получения стероидных соединений.

Биоконверсия (или биотрансформация) заключается в превращении метаболитов в структурно родственные соединения, обладающие более ценными свойствами, чем

исходные вещества, под действием микробных клеток. Поскольку микроорганизмы могут проявлять свое каталитическое действие в отношении лишь каких-то определенных веществ, протекающие при их участии процессы более специфичны, чем чисто химические.

Наиболее известный процесс биотрансформации – получение уксуса в результате превращения этилового спирта в уксусную кислоту. Но среди продуктов, образующихся при биотрансформации, есть и такие высокоценные соединения, как стероидные гормоны, антибиотики, простагландины.

Способность микроорганизмов выступать в роли химических катализаторов впервые удалось использовать в полной мере для синтеза промышленно важных стероидных соединений. В последние 30 лет субстратная стереоспецифичность ферментов нашла широкое применение в производстве стероидов при осуществлении разнообразных реакций: гидроксирования, дегидроксирования, эпоксидирования, окисления, восстановления, гидрогенизации, дегидрогенизации, этерификации, гидролиза эфиров и изомеризации. Целью всеобъемлющих исследований в этой области было осуществление специфических структурных перестроек стероидов при мягких условиях. Специфичность таких реакций определяется либо выбором определенного вида микроорганизмов, либо химической модификацией субстрата, стереохимически исключающей другие реакции. Понимание зависимости между строением молекул субстрата и характером перестройки, осуществляемой микроорганизмами, позволило сформулировать требования для каждой конкретной реакции, например, для гидроксирования. В определении скорости и направления реакции главную роль играют положение и ориентация замещающих групп в молекуле стероидов. История развития методов микробиологического преобразования стероидов представляет собой прекрасный пример сочетания химического подхода со специфичностью и разнообразием биологических систем. Кроме того, на этой основе может быть осуществлен синтез новых стероидов, обладающих лучшими фармакологическими свойствами.

6. Особенности получения кортизона.

Итак, применение методов, основанных на биоконверсии соединений, наиболее полно иллюстрирует история синтеза стероидных гормонов. В начале 1930-х гг. Кендалл из Фонда Мэйо и Райхштейн из Базельского университета выделили из надпочечников *кортизон*. Десятилетием позже Хенч из того же Фонда Мэйо установил, что кортизон эффективен при лечении ревматоидного артрита.

Химический синтез кортизона состоит из 37 стадий, и таким образом, 1 г получаемого вещества стоил очень дорого (до 200 долларов). Одна из ключевых стадий синтеза состоит во введении атома кислорода в положение 11 α -стероидного ядра; эта стадия необходима для создания физиологической активности молекулы.

В 1952 г Петерсон и Мюррей из «Апджон и К^о» обнаружили, что штамм *Rhizopus arrhizus* способен гидроксировать прогестерон и тем самым вводить атом кислорода в положение 11 α . Прогестерон – это ранний промежуточный продукт синтеза кортизона, и при помощи микробного гидроксирования (которое осуществляется в промышленности микроорганизмами, близко родственными к *R. arrhizus*, например, *R. nigricans*) удалось синтезировать кортизон. При этом синтез кортизона сократился до 11 стадий вместо 37, а стоимость получаемого гормона упала до 6 долларов за 1 г.

Другие преимущества микробной конверсии заключались в том, что брожение происходило при температуре 37 °С в водной среде и при атмосферном давлении, тогда как химический синтез кортизона требовал экстремальных температур и давления.

Сегодня любой атом углерода стероидного ядра можно гидроксировать при помощи определенных микроорганизмов.

7. Достижения российской науки в области микробной конверсии стероидных соединений.

Основоположником развития данного направления науки является академик Г.К. Скрыбин. Поняв перспективность исследований в области биоконверсии стероидов и их громадное практическое значение, Г.К. Скрыбин занялся данными исследованиями, организацией сотрудничества с химиками в системе Академии наук и отраслевых институтов, практической реализацией результатов работы.

Исследования микробиологической биоконверсии стероидов, включая разработку регламентов микробиологического получения стероидных препаратов, на первом этапе проводились объединенными усилиями коллективов Института микробиологии, Всесоюзного научно-исследовательского химико-фармацевтического института, Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, заводов им. Л.Я. Карпова и "Акрихин".

Первый цикл работ Г.К. Скрыбина был посвящен поиску в природе микроорганизмов-трансформаторов и выяснению связи систематического положения этих культур со спецификой их трансформирующего действия.

Вторая группа работ обобщала исследования по изысканию путей контролируемого микробиологического превращения стероидов.

Третье направление исследований было связано с использованием микроорганизмов-трансформаторов для микробиологического получения гидрокортизона, эпигидрокортизона, преднизона, преднизолон и дианабола.

Основное внимание исследователей было сосредоточено на микробной конверсии микрокристаллических субстратов и изучении физиологии стероидтрансформирующих штаммов. Главными объектами исследования являлись процессы дегидрирования кортизона и гидроксигидрирование вещества "S" Рехштейна до гидрокортизона и эпигидрокортизона.

Под руководством Г.К. Скрыбина и при непосредственном практическом участии уже в конце 60-х – начале 70-х годов были разработаны и внедрены в производство технологии получения преднизона и преднизолон, впервые в СССР было освоено промышленное производство стероидных препаратов на основе микробиологической трансформации.

Исследования в области микробной биоконверсии стероидов были продолжены под руководством Г.К. Скрыбина в Институте биохимии и физиологии микроорганизмов АН СССР. В начале 70-х годов вместе с К.А. Кощеенко и другими сотрудниками этого института им были проведены первые эксперименты по иммобилизации интактных клеток микроорганизмов.

В 1975 г. на Советско-американской конференции Г.К. Скрыбин выступил с докладом, в котором обосновал теоретические аспекты иммобилизации живых клеток микроорганизмов и возможности их практического использования, в том числе как биокатализаторов пролонгированного действия в синтезе стероидных гормонов. С этого времени значительно интенсифицировались исследования иммобилизованных микроорганизмов. За относительно короткий срок были исследованы физиология иммобилизованных клеток, особенности метаболизма, взаимодействие клеток с носителями и липофильными субстратами, изучены структурно-функциональные характеристики иммобилизованных систем, разработаны различные методы иммобилизации (включение в гели различной природы, адсорбция и др.). Эти исследования позволили сформулировать закономерности поведения живых клеток в иммобилизованном состоянии. С помощью живых иммобилизованных клеток удалось впервые осуществить такие процессы трансформации стероидов как: 1,2-дегидрирование, 1,2-восстановление, стереоспецифическое 17 β -восстановление, 20 α - и 20 β -восстановление и др. Исследования фундаментального характера сочетались с практическими исследованиями. Так, в начале 80-х годов были разработаны и успешно

прошли заводские испытания технологии получения преднизолона на основе использования иммобилизованных бактериальных клеток.

Целый ряд работ имели принципиальное значение для развития микробной биоконверсии стероидов: исследования в области физиологии иммобилизованных микроорганизмов, создание биокатализаторов пролонгированного действия на их основе, разработки технологий получения кортикостероидов и их дегидроаналогов.

Созданное Г.К. Скрябиным направление исследований продолжает активно развиваться. В последние годы исследования сконцентрированы на приоритетных направлениях синтеза стероидных полупродуктов и микробного биокатализа: селективной дегградации боковой цепи природных стероидов и биоконверсии липофильных субстратов в нетрадиционных средах. Одним из последних достижений является создание конкурентоспособных технологий получения стероидных полупродуктов на основе молекулярного капсулирования стероидов.

8. Примеры микробиологической трансформации стероидов

Рассмотрим некоторые примеры микробиологической трансформации стероидов:

ПРОГЕСТЕРОН→11 α -ГИДРОКСИПРОГЕСТЕРОН.

Данная микробиологическая трансформация прогестерона в 11 α -гидроксипрогестерон осуществляется под действием микроорганизмов рода *Rizopus arrhizus*.

КОРТИЗОН→ПРЕДНИЗОН.

Данная биологическая трансформация реализуется под действием бактерий рода *Corynebacterium simplex*.

ГИДРОКОРТИЗОН→ПРЕДНИЗОЛОН.

Как и в выше рассмотренном примере, биотрансформация гидрокортизона в преднизолон осуществляется под действие бактерий рода *Corynebacterium simplex*.

К наиболее современным примерам биотрансформации стероидных соединений относится разработка метода синтеза анаболического препарата метандростенолона из метилтестостерона с использованием реакции микробиологического дегидрирования в присутствии природных или синтетических полимеров, таких как водорастворимые производные β -циклодекстрина или поливинилпирролидон. Оба полимера позволяют поднять нагрузку стероидного субстрата до 5 – 6 г/л, а степень превращения до 95 – 96 %. Использование полимеров на стадии трансформации позволило применить экологически чистый сорбционный способ выделения метандростенолона. Данный метод микробной конверсии был разработан в Центре "Биоинженерии" РАН.

Еще одной важной разработкой в области микробной конверсии стероидов стало изучение влияния различных источников углеводов и азота на процесс биотрансформации холестерина в андростендион, что легло в основу разработки новой композиции ферментационной среды, в состав которой не вошла соевая мука. Исключение этого белкового компонента из композиции питательной среды дает положительный эффект при дальнейших стадиях (выделение и химическая очистка) получения конечного продукта. Для процесса микробиологической трансформации холестерина в андростендион разработан технологический прием, позволяющий сократить сроки ферментации до 48 – 60 часов без уменьшения выхода целевого продукта. Данное исследование было также осуществлено в Центре "Биоинженерии" РАН.

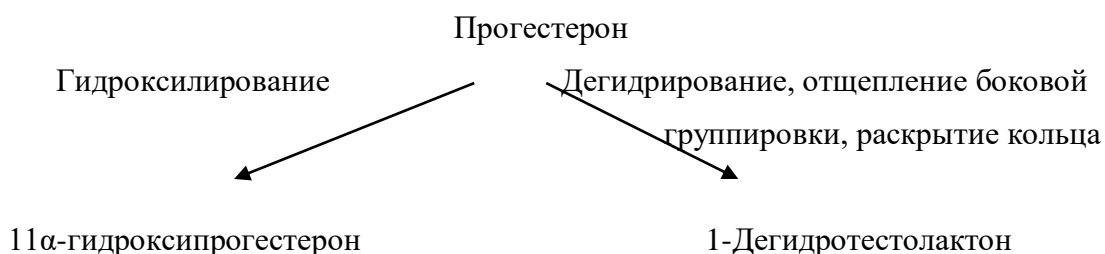
9. Перспективные направления получения стероидных соединений.

Итак, первым запатентованным процессом микробной трансформации стероидов является процесс 11 α -гидроксилирования прогестерона некоторыми видами грибов, разработанный еще в 1937 г., но внедрить его в промышленность удалось лишь в 1952 г.

С технологической точки зрения этот процесс не потерял актуальности и в настоящее время. Сегодня в данном процессе используются такие виды грибов, которые обладают весьма высокой специфичностью относительно места гидроксилирования.

Дальнейшие усовершенствования процесса биоконверсии стероидных соединений может быть основано на использовании спор грибов или на изменении состава культуральных сред. Упомянутая выше трансформация может быть выполнена с высоким выходом при концентрации субстрата 20 – 50 г/л.

Схема применяемого в промышленности метода микробной трансформации прогестерона



Сходным образом по положению 7 и 14 может быть гидроксилирован дезоксикортикостерон. Если провести 6 α -метилирование ядра молекулы стероида, то нежелательного гидроксилирования по 7 α -положению не произойдет. Направленное гидроксилирование путем химической модификации широко используется на практике для повышения эффективности процесса.

Большинство поступающих в продажу стероидов, обладающих противовоспалительным действием, - это *производные преднизолона*, и именно этим определяется важная роль процессов микробного гидроксилирования кортикостерона (вещества S Рейхштейна) и его производных.

В промышленном масштабе производство гидрокортизона путем гидроксилирования кортикостерона осуществляется при участии некоторых видов грибов (например, *Cunninghamella blakesleeana*) с начала 50-х гг. За это время процесс был неоднократно усовершенствован.

Проблемы, связанные с деградацией субстрата, которая происходит при обычных условиях производства, можно решить путем регулярного его добавления или использования других микроорганизмов, например, *Thioghymella orchidis*.

Кроме того, ход синтеза можно контролировать, применяя метод химической модификации. Так, метилирование по 16 α -положению подавляет нежелательное восстановление кетогруппы при C₂₀, а образование уксуснокислого эфира по C₁₇ стереохимически препятствует другим побочным реакциям. Конечное превращение гидрокортизона в коммерческие продукты со структурой преднизолона также осуществляется с помощью микроорганизмов. Химические методы здесь явно проигрывают по сравнению с микробиологическим способом. Одной из главных реакций в этом процессе является образование 1,2-двойной связи; для дегидрогенизации по положению 1 используют главным образом *Mycobacterium globiforme* и *Arthrobacter simplex*. Выход этой реакции зависит от того, в какой форме подается субстрат. Если он

поступает в среду в микрокристаллах, то концентрацию субстрата можно довести до 400 г/л и получить выход 80 – 90 %.

Таким образом, вещество S Рейхштейна (кортикостерон) под действием бактерий рода *Curvularia lunata* подвергается биологической трансформации в кортизол или гидрокортизон, который в свою очередь под действием бактерий рода *Arthrobacter simplex* подвергается биоконверсии, результатом которой является образование преднизолона.

При модификации прегнана получают многие фармакологически ценные кортикоиды, гестагены и анестезирующие средства стероидной природы. Их производство основано на проведении широкого спектра превращений, осуществляемых микробами.

Другой важной группой соединений, модифицируемых с помощью микроорганизмов, являются андростаны и эстраны. Их применяют в промышленном синтезе половых гормонов и минералокортикоидных соединений. Примером такого рода служит превращение дрожжами 4-андростен-3,17-диона в тестостерон. Все возрастающее значение приобретает процесс окислительного расщепления боковой цепи C₁₉-стероидов: он позволяет использовать дешевые стероиды для производства предшественников, идущих на синтез стероидов, крайне нужных фармакологам. И в этом случае приходится проводить химическую модификацию, чтобы предотвратить разрушение «скелета» молекул стероидов. Она заключается в гидроксировании по положению C₉ и направляет процесс микробной перестройки структур на разрушение боковых цепей. Так, холестерол или его соли превращаются в 4-холестен-3-он и 1,4-андростадиен-3,14-дион.

Микроорганизмы находят также применение при производстве сырья для получения стероидов. Таким сырьем являются *стерины*; их основными источниками служат диосгенин из корней Ялка, стигмастерин и ситостерин, экстрагируемые из жмыха соевых бобов. При этом необходимо отщепить боковую цепь молекулы растительных стеринов, в ряде фармацевтических компаний обнаружили, что для этого экономически выгодно использовать микобактерии. Некоторые мутантные штаммы микобактерий не способны завершить разложение молекулы стерина, они-то и вызывают накопление промежуточных продуктов, удобных для синтеза стероидных гормонов. Все эти усовершенствования, особенно связанные с использованием микроорганизмов, постепенно снизили цену кортизона.

Промышленное производство стероидов постоянно растет, чтобы удовлетворять растущий спрос на них в связи с появлением новых сфер применения (например, в области лечения гормональных недостаточностей, кожных болезней, аллергических и воспалительных процессов). В 1978 г в мире производились четыре основных стероида (альдостерон, кортизон, преднизон, преднизолон) общей стоимостью 300 млн. долларов.

Иногда для биоконверсии требуются смешанные культуры или последовательное добавление микробных штаммов или видов, каждый из которых осуществляет специфическую стадию биоконверсии.

Использование иммобилизованных клеток, более стабильных, чем ферменты или клеточные культуры, дает возможность повышать эффективность биоконверсии или уменьшать ее стоимость. Это может также помочь в решении проблем, связанных с нерастворимостью субстратов, таких как стероиды.

10. Использование культуры растительных тканей для получения стероидных соединений.

На основе культур растительных тканей было выделено более 50 различных стероидных соединений: β-ситостерин, стигмастерин, диосгенин, холестерин, тигогенин, гитогенин, 24-метилхлестерин и другие.

Виды диоскореи интенсивно изучаются в культуре ткани в качестве возможных продуцентов стероидных сапонинов. Диосгенин, представляющий интерес в качестве исходного вещества для производства гормональных препаратов, выделен из культур

тканей видов *Dioscorea*, *D. deltoidea*, *D. tokoro*, *D. composita*, *D. floribunda*, *Solanum xanthocarpum*, *S. laciniatum* и другие. Содержание диосгенина в культурах тканей в зависимости от происхождения и условий культивирования растений различно: 1,33 % в культурах клубневого происхождения *D. floribunda*; 3,8 % в культуре ткани *D. Deltoidea*, росшей в хемостате.

В настоящее время наметился переход к промышленным способам культивирования тканей *D. Deltoidea*. Скорость роста культуры *D. deltoidea* в ферментере достигла 0,55 г/л в день, максимальная продуктивность по содержанию диосгенина – 12 мг на 1 л культуральной среды за один день в случае двухстадийного процесса (7,8 % от массы сухой ткани).

В сумме сапонины, выделенные из каллусных тканей *D. deltoidea*, обладали фармакологической активностью, аналогичной активности стероидных сапонинов из интактного растения.

Работы ученых с культурами тканей, продуцирующими стероидные соединения, внесли большой вклад в изучение биосинтеза этих соединений. Используя меченые предшественники (^{14}C -ацетат, ^{14}C -мевалоновую кислоту, ^{14}C -2,3-оксидосквален, 4- ^{14}C -холестерин и другие соединения) было установлено, что ключевым предшественником сапонинов является циклоартенол, а также то, что гидроксированию кольца А в биосинтезе йоногенина и токорогенина предшествует гидроксирование боковой цепочки холестерина.

В результате комплекса таких исследований предложена следующая последовательность биосинтеза стероидных сапонинов: мевалонат–циклоартенол–холестерин–3, 16, 26–тригидроксихолест–5–ен–3, 16, 22, 26–тетрагидроксихолест–5–ен–диосгенин (йоногенин) – токорогенин.