

Занятие семинарского типа № 3

ТЕМА ЗАНЯТИЯ: Регуляция биосинтеза витаминных препаратов в условиях биотехнологического производства

УЧЕБНЫЙ МАТЕРИАЛ

1. Понятие о метаболизме

В переводе с греч. «метаболизм» обозначает перемена, превращение.

В физиологическом смысле метаболизм – это промежуточный обмен, т.е. превращение определенных веществ внутри клеток с момента их поступления до образования конечных продуктов (метаболизм белков, глюкозы, лекарственных препаратов).

С точки зрения промышленной биотехнологии метаболизм представляет собой образование в процессе роста и развития клеток ценных биохимических продуктов – некоторые из них выделяются в культуральную среду (внеклеточные продукты), а некоторые накапливаются в биомассе (внутриклеточные продукты).

С помощью метаболизма получают витамины, антибиотики, молочную и лимонную кислоту, пищевые консерванты и др.

В естественных условиях метаболизм сопровождается образованием строго определенных количеств метаболитов, необходимы для обеспечения жизнедеятельности клетки. Промышленное биотехнологическое производство, направленное на извлечение максимальной экономической выгоды, такая ситуация никак не устраивает. В этой связи, для максимизации прибыли необходимо произвести оптимизацию следующих технологических параметров процесса:

- ✓ выхода целевого продукта в расчете на потребленный субстрат;
- ✓ концентрации целевого продукта;
- ✓ скорости образования целевого продукта.

При этом оптимизация технологии биосинтеза метаболитов включает следующие основные этапы:

1. первоначальная селекция штамма микроорганизмов;
2. определение оптимальных значений температуры, pH, потребности в кислороде;
3. определение оптимального режима питания и накопления биомассы;
4. изменение генетической структуры организма с целью увеличения образования целевого продукта.

Разработка третьего этапа процесса непосредственно связана с биосинтезом. Для определения режима питания и накопления биомассы, оптимального для биосинтеза метаболитов необходимо математическое описание про-

цесса. Кроме определения оптимальных условий реализации процесса, математическая модель используется для автоматизации биосинтеза, что очень важно в современном биотехнологическом производстве.

2. Механизмы регуляции биосинтеза первичных метаболитов

2.1. Механизмы интенсификации биосинтеза первичных метаболитов

Первичные метаболиты. После внесения культуры в питательную среду наблюдается лаг-фаза, когда видимого роста микроорганизмов не происходит (*время адаптации*). Затем скорость роста постепенно увеличивается, достигая постоянной, максимальной для данных условий величины (*экспоненциальная или логарифмическая фаза роста*). Постепенно рост замедляется, и наступает стационарная фаза. Далее число жизнеспособных клеток уменьшается, и рост останавливается. Исходя из описанной выше кинетики, можно проследить за образованием метаболитов на разных этапах. В логарифмической фазе образуются продукты, жизненно важные для роста микроорганизмов: аминокислоты, нуклеотиды, белки, нуклеиновые кислоты, углеводы, витамины, коферменты, органические кислоты и т.д., которые называют *первичными метаболитами*.

Микробные клетки, как и клетки других живых организмов не производят избыточного количества первичных метаболитов, что было бы расточительно и уменьшало их способность к выживанию, но созданы и создаются микробные штаммы микроорганизмов с нарушением регуляции биосинтеза данных метаболитов, которые и служат исходными штаммами для промышленных процессов.

Одним из важнейших путей интенсификации биотехнологического получения первичных метаболитов является совершенствование применяемого биологического объекта.

Основными путями нарушения регуляции обменных процессов, протекающих в клетке:

- изменения генетической программы организма;
- нарушения регуляторных систем организма.

Спонтанные изменения генетической природы продуцента основаны на рекомбинации генетического материала *in vivo*. Для выделения из природных популяций высокопродуктивных штаммов микроорганизмов применяют методы селекции (направленный отбор организмов со скачкообразным изменением геномов).

Методы слепого многоступенчатого отбора случайных мутаций очень длительны. Для возникновения мутаций нужный ген должен удвоиться 10^6 – 10^8 раз. Более эффективен метод искусственного повреждения генома, к которому относится индуцированный мутагенез, базирующийся на применении мутагенов. Несмотря на трудоемкость, методы селекции не потеряли своей

актуальности для создания высокопродуктивных штаммов микроорганизмов-продуцентов.

Достижения в области молекулярной биологии и молекулярной генетики позволили биотехнологам, начиная с 70-х гг. XX в. перейти от слепого отбора штаммов мутантов к сознательному конструированию геномов, применяя технологию рекомбинантных ДНК.

Каждое из всего разнообразия веществ образуется в клетке в строго необходимом для роста количествах в результате ферментативных реакций. Координация химических превращений, обеспечивающая экономичность метаболизма, осуществляется у микроорганизмов по 3 основным механизмам:

- регуляцией активности ферментов, в том числе путем ретроингибирования;
- регуляцией объема биосинтеза ферментов (индукция и репрессия биосинтеза ферментов);
- катаболической репрессией.

В процессе *ретроингибирования* (ингибирование по принципу обратной связи) активность фермента, стоящего в начале многоступенчатого превращения субстрата, тормозится конечным метаболитом. Таким путем низкомолекулярные метаболиты передают информацию об уровне своей концентрации и состоянии обмена веществ ключевым ферментам метаболизма. С помощью данного механизма конечные продукты саморегулируют свой биосинтез.

Ретроингибирование – способ точного и быстрого регулирования образования целевого продукта. На обмен веществ, аналогичный конечным метаболитам, оказывают эффект и их аналоги.

Среди многих тысяч ферментов, присущих микроорганизмам, одни, например, ферменты гликолиза синтезируются постоянно и их образование не зависит от состава питательной среды – это *конститутивные ферменты*, а другие ферменты – *адаптивные* или *индуцибельные* – возникают только в ответ на появление в питательной среде индукторов – субстратов или их структурных аналогов.

Регуляция объема биосинтеза ферментов осуществляется на оперонном уровне путем изменения количества иРНК, образующихся в процессе транскрипции. В процессе индукции низкомолекулярный метаболит-индуктор, соединяясь с репрессорным белком (продукт гена-регулятора), инактивирует его и, тем самым, препятствует взаимодействию белка-репрессора с зоной оператора, что обеспечивает возможность присоединения к промотору РНК-полимеразы и, следовательно, начало биосинтеза.

Изучение механизмов регуляции новообразования ряда аминокислот у микроорганизмов показало, что конечные продукты метаболических путей не только ингибируют активность ферментов первых стадий процесса, но и тормозят биосинтез ферментов последних стадий, т.е. помимо аминокислот у микроорганизмов регулируется новообразование многих первичных метаболитов. Обнаруженный феномен назван *репрессией*, а ферменты, биосинтез

которых тормозится под влиянием низкомолекулярных метаболитов, переводящих репрессорный белок в активную форму, способную оккупировать зону первоначального связывания РНК-полимеразы (оператор), называется *репрессибельным* (глутаминсинтетаза, триптофансинтетаза, орнитинкарбамилтрансфераза, уреазы и др.).

Результаты проведенных исследований продемонстрировали, что репрессия биосинтеза ферментов обеспечивает более грубую, в сравнении с ретроингибированием, регуляцию образования анаболических ферментов.

В случае, если концентрация конечного продукта уменьшается до определенного очень низкого уровня, то происходит *депрессия* фермента, т.е. скорость их биосинтеза возрастает до необходимой величины.

Бактериальные клетки продуцируют большое разнообразие низкомолекулярных эффекторов в ответ на изменение факторов окружающей среды, каждый из которых, взаимодействуя по аллостерическому механизму с определенными регуляторными белками, моделирует промоторную специфичность РНК-полимеразы, запуская, экспрессию определенного набора генов.

Таким образом, ведущими механизмами, обеспечивающими экономичность образования продукта в клетках микроорганизмов, является ретроингибирование и репрессия, базирующиеся на принципе обратной связи.

Если в питательной среде присутствуют несколько различных источников углерода, клетка микроорганизма вырабатывает ферменты для усвоения лишь одного, наиболее предпочтительного субстрата – *катаболитная репрессия*, заключающаяся в подавлении биосинтеза ферментов, обеспечивающих метаболизм одного источника углерода другим. Экспрессия ферментов регулируется белком-репрессором, пространственно удаленным от гена-оператора. Белок-репрессор, будучи присоединен к гену-оператору, препятствует транскрипции структурных генов.

3. Биосинтез рибофлавина

3.1. Свойства рибофлавина

Рибофлавин (витамин В₂, 7,8-диметил-9-(1- β -рибитил)-изоаллоксазин, молекулярная масса 376,36) имеет незаменимое значение для человека и животных. Основными признаками, свидетельствующими о недостатке данного витамина в организме человека, служат растрескивание губ, поражение глаз, облысение, дерматиты.

Недостаток в кормах витамина В₂ вызывает задержку роста животных.

Впервые витамин В₂ был выделен из молочной сыворотки в 1933 г.

Рибофлавин относится к флавионам, в основе строения которых лежит гетероциклическая изоаллоксазиновая система, представленная тремя конденсированными циклами: ароматическим, пиразиновым и пиримидиновым. К азоту пиразинового кольца присоединен спирт рибит.

Рибофлавин представляет собой светочувствительное желтое красящее вещество. Его светочувствительность обусловлена наличием в боковой цепи во 2-м положении свободной гидроксильной группы. Под действием света рибофлавин превращается в люмихром. Окрашенность витамина обусловлена наличием азометиновой группировки $>C=N-$.

Рибофлавин слабо растворим в воде (около 7 мг/100 мл) и спирте. Он не растворяется в трихлорметане и других органических растворителях. Однако витамин хорошо растворяется в щелочи и соляной кислоте. Температура плавления рибофлавина составляет 280 °С, он устойчив к нагреванию и разрушается только при температуре 280–290 °С.

Водные растворы флавинов флуоресцируют на свету, давая желто-зеленое окрашивание. Максимальная абсорбция наблюдается при длинах волн 223, 267, 374 и 444 нм.

Флуоресценция связана с наличием свободной аминогруппы в 3-ем положении кольца пиримидина. Данное свойство витамина В₂ положено в основу его определения. Концентрацию рибофлавина измеряют на приборе, который называется флуориметр. Испытуемый раствор в соответствующем разведении облучают коротковолновой частью спектра (350–480 нм) и измеряют флуоресценцию при 525–535 нм.

При этом расчет осуществляют, сравнивая измеряемый раствор со стандартным.

Окислительно-восстановительные свойства флавинов обусловлены наличием в составе молекулы системы, способной к обратимому окислению и восстановлению. Атомы азота данной системы – ключевые атомы в каталитической реакции. Атомы водорода могут присоединяться к флавиновому коферменту и отрываться от него по одному. При этом кофермент может существовать в виде семихинона, форме промежуточной между полностью окисленной и полностью восстановленной.

Частично восстановленные продукты рибофлавина – лейкоформы – не флуоресцируют и обладают меньшей растворимостью в воде, в сравнении с рибофлавином. На этом основан метод выделения рибофлавина из культуральной жидкости при микробиологическом способе его получения.

Рибофлавин функционирует в двух коэнзимных формах, представляющих собой его фосфорные эфиры: рибофлавин-5'-фосфат (ФМН) и флавинадениндинуклеотид (ФАД), а также в виде моно- и динуклеотидных форм – аналогов рибофлавина.

Три факта объясняют потребность клетки во флавиновых коферментах:

1) способность флавиновых коферментов к окислительно-восстановительным реакциям, что позволяет флавином функционировать в цепи переноса электронов в митохондриях и в различных реакциях дегидрирования;

2) способность флавинов участвовать в окислительных реакциях со свободными радикалами и в реакциях с ионами металлов;

3) аутооксидабельность флавинов, которая позволяет флавопротеидам переносить электроны непосредственно на молекулярный кислород и участвовать в реакциях гидроксирования.

В природе рибофлавин не синтезируется клетками высших животных, его синтезируют высшие растения, дрожжи, мицелиальные грибы и бактерии. В организмах высших животных витамин синтезируют микроорганизмы, живущие в кишечнике, но этого количества витамина не всегда достаточно, особенно при выращивании птицы на птицефабриках, а животных на фермах. В этой связи, возникает необходимость добавления рибофлавина в корма животных и птиц.

Большинство микроорганизмов образуют свободный рибофлавин и две его коферментные формы – ФМН и ФАД. Изучение особенностей биосинтеза рибофлавина различными группами микроорганизмов показало, что он, как правило, образуется в больших количествах, чем нужно для удовлетворения потребности клетки в данном витамине.

Явление сверхсинтеза витамина В₂ было открыто в 1935 г. Гильермоном, который обнаружил, что мицелиальные дрожжеподобные грибы синтезируют и выделяют в среду в количествах до 1,5 мг/мл, в то время, как для большинства микроорганизмов, требующих витамин, достаточно его добавления к среде 0,1 мг/мл.

В природе среди микроорганизмов наибольшие количества флавинов синтезируют дрожжеподобные грибы *Eremothecium ashbyii* и *Ashbyii gossypii*. Данные микроорганизмы применяются в качестве продуцентов рибофлавина в промышленности.

3.2. Пути биосинтеза витамина В₂ и его регуляция

Путь биосинтеза рибофлавина у дрожжей, грибов и бактерий практически одинаков. Так, установлено, что предшественником рибофлавина является ГТФ.

Биосинтез рибофлавина включает пять этапов. На первом этапе происходит раскрытие имидазольного кольца ГТФ и отщепление 8-го углеродного атома, который выделяется в виде формиата. Данную реакцию катализирует фермент ГТФ-циклогидролаза II. Продуктами реакции, кроме формиата, являются пирофосфат и 2,5-диамино-6-(рибозиламино)-2,4(ЗН)-пиримидинон-5'-фосфат.

На втором этапе в результате дезаминирования образуется 2,5-диамино-6-(рибозиламино)-2,4(Ш,ЗН)-пиримидинон-5'-фосфат, который при участии соответствующей редуктазы превращается в 5-диамино-6-(рибитиламино)-2,4(1Н,ЗН)-пиримидинон-5'-фосфат. У эукариот эти две реакции осуществляются в обратном порядке.

На следующем этапе происходит включение 4 углеродных атомов с образованием 6,7-диметил-8-рибитил-люмазина (ДМРЛ). В настоящее время показано, что донором 4-углеродного фрагмента является рибулозо-6'-

фосфат или его метаболит. Перед включением в птеридин пиримидиновый интермедиант подвергается дефосфорилированию.

На последнем этапе две молекулы ДМРЛ реагируют между собой с образованием рибофлавина и 5-амино-6-(рибитиламино)-2,4(1H,3H)-пиримидиндиона. При этом одна люмазиновая молекула служит донором 4 углеродных атомов, а другая акцептором, превращаясь в рибофлавин. Последние два этапа катализируются ρ - и α -субъединицами рибофлавинсинтазы.

Ферменты биосинтеза рибофлавина кодируются *rib*-опероном.

Известно, что все рибофлавиновые гены *Bac. subtilis* картированы в двух локусах. Семь групп мутаций (*ribG*, *ribB*, *ribF*, *ribA*, *ribH*, *ribT*, *ribD*), приводящих к различным дефектам биосинтеза рибофлавина, картируются в одном локусе, расположенном рядом с маркером *lys* на 209° генетической карты *Bac. subtilis*. Второй локус, *ribC*, кодирует репрессорный белок, активируемый рибофлавином, который негативно регулирует экспрессию биосинтетических генов. Такая организация не имеет ничего общего с организацией в *E. coli* и большинстве других грамотрицательных бактериях, где гены биосинтеза рибофлавина распределены по хромосоме в четырех или пяти локусах и никакого регуляторного локуса пока не найдено.

В настоящее время выявлена полная последовательность нуклеотидов рибофлавинового оперона *Bac. subtilis*. и проведены исследования по регуляции экспрессии *rife*-генов. Показано, что *rib*-оперон *Bac. subtilis* представляет собой группу сцепления из 5 структурных генов. Гены, обозначенные как *ribG*, *ribB*, *ribA*, *ribH*, *ribTD*, кодируют ферменты пути биосинтеза рибофлавина. Необходимость всех пяти генов была доказана на основании комплементации мутаций, приводящих к ауксотрофности по рибофлавинолу.

Механизм регуляции флавиногенеза у бактерий обстоятельно изучен С.Е. Бреслером с сотр. на примере *Bac. subtilis*. Установлено, что транскрипция регулируется рибофлавином, ФМН и ФАД. Было показано, что у мутантов *Bac. subtilis*, устойчивых к аналогам рибофлавина, разрегулирован биосинтез рибофлавина.

Обнаружено две группы мутаций, влияющих на экспрессию рибофлавинового оперона *Bac. subtilis*.

Первая группа мутаций, *ribO*, картируется в одном локусе со структурными генами. В штаммах с различными мутациями по *ribO* активность рибофлавинсинтазы увеличивается в 10–30 раз по сравнению с диким типом.

Вторая группа мутаций связана с мутациями в *ribC* локусе. Предполагают, что ген *ribC* кодирует регуляторный белок, который может взаимодействовать с регуляторной областью *ribO* и, таким путем, влиять на экспрессию рибофлавинового оперона. Активность рибофлавинсинтазы и ГТФ-циклогидролазы в штаммах с мутациями в гене *ribC* более, чем в 30 раз выше по сравнению со штаммами дикого типа.

3.2.1. Продуценты витамина В₂

Биосинтез флавинов осуществляется как растительными, так и многими бактериальными клетками, а также плесневыми грибами и дрожжами.

Витамин В₂ – водорастворим, устойчив в кислой среде, но легко разрушается в нейтральной и щелочной средах, а также под действием УФ-облучения.

Для витамина В₂ характерно функционирование в коэнзимных формах: флавиномононуклеотид (ФМН) и флавиноадениндинуклеотид (ФАД).

При промышленном получении рибофлавина используют продуценты:

- ✓ бактерии (*Micrococcus glutamaticus*);
- ✓ дрожжи (*Candida guilliermondii*);
- ✓ плесневые грибы (*Aspergillus niger*);
- ✓ прочие низшие грибы (*Ashbya gossipii*).

При этом наиболее распространенным продуцентом является черная плесень (*Aspergillus niger*). В данном случае время ферментации составляет 7 суток, при температуре 28 °С; и значении рН среды 7,0 (в ходе ферментации уменьшается до 4,5–4,0)

После утилизации углеродного субстрата продуцент начинает метаболизировать кислоты, что приводит к увеличению рН среды, происходит биосинтез витамина В₂. Кристаллический рибофлавин накапливается как в мицелии, так и в гифах.

После завершения процесса ферментации мицелий выдерживают при температуре 120 °С в течение 1 часа.

В настоящее время, наряду с вышеуказанными культурами продуцентов, при промышленном производстве рибофлавина используется и мутантный штамм продуцент *Bacillus subtilis* с нарушенной регуляцией биосинтеза витамина В₂. Он устойчив к наиболее сильному антиметаболиту рибофлавина – его аминоксимулянту розеофлавинолу и обладает способностью к сверхсинтезу витамина В₂. При его культивировании на питательной среде с мелассой и дрожжевым экстрактом в культуральной жидкости накапливается 3,5–4,5 г/л рибофлавина. При этом время ферментации сокращается в 3 раза.

Кроме того, рибофлавин получают химическим методом, используя в качестве биокатализатора сухие клетки бревибактерий. Причем, если биосинтез с нативными клетками занимает несколько суток, то при биосинтезе с суспензией сухих клеток время синтеза ФАД составляет всего 15–17 ч.

3.2.2. Основные физиолого-биохимические свойства штаммов продуцентов витамина В₂

Для правильного ведения процесса биосинтеза рибофлавина нужно знать основные свойства его штаммов продуцентов. Для роста культуры *Bac. subtilis* обычно требуются нейтральные области значения рН (интервал 6,5–7,6), что в ферментере обеспечивается рН-статированием аммиаком и серной

кислотой, а в колбах введением фосфатного буфера и мочевины, при потреблении которой значение рН возрастает.

Температурный оптимум культуры *Bac. subtilis* составляет 37 °С. Однако было показано, что биосинтез рибофлавина происходит интенсивнее при более высоких температурах (40–45 °С). Однако, плаزمида *pMX45* является термочувствительной и элиминируется из клетки при температуре выше 45 °С. В этой связи, процесс биосинтеза рибофлавина реализуют при температуре 40–42 °С, в то время, как выращивание посевного материала – при 37 °С.

При выращивании культуры *Bac. subtilis* на питательных средах с высоким содержанием источника углеводов резко снижается конверсия углевода в рибофлавин. Это связано с расходом углеводов на накопление в среде больших количеств ацетона и бутандиола. При этом, чем ниже концентрация углевода, тем более эффективно протекает процесс. В этой связи, биосинтез витамина В₂ реализуют в условиях лимитирования по источнику углевода, однако его концентрация в среде не должна быть ниже 0,5%, так как в этом случае время культивирования значительно возрастает. При этом реализация режима лимитирования по углеводам возможна только в ферментерах, оснащенных системой подачи подпитки. В колбах такой процесс осуществить невозможно, поэтому накопление рибофлавина в колбах в 2–2,5 раза ниже (до 10 г/л), в сравнении с ферментерами. Такое значительное снижение накопления рибофлавина в колбах объясняется еще одним моментом – невозможностью в них обеспечить оптимальный массообмен по кислороду и углекислому газу. Биосинтез рибофлавина требует большого количества энергии в виде АТФ, который образуется при дыхании культуры, а избыток углекислого газа ингибирует биосинтез витамина. В этой связи, были предложены следующие условия процесса биосинтеза: K_{La} не ниже 4,5 и концентрация СО₂ не выше 4, что достигается как за счет увеличения подачи воздуха (продувкой), так и за счет увеличения числа оборотов и конструкции мешалки.

Предшественником биосинтеза рибофлавина является гуанинтрифосфат. Данное соединение интенсивно синтезируется, главным образом, в процессе экспоненциальной фазы роста культуры продуцента, поэтому желательно продлить эту фазу в процессе его культивирования. Это достигается введением в углеводную подпитку ростовых факторов, таких как дрожжи или дрожжевой и кукурузный экстракты.

3.2.3. Создание генно-инженерных штаммов *Bac. subtilis* – продуцентов витамина В₂

Природные штаммы *Bac. subtilis* синтезируют рибофлавин только в количествах, необходимых для поддержания собственной жизнедеятельности и не выделяют его в культуральную среду.

Во ВНИИ генетики и селекции промышленных микроорганизмов под руководством А.И. Степанова создан производственный штамм – продуцент

рибофлавина на основе *Bac. subtilis*. Сначала были получены мутанты, устойчивые к розеофлавиному (*rosR*) – структурному аналогу рибофлавина. Генетическое картирование данных мутантов показало, что они принадлежат к разряду операторных и обладают свойством выделять в культуральную среду до 10 мг/л витамина.

На втором этапе были получены мутации в гене регуляторе (*ribC*). Совмещение в одном штамме мутаций *rosR* и *ribC* позволило получить штамм со сверхсинтезом рибофлавина, продуцирующего на синтетических средах до 100 мг/л витамина.

На следующем этапе получены мутации устойчивости к аналогу пурина, 8-азагуанин, что также привело к росту продукции рибофлавина. У таких мутантов разрегулирован биосинтез пуринов. В этом случае увеличение продукции можно объяснить возрастанием накопления ГТФ – предшественника рибофлавина в его биосинтезе.

Сконструированный штамм *Bac. subtilis* ВНИИгенетика 304 на комплексных питательных средах, содержащих в качестве источника углерода сахарозу или глюкозу, а в качестве ростовых факторов дрожжи, синтезировал до 1 г/л витамина В₂. При этом синтезированный рибофлавин свободно выходит через клеточную стенку в культуральную среду, и в концентрациях около 1 г/л кристаллизуется в виде игольчатых кристаллов желтого цвета, хорошо видимых под микроскопом.

В дальнейшем был создан рекомбинантный штамм *Bac. subtilis*. При этом под термином «рекомбинантный штамм» понимают штамм микроорганизма, который содержит одну или более нуклеотидных последовательностей из этого же или другого организма на сайте, где данная последовательность отсутствует у дикого штамма, или же такая последовательность представлена в виде нескольких копий. В этой связи, данным термином обозначают микроорганизмы, содержащие чужеродные нуклеотидные последовательности, а также те, которые содержат две или более копий таких последовательностей. Так, например, ген или оперон вводят на сайт, который в норме уже содержит одну копию такой нуклеотидной последовательности, или же одну или более копий гена или оперона вводят на сайт, который в природе не содержит таких генов или оперонов. Такие рекомбинантные или генно-инженерные микроорганизмы конструируются стандартными методами ДНК-биотехнологии.

Генно-инженерными методами была сконструирована рекомбинантная плазмида *pMX45*, несущая на себе разрегулированный рибофлавиновый оперон *Bac. subtilis* и ген устойчивости к эритромицину. Данная плазмида была введена в штамм *Bac. subtilis* ВНИИгенетика 304, что за счет увеличения количества копий рибофлавинового оперона позволило получать до 3–4 г/л витамина на комплексных питательных средах.

В результате дальнейших селекционных работ были получены мутанты, ауксотрофные по аденину, и мутанты с нарушенной транскетолазой и глутаматсинтазой. Среди штаммов, ауксотрофных по аденину (т.е. таких, которые для своего роста требуют наличие в среде аденина) был отобран штамм с

увеличенной продукцией витамина, что можно объяснить возрастанием пула ГТФ в клетке в результате изменений в регуляции биосинтеза пуринов.

Основным источником углерода при биосинтезе молекулы рибофлавина является рибулозо-5'-фосфат, которая образуется в пентозофосфатном цикле, увеличение накопление ее пула в клетке связано с мутацией про транскетолазе, ферменту катализирующему перенос кетольной группы с фруктозо-6-фосфата или гептулозо-5-фосфата на альдофосфат. Такая мутация носит плеiotропный эффект и, кроме, повышения пула рибозы, приводит к нарушению транспорта глюкозы в клетку и к нарушениям в утилизации пентоз и в биосинтезе ароматических аминокислот. У мутантов с дерепрессированным биосинтезом рибофлавина блок транскетолазной реакции неизбежно должен способствовать увеличению биосинтеза рибулозо-5-фосфата, который затем направляется в сторону образования пуриновых нуклеотидов и усиления флавиногенеза.

Для биосинтеза молекулы рибофлавина клетке требуется азот. Согласно общепринятому мнению, два соединения L-глутамат и L-глутамин являются основными поставщиками азота у бактерий. Основным донором азота для биосинтеза изоаллоксазинового кольца рибофлавина является глутамин. Однако в клетке глутамин под действием глутаматсинтазы превращается в глутамат. В этой связи, чем ниже активность глутаматсинтазы, тем большее количество глутамина может быть использовано на биосинтез пуринов и рибофлавина. Это объясняет увеличение продукции рибофлавина у мутантов с нарушенной глутаматсинтазой.

Все это, наряду с совершенствованием состава питательных сред и условий культивирования, в настоящее время позволяет получать до 20–25 г/л рибофлавина, как в опытно-промышленных, так и в промышленных условиях.

Аспекты биотехнологического получения витамина В₂ с помощью генно-модифицированного штамма *Bac. subtilis*

Процесс биотехнологического получения рибофлавина можно разделить на несколько стадий:

- ✓ подготовка культуры;
- ✓ приготовление посевного материала;
- ✓ ферментация;
- ✓ выделение и очистка целевого продукта.

В промышленности рибофлавин получают как в результате химического синтеза, так и микробиологическим способом.

При этом химический синтез представляет собой сложный технологический процесс, состоящий из 13 стадий. В данном случае исходным субстратом при получении витамина является *o*-ксилол.

Реакции происходят при высоких температурах (115–120 °С) и высоком давлении (1,5 атм.). Кроме того, в процессе химического синтеза витамина

используются вредные для здоровья вещества (бром, ртуть, концентрированные кислоты и т.п.).

В Японии рибофлавин получают химическим способом из рибозы, а рибозу получают микробиологическим способом, используя мутанты по транскетолазе у бактерий рода *Bacillus*. Микроорганизмы выращивают на питательной среде, содержащей 18–20% глюкозы, с добавками L-триптофана и L-тирозина. Выход рибозы составляет 90–95 г/л.

К продуцентам рибофлавина при микробиологическом способе его получения, имеющим технологическое значение, относят *Eremothecium ashbyii* и *Ashbyii gossypii*, являющиеся паразитами хлопчатника. Для промышленного получения грибов культивируют глубинным способом при температуре 26–28 °С и аэрации.

Максимальное накопление витамина В₂ культурой *Eremothecium ashbyii* достигало 3–5 г/л на 3–5 сутки. Недостатком данного способа получения рибофлавина является нестабильность микроорганизма при хранении. На твердых средах при комнатной и низких температурах и даже в процессе лиофилизации данный продуцент легко теряет способность к сверхсинтезу витамина. В этой связи, для работы с данной культурой требуется постоянная поддерживающая селекция.

Культура *Ashbyi gossypii* более стабильна. При промышленном производстве на средах, содержащих в качестве источника углерода олеиновое, пальмитиновое, стеариновое или соевое масла, а в качестве ростовых факторов кукурузный или дрожжевой экстракты, получали до 6–8 г/л витамина в течение 160 ч. Данный процесс является очень длительным, а среды сложными и дорогостоящими.

В настоящее время в качестве продуцента рибофлавина применяют генно-инженерные штаммы *Bac. Subtilis*, преимуществами которых в качестве продуцента витамина В₂ являются высокий уровень биосинтеза целевого продукта в течение непродолжительного времени на сравнительно экономичных и доступных питательных средах.

Стадии биотехнологического получения витамина В₂

Хранение культуры продуцента и его подготовка

Плазмидный продуцент несет плазмиду *pMX45*, детерминирующую устойчивость к эритромицину. Кроме того, штамм устойчив к хлорамфениколу и стрептомицину.

Важным моментом является изучение стабильности плазмиды.

Проведенные исследования показали, что данная плаزمиды является устойчивой в течение 50 поколений на твердых питательных средах. Единственным условием элиминации плазмиды является повышение температуры выше 45 °С. Плазмиды *pMX45* является термочувствительной.

Длительное хранение культуры продуцента (1 год и более) рекомендуется в лиофильно высушенном состоянии в ампулах.

Рассев штамма и исследование полученных клонов после лиофилизации показали, что лиофильное высушивание не снижает его биосинтетической активности. В случае, если культуру нужно хранить в течение непродолжительного времени, то ее хранят в пробирках со скошенным агаре с антибиотиками. Продуктивность культуры проверяют в колбах с ферментационной средой, содержащей источник углевода (сахарозу или глюкозу), источник азота (мочевину), ростовые факторы (дрожжи, дрожжевой экстракт и кукурузный экстракт), оптимум рН среды составляет 6,8–7,2. Колбы помещают на качалку. Выращивание осуществляют при температуре 40 °С, 180–200 об./мин. в течение 3 суток. По окончании процесса ферментации анализируют биосинтез рибофлавина.

С целью получения рабочей партии косяков культуру пересевают на скошенный агар (состав указан выше) и выращивают в термостате при температуре 37 °С не более 2 суток. Такая культура служит для получения посевного материала.

Приготовление посевного материала

В зависимости от объемов рабочего ферментера посевной материал выращивают сначала в колбах, а затем в посевных аппаратах. Количество посевного материала должно составлять 7–10% от объема среды в рабочем ферментере.

Состав посевной среды для колб и посевного аппарата одинаков и состоит из мелассы, кукурузного экстракта, сульфата аммония, фосфатов калия и антибиотиков. Исходное значение рН среды составляет 7,2–7,4.

Колбы засевают суспензией клеток, полученных смывом с косяков, из расчета 1 мл на 100 мл среды.

Доза засева посевного аппарата 0,1%.

Посевной материал выращивают в течение 18–22 ч при температуре 37 °С и постоянном аэрировании.

Показатели готовности посевного материала: накопление рибофлавина 800–1000 мг/л, не менее 50 клеток в поле зрения под микроскопом при увеличении 900, оптическая плотность при 540 нм равна 13–17, что соответствует максимальной биомассе.

Ферментация

Ферментер должен быть оснащен мешалкой, автоматическими системами термо- и рН-статирования, аэрирования, системой подачи подпитки на протяжении всей ферментации, системами контроля концентраций растворенного кислорода в культуральной жидкости и углекислого газа в отходящем воздухе.

Перед загрузкой питательной среды ферментер, коммуникации и подпиточную емкость стерилизуют паром при 0,15 МПа. Аппарат загружают сте-

рильной питательной средой, а в подпиточную емкость загружается стерильная подпитка.

В состав питательной среды входят высушенная биомасса дрожжей, кукурузный экстракт и фосфаты калия, подпитка содержит источник углерода в виде глюкозы, сахарозы, глюкозной патоки или мелассы с добавками ростовых факторов. Стерильная питательная среда засеивается посевным материалом в количестве 7–10% от исходного объема. Концентрация растворенного кислорода в начале процесса принимается за 100%.

Параметры ферментации:

- температура 37–40 °С;
- аэрация объем воздуха на объем среды в минуту, в конце процесса возможно увеличение подачи кислорода до 1,5 объемов;
- перемешивание переменное, зависит от показания датчика pO_2 ;
- $K_{\text{л}}$ 4,5–6;
- рН-статирование раствором аммиака, или аммиаком в газовом состоянии, и раствором серной кислоты в диапазоне значений рН 6,8–7,5;
- подача пеногасителя по мере необходимости.

В связи с тем, что процесс ферментации происходит в лимите по источнику углевода, последний подается в ферментер на протяжении всей ферментации из подпиточной емкости со скоростью 1–5 г углевода на 1 л среды в час. При этом скорость устанавливается по показаниям датчика растворенного кислорода (не ниже 5%) или концентрации углекислого газа (не более 4%) или по результатам анализа концентрации углевода в культуральной жидкости (0,3–1,0%).

Процесс ведут 50–72 ч до прекращения прироста концентрации рибофлавина, подачу подпитки прекращают, а ферментацию продолжают до полной утилизации углеводов, о чем судят по одновременному повышению значений рН (выше 7,8) и концентрации растворенного кислорода.

В зависимости от используемого источника углеводов конверсия составляет 7–12 % .

Выделение и очистка витамина В₂

Культуральная жидкость после ферментации при биосинтезе витамина В₂ представляет собой сложную физико-химическую систему, в состав которой входят:

- рибофлавин – 20 г/л, в том числе 18–19 г/л в виде кристаллов и 1–2 г/л в растворенном состоянии;
- клетки продуцента занимают объем около 5%;
- нерастворимые компоненты ферментационной среды (дрожжи и др.);
- неорганические соли из компонентов питательной среды, а также из рН-стативирующих растворов;
- органические неиспользованные компоненты среды;
- продукты метаболизма бактерий (ацетоин, диацетил, бутандиол и др.).

Общее количество сухих веществ составляет 10–15 % .

Для снижения концентрации рибофлавина, находящегося в растворенном состоянии, в культуральную жидкость при непрерывном перемешивании без доступа воздуха добавляют гидросульфат натрия (восстанавливающее вещество) в соотношении 1:1 по отношению к рибофлавиному. При этом выпадает осадок зеленого цвета, свойственный лейкофлавиному. Затем суспензию отделяют с помощью сепарации или центрифугирования при температуре 10–15 °С . Фугат сливают в канализацию. Осадок в виде пасты подвергают автолизу, предварительно разбавив его водой. Для этого вносят уксусную кислоту и этилацетат (1,2–1,3 и 0,7–0,8%, соответственно, по отношению к объему осадка до разведения).

Процесс проводят при свободном доступе кислорода при непрерывном перемешивании и температуре 45–50 °С в течение 20–24 ч. При этом лейкорибофлавин окисляется до рибофлавина, что сопровождается переходом зеленой окраски в желтую. После окончания автолиза автолизат разводят водой в 2–2,5 раза по объему до содержания сухих веществ 10–12% водопроводной водой и сепарируют или центрифугируют с целью отделения осадка, содержащего витамин. Осадок рибофлавина высушивают на распылительной сушилке, предварительно разбавив водой до содержания сухих веществ 13–15%. Сушильным агентом служит воздух, нагретый до температуры $190 \pm 10^\circ$. Полученный продукт имеет влажность не более 8% и содержит рибофлавина около 70%.

В случае необходимости получения кристаллического рибофлавина применяют следующий метод его выделения из культуральной жидкости. Вначале кристаллы рибофлавина переводят полностью в растворенное состояние за счет нагревания и добавления концентрированной соляной кислоты. Горячий раствор подвергают фильтрации (микрофильтрации до отделения взвешенных частиц клеток и др.). Фильтрат охлаждают и в случае необходимости добавляют восстановитель. Полученные технические кристаллы (90–95% витамина) подвергают перекристаллизации из раствора соляной кислоты, органических растворителей или воды. В результате получают препарат кристаллического рибофлавина с содержанием основного вещества не менее 98%.

4. Биосинтез витамина В₁₂

В природе витамин В₁₂ и родственные корриноидные соединения находят в клетках микроорганизмов, в тканях животных и некоторых высших растениях (горох, лотос, побеги бамбука, листья и стручки фасоли и т.п.).

Однако происхождение витамина В₁₂ в высших растениях окончательно не установлено.

Такие низшие эукариоты, как дрожжи и мицелиальные грибы, корриноиды, по-видимому, не образуют.

Организм животных не способен к самостоятельному биосинтезу витамина В₁₂.

Среди прокариот способность к биосинтезу корриноидов широко распространена. При этом активно продуцируют витамин В₁₂ представители рода *Propionibacterium*. Природные штаммы пропионовокислых бактерий образуют 1,0–8,5 мг/л корриноидов, хотя получен мутант *P. shermanii* М-82, с помощью которого производят до 58 мг/л витамина В₁₂.

В семействе *Propionibacteriaceae* обнаружены другие представители, способные к накоплению витамина В₁₂ в клетках в больших количествах. К ним, прежде всего, относятся: *Eubacterium limosum* и *Butyribacterium rettgerii*.

В качестве продуцентов витамина В₁₂ практический интерес представляют многие представители актиномицетов и родственных микроорганизмов. Истинный витамин В₁₂ в значительных количествах синтезирует *Nocardia rugosa*. Путем многоступенчатых мутаций и последующего отбора получен штамм *N. rugosa*, накапливающий до 18 мг/л витамина В₁₂.

Кроме того, высокоактивные продуценты витамина В₁₂ обнаружены и среди представителей рода *Micromonospora*: *M. purpureae*, *M. echinospora*, *M. halophitica*, *M. fusca*, *M. chalcaeae*.

Высокой кобаламинсинтезирующей активностью обладают метаногенные бактерии, например, *Methanosarcina barkeri*, *M. vacuolata* и отдельные штаммы галофильного вида *Methanococcus halophilus*. Вид *Methanococcus halophilus* синтезирует более 16 мг корриноидов на грамм биомассы. Такого высокого содержания корриноидов не отмечено ни у одного другого из изученных микроорганизмов. Причина высокого содержания корриноидов у метаногенных бактерий не установлена.

Корриноиды синтезируют строго анаэробные бактерии из рода клостридий. У *Clostridium tetanomorphum* и *Cl. sticklandii* аденозилкобаламин входит в состав ферментных систем, катализирующих специфические реакции изомеризации таких аминокислот, как глутаминовая, лизин и орнитин. При этом в значительных количествах образуют витамин В₁₂ ацетогенные клостридий *Cl. thermoaceticum*, *Cl. formicoaceticum* и *Acetobacter woodi*, синтезирующие ацетат из СО₂.

Известны активные продуценты витамина В₁₂ у псевдомонад, среди которых лучше других изучен штамм *Pseudomonas denitrificans* МВ-2436 – мутант, дающий на оптимизированной среде до 59 мг/л корриноидов.

Кроме того, интерес представляют термофильные бациллы, а именно *Bacillus circulans* и *Bac. stearothermophilus*, которые растут соответственно при температуре 60 и 75 °С и в течение 18 ч культивирования без соблюдения асептических условий дают высокие (2,0–6,0 мг/л) выходы целевого продукта.

Корриноиды синтезируют *Rhodospseudomonas palustris*, фототрофные пурпурные бактерии *Rhodobactersphericus*, *Rh. capsulatus*, *Rhodospirillum rubrum*, *Chromatium vinosum* и ряд других видов.

Значительные количества витамина В₁₂ образует цианобактерии *Anabaena cylindrica*, одноклеточные зеленые водоросли *Chlorella pyrenoidosae* и красные водоросли *Rhodospirillum rubrum*.

1. Биосинтез каротиноидов

Характеристика каротиноидов

Желтые, растворимые в спирте, пигменты осенних листьев Берцелиус в 1837 г. предложил назвать ксантофиллами.

Фреми и Стокс первые показали, что данные пигменты содержатся также в зеленых листьях, хотя такого рода предположение было высказано гораздо раньше в работах, относящихся к 1827 г.

Впоследствии Цвет в своем классическом учении по хроматографическому разделению ксантофиллов листа показал, что они представляют собой сложную смесь полихромов. Результатом этого исследования явилось разделение упомянутых пигментов на два класса: одни из них, хорошо растворимые в углеводородах, были названы каротинами, тогда как за другими гораздо менее растворимыми в этих растворителях, но зато хорошо растворимых в этиловом спирте, сохранилось название ксантофиллы. Эти два класса составили одну группу под общим названием «каротиноиды».

Название каротиноиды было дано данной группе соединений в 1911 г. русским ученым Цветом от латинского наименования моркови – *Daucus carota*, основную часть пигментов которой составляет β-каротин.

За последние 40 лет достигнуты значительные успехи в химии каротиноидов. К настоящему времени число каротиноидов, структура которых точно установлена, увеличилось до 550, причем основные успехи в установлении химического строения каротиноидов следует отнести на период с 1965 по 1975 г. В это время получены принципиально новые данные о каротиноидах, углеродный скелет которых содержит 45 и 50 атомов углерода вместо традиционно известных 40. Открыты гликозидные каротиноиды, содержащие углеводный остаток.

Было установлено, что молекула каротиноидов может включать жирные кислоты, наряду с углеводными остатками, например, миксобактин и миксобактон, являющиеся моноэфирами различных жирных кислот. Позднее подобные каротиноиды, в частности моноэфир капсантина, содержащий ненасыщенную линолевую кислоту, был обнаружен в плодах паприки (*Capsicum annuum* L. var. Sz-20). Эфиры каротиноидов могут содержать и насыщенные жирные кислоты, такие как С₁₂, С₁₄ и С₁₆.

По своим физико-химическим свойствам каротиноиды относят к липидам: к производным изопрена или к группе нейтральных липидов.

Отличие каротиноидов от других пигментных соединений – наличие хромофора с большим числом единичных и двойных связей между атомами углерода. Обычное число двойных связей от 7 до 17. От числа сопряженных двойных связей зависит наличие окраски и ее интенсивности. Каротиноиды,

содержащие до 5 двойных связей (фитоин, фитофлюин), – не окрашены, нейроспорин (7 двойных связей) имеет желтый цвет, β -каротин, ликопин (11 двойных связей), торулин и торулородин (более 11 двойных связей) имеют интенсивный красный или фиолетовый цвет.

Данная многочисленная группа пигментов очень широко распространена в природе: они обнаружены у водорослей, бактерий, грибов, высших растений, животных и человека.

Фотосинтезирующие бактерии образуют широкий круг каротиноидов. У данной группы обнаружено около 60 различных каротиноидов. Однако количество каротиноидов в клетках, в сравнении с другими пигментами, так незначительно, что их называют дополнительными или вспомогательными пигментами.

Специфическими для фотосинтезирующих бактерий *Athiorhodaceae* и *Thiorhodaceae* являются метилоксилированные каротиноиды. Присутствие β -каротина в небольших количествах установлено у *Rhodomicrobium vannielii*. В следовых количествах γ -каротин синтезируют коричневые виды рода *Chlorobium*. Различные виды пурпурных бактерий содержат красные и желтые каротиноиды, главным образом, ликопин, спириллоксантин, родопин, ликопинол и родопинол. Зеленые бактерии образуют преимущественно хлоробактин – 55–93%. Главным компонентом у трех видов *Ectothiorhodospira* является спириллоксантин.

Нефотосинтезирующие бактерии как продуценты каротиноидов менее изучены. Они образуют преимущественно C_{45} и C_{50} каротиноиды. По сравнению с грибами у них меньше распространен β -каротин и другие каротиноиды. Встречаются культуры, синтезирующие большое число ксантофиллов.

Характерным для бактерий является одновременный биосинтез большого набора пигментов каротиноидной и некаротиноидной природы. Так, например, штамм *Corynebacterium fascians* на 1,0 г сухой биомассы содержит 0,5–0,6 мг каротиноидов 13 наименований. У *Micobacterium kansasii* идентифицированы β -каротин, фитоин, фитофлюин, ликопин и α -каротин. У штамма *Mycobacterium rubrum* обнаружены такие каротиноиды, как α -каротин, β -каротин, γ -каротин, ауроксантин, лютеин, криптоксантин, виолоксантин, зеаксантин, антераксантин, ликопин, рубиксантин, лепропротеин, неоксантин.

Спектр пигментов, синтезируемых актиномицетами, очень разнообразен. Способность синтезировать каротиноиды установлена у видов *Streptomyces chestomyceticus* var. *aurantioides*, *Str. mediolani*, *Actinomyces galbus* Frommer, *Act. subflaws*, *Act. Kanamycetiens*, *Act. fluorescens* и т.д. В настоящее время у актиномицетов идентифицированы: β - и γ -каротины, ликопин, тетрагидроликопин и проликопин.

Каротиноиды содержатся во многих мицелиальных грибах. Большинство грибов синтезируют каротиноиды в малых, трудно обнаруживаемых количествах, хотя обнаружены виды, обладающие способностью к сверхсинтезу, применяющиеся в промышленном производстве. Представители различных таксономических групп грибов отличаются по составу и соотношению синтезируемых ими отдельных каротиноидов.

Наиболее распространённый и почти единственным каротином у различных видов *Phycomyces blakesleeanus* является β -каротин. До 75% β -каротина синтезируют грибы пеницилиум; γ -каротин – основной пигмент грибов, относящихся к родам *Chytridrales* и *Blastocladales*. Каротиноиды с α -иононовым кольцом у грибов отсутствуют.

При этом наиболее изученными являются виды *Neurospora crassa*, *Phycomyces blakesleeanus* и *Bl. trispora*. Уровень синтезируемых каротиноидов у мицелиальных грибов зависит от состава питательной среды, условий, способа и времени культивирования.

В сине-зеленых водорослях обнаружены три основных каротиноидных пигмента – β -каротин, эхиненон и миксоксантофилл. У ряда видов *Cyanophyta* содержатся в больших количествах афаницин, зеаксантин и оциллоксантин. Наиболее активными продуцентами каротиноидов среди водорослей являются представители рода *Danaliella*, особенно *D. salina Teod.* В условиях, благоприятных для размножения, виды *Danaliella* образуют преимущественно зеленые пигменты, по составу пигментов они близки к зеленым водорослям. Основными пигментами в ростовой фазе являются хлорофиллы, а из каротиноидов – лютеин, антераксантин, виолаксантин и β -каротин.

Желтая и красная окраска рыб обусловлена ксантофилами – астаксантином, лютеином и тараксантином, большинство из которых присутствуют в этерифицированном состоянии. Особый интерес представляет специфический для рыб каротиноид тунаксантии. Ксантофиллы рыб образуются в их организме из β -каротина.

В организме птиц накапливаются в основном ксантофиллы, а каротин присутствует только в ретине.

Каротиноиды обнаружены и у млекопитающих, в том числе и у человека. Однако в организме человека они не синтезируются, а доставляются с пищей и источником их получения служат высшие растения, водоросли и грибы.

При этом большая часть полученных с пищей каротиноидов накапливается в клетках печени, меньшее количество поступает в почки и надпочечники, селезенку, легкие, желудок и кишечник.

Основными каротиноидами сыворотки крови людей являются ликопин, (каротин и лютеин (0,62, 0,46 и 0,28 мкмоль/л для мужчин и 0,76, 0,58 и 0,27 мкмоль/л у женщин, соответственно).

Биологическая роль каротиноидов

У фотосинтетиков каротиноиды выполняют функции вторичных свето-собирающих пигментов, оказывают фотопротекторный эффект, регулируют процессы фототропизма и фототаксиса.

У нефототрофных организмов основная роль каротиноидов принципиально иная.

Известно, что фотоконтроль биосинтеза данных пигментов широко распространен и свойствен не только высшим растениям, но и низшим эукариотам, особенно грибам.

Предполагают, что, если у растений в регуляции каротиногенеза участвует фитохром, то у большинства грибов фотоконтроль биосинтеза этих пигментов регулируется или дорфиринами, или пигментами флавиновой или каротиноидной природы, способными абсорбировать синий свет.

Наиболее подробно процессы фотоиндукции и фоторегуляции изучены для *Neitrospora crassa*, *Verticillium agaricinum* и *Fusarium aquaeductuum*. Особый интерес представляет *Fusarium aquaeductuum*, так как биосинтез каротиноидов у него является полностью светозависимым. Аналогичным образом у *Aspergillus giganteus mut. alba*, растущего в темноте, каротиноиды не образуются, но освещение синим светом индуцирует процесс каротиногенеза, причем под фотоконтролем полностью находятся такие ферменты, как фитохромсинтетаза, фитохромодегидрогеназа и ликопинциклаза. У *Phycomyces blakesleeanus* синий свет также стимулирует образование каротиноидов, хотя биосинтез данных пигментов протекает и в темновых условиях.

Хотя роль каротиноидов в процессах фоторецепции экспериментально не доказана, считается, что каротиноиды действуют в данном случае, как пигменты антенн фотосинтетиков при фоторецепции, так как передача энергии от каротиноидов к другим пигментам является установленным фактом.

Однако свет может оказывать на организмы и достаточно сильное повреждающее действие.

Каротиноиды обладают способностью «тушить» первые, образованные под действием света, продукты, обладающие повреждающим действием, т.е. воздействовать на синглетный кислород ($^1\text{O}_2$), абсорбировать энергию сенсбилизатора, образуя каротиноид в триплетном состоянии, который рассеивает свою энергию в виде безвредного теплового эффекта. Особый интерес представляют данные о том, что β -каротин может прямо реагировать с перекисными радикалами, участвуя в процессе окисления липидов. Такая возможность была показана еще в 1932 г., когда установили способность β -каротина ингибировать процесс окисления линолевой кислоты. Механизм действия данного пигмента заключается в его способности функционировать в качестве антиоксиданта, выводящего перекисные радикалы из сферы цепных свободно радикальных реакций. Данное свойство каротина зависит от наличия в его молекуле системы конъюгированных двойных связей. Подобное действие могут оказывать и другие каротиноиды, а также ретиноиды.

У грибов каротиноиды выполняют важную функцию – участвуют в репродукции, однако в данный процесс они вовлекаются не на прямую, а связаны с образованием, так называемых, триспорных кислот, действующих как гормоны. Кроме того, установлено, что каротиноиды служат предшественниками биологически активного соединения, общего для грибов и растений, - спорополленина ($\text{C}_{90}\text{H}_{130}\text{O}_{39}$), представляющего собой биополимер поперечносшитых остатков каротиноидов, полученных путем их окислительной полимеризации. Обычно процесс накопления каротиноидов у грибов

предшествует образованию спорополленина в клеточной стенке репродуктивных клеток: зигоспор или аскоспор. Интересно отметить, что в последние годы спорополленин обнаружили и у миксобактерий и фикобионтов, входящих в состав лишайников.

Биологическая роль каротиноидов в организме человека

Каротиноиды являются природными веществами, биосинтез которых осуществляется растениями и некоторыми микроорганизмами. Человек и животные не способны их синтезировать и должны регулярно их получать с пищей, так как каротиноиды выполняют в организме целый ряд жизненно важных функций.

Длительное время считалось, что их основная функция в животном организме обусловлена превращением в витамин А, который участвует в процессах фоторецепции, регуляции пролиферации и дифференцировки клеток. Исходя из этого, биодоступность каротиноидов исследовали на витамин А-дефицитных животных.

В настоящее время убедительно показано, что каротиноиды обладают и другими ценными специфическими свойствами, не связанными с А-витаминной активностью. В живых организмах они действуют как фотопротекторы и антиоксиданты, на молекулярном и клеточном уровне предотвращают трансформации, индуцированные окислителями, генотоксическими веществами, рентгеновским и УФ-излучением. Кроме того, они поддерживают стабильность генома и резистентность организма к мутагенезу и канцерогенезу. Каротиноиды увеличивают иммунокомпетентность и контактное взаимодействие клеток, участвуют в регуляции экспрессии гена коннексина-43; способствуют экономному расходованию антиоксидантных витаминов и ферментов, а также проявляют антистрессорные свойства.

Исследования последних лет показали, что ни один из растительных или животных продуктов не может восполнить дефицит витамина А, поэтому необходим его дополнительный прием.

Механизмы биосинтеза каротиноидов

Согласно современным представлениям, биосинтез каротиноидов включает следующие основные этапы:

1. Образование первичного C₅-предшественника. Стартовым соединением в биосинтезе ликопина является ацетат. Две молекулы ацетил-КоА конденсируются с образованием ацетоацетил-КоА, который, в свою очередь, конденсируется с еще одной молекулой ацетил-КоА, образуя р-гидрокси-р-метилглутарил-КоА. При восстановлении данного соединения образуется мевалоновая кислота (МВК), которая в присутствии АТФ фосфорилируется с образованием пирофосфата МВК. В присутствии АТФ путем декарбоксилирования и дегидрирования пирофосфат МВК превращается в 5-углеродную изопреновую единицу – изопентилпирофосфат.

2. Биосинтез бесцветных C₄₀-соединений из C₅-предшественников. Изопентинилпирофосфат (ИПФ) изомеризуется до стадии диметилалипирофосфата (ДМАПФ). Затем происходит конденсация ИПФ фарнезил пирофосфат, из которого путем последующей конденсации возникает 20-углеродная единица – геранилгеранилпирофосфат, который димеризуется, образуя фитоин (7, 8, 11, 12, 7', 8', 11', 12'-октагидрокаротин) – первый C₄₀-предшественник каротиноидов.

3. Образование каротиноидов путем дегидрирования фитоина, который превращается в фитофлюин. При дальнейшем дегидрировании фитофлюина образуются окрашенные каротиноиды – нейроспорин и ликопин.

4. Этап циклизации.

5. Нейроспорин и ликопин подвергаются последовательной циклизации с образованием полиенов, содержащих α- или β-иононовые кольца.

6. Образование каротиноидов с числом углеродных атомов цепи больше C₄₀ и ксантофиллов.

Методы получения каротиноидов

Ежегодное увеличение объема продукции, производимой пищевой, парфюмерной и фармацевтической промышленностью, где каротиноиды (в основном, β-каротин) используются традиционно в качестве красящих веществ, пищевых и провитаминовых добавок, комплексных витаминных препаратов, а также выявление в последние годы широкого спектра биологической активности каротиноидов, требуют расширения потенциальных источников их получения.

Производство каротиноидов в мире достигает ежегодного объема в несколько сотен тонн.

В настоящее время в зависимости от природы каротиноидов их получают путем химического синтеза, микробиологическим способом или выделяют из растительного сырья.

Получение каротиноидов из растительного сырья

Поскольку в растительном сырье каротиноиды локализируются в клеточных мембранах или находятся в составе клеточных органелл, для их извлечения из биологического материала необходимо нарушить целостность клеток.

Данная цель достигается за счет использования некоторых растворителей (ацетона, бутанола, метанола). При этом очень важен подбор растворителей (или их смеси), обеспечивающий наиболее полный переход в них пигментов.

При экстракции пигментов из разрушенных клеток часто применяют растворители, нарушающие связь пигмента с липидами, например, ацетон, ацетон с петролейным эфиром, этанол с петролейным эфиром.

Затем экстрагированные пигменты переводят в неполярный растворитель (бензол, н-гексан, сероуглерод), добавляя 5–10 %-ный раствор хлорида

натрия или сульфата аммония для устранения образующейся эмульсии. Выделенный таким путем пигмент представляет собой обычно комплекс нескольких соединений, из которого требуемый компонент можно получить осаждением в кристаллическом виде или выделить из общей смеси соединений хроматографически, что гораздо более трудоемко. Отделить разные классы каротиноидов друг от друга можно с помощью бифазного разделения, воспользовавшись различием коэффициентов распределения между полярной и не полярной жидкостями (обычно используют метанол/петролейный эфир).

В проведенной научно-исследовательской работе обосновано использование системы ацетонитрил-гексан для разделения хлорофиллов и каротиноидов. Очевидно, что необходимость извлечения индивидуального компонента из смеси веществ приведет к значительному удорожанию целевого продукта, поэтому в зависимости от целей обычно используют в той или иной мере очищенный экстракт, представляющий собой сумму биологически активных веществ (БАВ).

В промышленном масштабе природное сырье используют при получении ксантофиллов крипто и зеаксантины из кукурузы, астаксантина – из хитинового покрова морских животных и из лососевых рыб, кислот каротиноидного типа: кроцина, кроцетина и биксина – из шафрана и наиболее распространенного на рынке β -каротина – из моркови.

В последние годы начинает уделяться все большее внимание получению β -каротина из зеленых микроводорослей, в частности из вида *Dunaliella salina*. Для обогащения водорослей каротином резко повышают содержание натрия хлорида в среде выращивания. При этом коммерческое получение целевого продукта осуществляется в больших водоемах вблизи соленых озер в местах с высокой солнечной активностью. Данный способ получения каротиноидов применяют в Австралии, Израиле и США.

К преимуществам извлечения каротиноидов из растительного сырья относится их «природное происхождение, хотя получение их экстракционным способом связано с использованием растворителей, которые делают производство в определенной степени токсичным. В этой связи, в настоящее время основные усилия производителей направлены на поиск экстрагентов, которые обладали бы одновременно высокой эффективностью извлечения и безвредностью.

Помимо этого, к недостаткам способа получения каротиноидов из природных объектов можно отнести невысокое их содержание в сырье (0,3–0,4 мг/г сырья), сезонность, воздействие неблагоприятных факторов окружающей среды и фитопатогенов, а также достаточно высокую себестоимость целевого продукта.

Химический синтез каротиноидов

Хотя экстракционный способ получения каротиноидов из биологического материала является наиболее классическим и, в принципе, с него и начи-

налась история выделения каротиноидов, в настоящее время лидирующую позицию на рынке сбыта занимают каротиноиды, получаемые синтетическим путем, в основном из-за их низкой стоимости.

Из всех известных каротиноидов только пять получают в промышленном масштабе путем химического синтеза: β -каротин, кантаксантин, этил-бета-апо-8-каротиноат, бета-апо-8-каротиналь, цитроксантин. В 1950–1960 гг. была разработана методика промышленного синтеза ликопина и зеаксантина. Однако она до настоящего времени не реализована в промышленных масштабах, поскольку не позволяет произвести стабильную форму ликопина, а производство зеаксантина делает дорогостоящим. Этил- β -апо-8-каротиноат и β -апо-8 каротиналь синтезируют в качестве провитаминов А. В конце 1980-х гг. появился спрос и на другие каротиноиды: лютеин, родоксантин и астаксантин. Однако, следует отметить, что пока экономически выгодных технологий их получения еще не создано.

Исходной единицей для синтеза витамина А и каротиноидов служит β -ионон, за исключением кантаксантина, который получают окислением β -каротина, β -ионон, в свою очередь, первоначально выделяли из масла лимонника.

В настоящее время источником получения β -ионона служат ацетон, формальдегид и ацетилен.

Вторым общим для всех производств промежуточным звеном (за исключением фирмы «Hoffman La Roche» при синтезе β -каротина) является этилат ретинола, из которого с помощью определенной последовательности реакций синтезируют каротиноиды.

Не вдаваясь в подробности путей синтеза каротиноидов, отметим лишь общие принципы построения полиеновой цепочки с использованием трех типов реакций:

1. Образование о-связи углерод-углерод и дальнейшее образование л-связи протекает без элиминирования активирующей группы (альдольная конденсация, конденсация Кновенагеля, реакция Реформатского и енолэфирная конденсация).

2. Образование о-л-связи протекает с элиминированием активирующей группы (конденсация по Виттигу, по Хорнеру и при помощи изонитрилов).

3. Введению двойной связи предшествует частичное восстановление о-связи (реакции Гриньяра и Нефа с ацетилидами магния и спиртами).

Хотя получаемые синтетические каротиноиды являются в настоящее время самыми экономичными, их производство не является экологически чистым из-за побочных продуктов синтеза. Кроме того, к основным недостаткам синтетического способа получения каротиноидов относится неспецифичность получаемых продуктов, которые обычно представляют собой смесь цис- и трансформ. Конвертирование цис-форм в транс-формы обычно не представляет труда, поскольку трансизомеры более стабильны. Цис-изомеры при связях 11,12-, 13,14- и 15,15- относительно легко подвергаются изомеризации при нагревании веществ в гексане или гептане или об-

лучении в присутствии каталитического количества йода. Однако, существуют проблемы, связанные со стабильностью цис-9,10-двойной связи. Так, например, при желаемом получении полностью транс-ретинола-ацетата, процентное соотношение транс-формы к 9-цис-изомеру распределяется как 40:60. Изомеризация 9,10-цис-формы обычным путем невозможна, хотя в отдельных случаях она протекает под действием света в присутствии сенситизаторов.

Микробиологический синтез каротиноидов

В настоящее время в качестве продуцентов каротиноидов используют микроскопические грибы, в связи с тем, что они обладают способностью быстро накапливать большое количество биомассы в процессе ферментации и могут расти на относительно доступных и экономичных питательных средах.

Основными каротиноидами грибов, являются β -, γ - и α -каротины, ликопин, нейроспороксантин, астаксантин, кантаксантин, торулин, которые, как считают, принимают участие в процессах фоторецепции и, косвенно, в репродукции в качестве предшественников триспоровых кислот, действующих как гормоны. Содержание каротиноидов в грибах, как правило, слишком низко для коммерческого использования и не превышает 100–800 мкг/г сухого мицелия. Однако, среди грибов обнаружены сверхсинтетики, способные в определенных условиях культивирования значительно увеличивать образование каротиноидов. Наиболее перспективны как продуценты каротиноидов среди грибов представители порядка *Mucorales*: *Bl. trispora*, *Phycomyces blakesleeanus*, *Choanephora cucurbitarum*. В этом отношении среди высших грибов представляют интерес *Aspergillus giganteus*, некоторые виды *Penicillium* и дрожжи рода *Rhodotorula*, например, *R. aurea*, *R. rubra*. Ликопин наряду с (каротином найден у *Ustilago violacea*, кантаксантин – у *Cantharellus cinnabarinus*, астаксантин – у *Phaffia rhodozyma*.

В настоящее время микробиологическое производство β -каротина основано на культивировании гриба *Bl. trispora*.

Еще в 1904 г. было сделано наблюдение, что контактная зона совместно растущих (+) и (-) мицелиев некоторых муконовых грибов отличается ярко-желтым цветом, обусловленным интенсивным биосинтезом β -каротина. Оказалось, что при совместном культивировании (+) и (-) штаммов выход β -каротина возрастает с 5 до 17 раз, в сравнении с количеством каротина, образуемого отдельно растущими штаммами

Промышленное получение β -каротина в СССР микробиологическим способом было налажено в 60-е гг. XX в., благодаря работам таких известных ученых, как профессора И. Самохвалов, М.Н. Бехтерева, академик А.А. Имшенецкий.

Выход β -каротина, образуемого при совместном культивировании (+) и (-) штаммов гриба *Bl. trispora* на сложных природных средах с добавлением

масел и специальных стимуляторов, составляет в настоящее время 2–3,9 г/л среды.

На Екатеринбургском АО «Уралбиофарм» налажено производство β-каротина из биомассы гриба *Bl. trispora*. Штаммы гриба *Bl. trispora* 8А (+) и (-) выращивают на кукурузно-соевой среде с добавлением K_2HPO_4 , витамина В₁ и подсолнечного масла. По окончании ферментации выход β-каротина составляет 0,7–0,9 г/л.

На Днепропетровском крахмало-паточном комбинате производят β-каротин, синтезирующийся при совместном культивировании штаммов K^{1+} и K^{1-} гетероталличного гриба *Bl. trispora*. Для ферментации используется питательная среда, в состав которой входят зеленая патока, кукурузный экстракт и растительное масло. При этом после 96 часов ферментации, максимальный выход β-каротина составляет 3,9 г/л среды.

Стимуляторы каротиногенеза у гриба *Bl. Trispora*

Исследования, проведенные в 50–60-х гг. XX в., позволили обнаружить и выделить соединения, которые образуются при совместном культивировании штаммов *Bl. trispora* и способны к стимуляции биосинтеза β-каротина в отдельно культивируемых (-) штаммах данного гриба.

Данные соединения были названы триспоровыми кислотами (ТСК) А, В и С. Главным компонентом данных соединений является триспоровая кислота. Данные кислоты не включаются в молекулу β-каротина, а только активируют ферменты, контролируемые биосинтез этого пигмента.

Способность к биосинтезу триспоровых кислот в основном обнаружена у (+) и (-) штаммов гриба *Bl. trispora* (около 100 мг/л) при их совместном культивировании. Остальные мукоровые грибы, например, *P. blakesleeanus*, не способны синтезировать более 1 мг/л триспоровых кислот. Обнаружено, однако, что при совместном культивировании (-) штамма *Bl. trispora* и (+) штамма *Cunninghamella japonica*, не способного к биосинтезу каротина, в питательную среду выделяется приблизительно 5–7 мг/л триспоровых кислот. Данный обнаруженный факт, а также другие исследования, проведенные ранее, показали, что биосинтезу триспоровых кислот способствуют взаимодействия специфических предшественников, образуемых отдельно (+) и (-) штаммами *Bl. trispora*. Установлено, что триспорины и 4-гидроксиметилтриспораты стимулируют образование зигифор и биосинтез триспоровых кислот у (+) и (-) штаммов *Bl. trispora*.

Хотя триспоровые кислоты вызывают сильный стимулирующий эффект на выход β-каротина, и несмотря на то, что их использование позволило бы осуществлять процесс ферментации только с одним продуцентом - (-) штаммом, на практике данный способ не получил широкого применения из-за высокой стоимости триспоровых кислот и их нестабильности.

В ходе исследований по стимуляции каротиногенеза обнаружено, что существует еще один стимулятор биосинтеза β-каротина у *Bl. trispora* – β-ионон, схожее по структуре и биологическому действию с триспоровыми

кислотами. Данное соединение, в отличие от триспоровых кислот, не является природным, но широко применяется на практике. Проведенные исследования позволили считать, что β -ионин в клетке грибов связывается с каким-то рецепторным белком и данный комплекс стабилизирует мРНК каротиногенных ферментов.

Кроме того, обнаружено, что кроме триспоровых кислот и β -ионина, биосинтез каротиногенных ферментов обеспечивает витамин А (ретинол).

В отличие от триспоровых кислот, β -ионин действует только на фоне добавления растительного масла. Эффект растительного масла связан с присутствием в нем линолевой кислоты. Ее замена на олеиновую кислоту снижает стимулирующий эффект β -ионина. Известно, что C_{18} -жирные кислоты являются активаторами биосинтеза ряда ферментов и, вероятно, действие β -ионина сочетается с функциями данных ферментов.

Аналогичным образом можно объяснить стимулирующий эффект витамина А, проявляющийся только при введении в питательную среду подсолнечного масла.

Обычно для производства β -каротина в качестве стимуляторов применяют такие более экономически доступные заменители, как: 1,6,6-триметил-1-ацетилциклогексен, лимонен, цитрусовую пульпу или цитрусовое масло. Значительным стимулирующим эффектом обладают ретинол, некоторые ароматические соединения (диметилфталаты, вератрол) и ряд гетероциклических соединений (изониазид, ипрониазид).

Добавки грибной биомассы, полученной при предыдущих ферментациях, также обеспечивают стимулирующий эффект.

В качестве стимуляторов каротиногенеза предложены и другие соединения. Отметим, что общепринято активаторы биосинтеза каротина делить на три группы: триспоровые кислоты, соединения, содержащие β -ионинное кольцо (ретинол, β -ионин), и фенилпроизводные, из которых на практике используют диметилфталат и вератрол.

Кроме того, стимуляторами каротинообразования у *Bl. trispora* являются некоторые амиды, имидазы, лактамы, гидразины, замещенные пиридины, в частности сукцинимид и изоникотиноилгидразин, которые более, чем в 3 раза увеличивают выход β -каротина при совместном культивировании (+) и (-) штаммов *Bl. trispora*.

Мощным стимулятором каротиногенеза являются также барбитураты и некоторые гербициды, например, пропанил-(К-(3,4-дихлорофенил)-пропанамид).

Интересно, что ряд приведенных ниже соединений обнаруживает аддитивный эффект на фоне добавления β -ионина.

Действие перечисленных выше соединений на процесс каротинообразования обусловлено тем, что они выступают как стрессоры, а согласно современным представлениям, совершенно различные по своей природе факторы могут в определенных концентрациях вызывать нарушение гомеостаза и, как следствие, интенсифицировать биосинтез β -каротина.

Получено большое количество научно-обоснованных данных, подтверждающих факт интенсификации процесса биосинтеза каротиноидов под влиянием неблагоприятных факторов окружающей среды. Так, например, у водорослей *Haematococcus pluvialis* каротиноид астаксантин синтезируется в условиях голодания и солевого стресса. Образование каротиноидных пигментов у бактерий рода *Thermits* происходит под влиянием такого стрессового фактора, как интенсивного освещения. Однако, данный способ интенсификации процесса каротинообразования в условиях производственной ферментации связан со значительными затратами и удорожанием себестоимости получаемого целевого продукта. Исходя из этого, более приемлемым представляется способ, в котором воздействию света подвергается только посевной материал.

Важной проблемой при биотехнологическом производстве каротиноидов является окисление конечного продукта. При искусственном стимулировании биосинтеза каротиноидов не в полной мере синтезируются соответствующие природные антиоксиданты типа ренолпроизводных соединений. В этой связи, существует необходимость введения в питательную среду дополнительных неприродных антиоксидантов, стабилизирующих каротинсодержащий мицелий. Достаточно давно для этих целей используется сантохин (β -этокси-1,2-дигидро-2,2',4-три-метилхинолин). Для хранения биомассы стали применять добавки к мицелию сахарозы, карбоксилметилцеллюлозы, крахмала, желатины, при этом стабильный уровень каротина может сохраняться в течение 9–12 мес. при температуре не выше 41 °С. Оптимальные условия введения сантохина – через 40–60 ч от начала ферментации и в течение 3–10 ч от начала термической обработки; антиоксидант вводят в количестве 0,05%.

Несмотря на экологически чистоту производства и на перспективу создания в будущем сверхсинтетиков каротиноидов с помощью методов генной инженерии, в настоящее время основными недостатками микробиологического способа получения каротиноидов являются высокая стоимость питательной среды, наличие в биотехнологическом процессе двух штаммов и необходимость обеспечения высокой стерильности производства.

Таким образом, в заключении, следует отметить, что любой из способов получения каротиноидов (в частности, β -каротина) имеет свои преимущества и недостатки.

В настоящее время ведутся научные исследования, направленные на удешевление и стандартизацию микробиологического способа получения каротиноидов с помощью методов генной инженерии, осуществляемые в двух направлениях:

- 1) гены, контролирующие путь биосинтеза определенного каротиноида, должны быть клонированы в организм, способный к быстрому росту на экологически чистых, доступных и экономичных средах;

- 2) путь биосинтеза каротиноида должен быть изменен в родительском организме так, чтобы превратить его в сверхсинтетика данных пигментов.

Так, например, сообщается о введении в ДНК дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* генов из бактерии *Ervinia uredonova* и *Er. herbicola*, кодирующих биосинтез таких каротиноидов, как β -каротин и ликопин. Кроме этих генов, в эти же клетки введены гены, ответственные за синтез фарнезилдифосфата, как начального субстрата в биосинтезе каротиноидов из производственного штамма *Saccharomyces cerevisiae*. Данный метод позволяет синтезировать 113 мкг ликопина и 103 мкг β -каротина на 1,0 г сухой массы. Однако в настоящее время данные исследования находятся на стадии разработок и трудно предсказать, достигнут ли они уровня биотехнологического производства.

Микробиологический синтез ликопина

В настоящее время ликопин получают экстракцией из растительного сырья и путем микробиологического синтеза.

В 50–60 гг. XX в. была разработана методика химического синтеза ликопина. Однако до настоящего времени она не реализована в производственных условиях, поскольку не позволяет получить стабильную форму ликопина.

Известен способ получения ликопина из кожицы томатов путем экстракции хлористым метилом в присутствии адсорбента. Однако данный метод имеет следующие недостатки: связан с сезонностью, зависит от климатических факторов, грибной инфекции, в частности, урожай томата может быть полностью уничтожен грибом *Phytophthora sp.* При этом выход ликопина незначителен (0,3–0,4 мг/г плодового тела), причем кроме основной формы ликопина на присутствует также неоликопин А и проликопин, что значительно затрудняет очистку целевого продукта. В этой связи, данный способ получения ликопина является экономически нецелесообразным.

Способность синтезировать ликопин обнаружена у разных видов микроорганизмов – бактерий, грибов, актиномицетов.

Характерным для бактерий является одновременный биосинтез большого числа пигментов каротиноидной и некаротиноидной природы. Значительные количества ликопина накапливают пурпурные бактерии (*Thiocystis spp.*), микрококки (*Micrococcus tetragenus*) и микобактерии (*Mycobacterium kanaasli*, *M. lacticorn*). Известен штамм бактерий *M. rubrum*, который на питательной среде с мелассой и кукурузным экстрактом накапливает до 7,05 мг/г суммарных каротиноидов. При этом в пигментном комплексе бактерий помимо ликопина обнаружены α -, β - и γ -каротин, ауруксантин, лютеин, криптоксантин, виолоксантин, зеаксантин, антераксантин, рубиксантин, лепротин, неоксантин.

Процесс накопления ликопина у актиномицетов занимает продолжительное время, например, у *Streptomyces var. rubescens* процесс получения ликопина занимает около 8 суток, что приводит к удорожанию конечного продукта.

Качественный состав пигментов водорослей является таксономическим критерием в систематике данных организмов. При этом наиболее активными

продуцентами ликопина среди водорослей являются *Chara ceratophylla* и *Nittella syncarpa*.

Наиболее изученными грибами, способными синтезировать ликопин, являются виды *Neurospora crassa*, *Phycomyces blakesleanus*, *Bl. trispora*, *Cautharellus cibarius*, *C. infundibuliformis* и *C. lutesceus*.

В настоящее время для получения ликопина микробиологическим способом в качестве продуцентов используют гетероталлические грибы *Bl. trispora*.

Bl. trispora является гетероталлическим грибом порядка *Mucorales*. Гетероталлизм данного гриба выражается в образовании разнополого (+) и (-) мицелия, при слиянии которого образуется зигота. Половое размножение возможно только между разными штаммами. Штаммы не отличаются друг от друга по строению, между ними существуют лишь небольшие физиологические различия. Максимальное количество пигментов синтезируется при совместном культивировании (+) и (-)-форм.

В настоящее время в нашей стране на Екатеринбургском заводе «Уралбиофарм» реализуется технология получения ликопина путем выращивания гриба *Bl. trispora*.

Технология получения ликопина основана на ингибировании процесса циклизации ликопина в β -каротин, в результате путь биосинтеза каротиноидов прекращается на ликопине и не происходит дальнейшего превращения ликопина в β -каротин.

Ингибирование процесса циклизации осуществляют или путем изменения значения рН среды в щелочную сторону или добавлением ингибиторов цикла. Изучение отходов химических и табачного производств показало, что наиболее перспективной является табачная пыль. Действующим началом данного вида отхода является природный азин-никотин и его производные.

Процесс получения ликопина на заводе «Уралбиофарм» осуществляется следующим образом: в ферментер вместимостью 10 м³ загружается 4 м³ питательной среды, содержащей кукурузной муки – 17,3 г/л, соевой муки – 40 г/л, КН₂РО₄ – 0,5 г/л, % масла и 1% табачной пыли. Ферментацию штаммов гриба *Bl. trispora* 8А (+) и (-) ведут в течение 110 ч. При этом выход ликопина составляет 0,49–0,7 г на 1 л культуральной среды (определяется спектрофотометрически).

Исследования показали, что добавление в среду табачной пыли не влияет на параметры ферментации (значение рН среды, накопление биомассы и т.д.), но при этом стимулирует ликопинообразование. После окончания ферментации среду в ферментере подкисляют серной кислотой до значения рН 4,0 и нагревают до температуры 85 °С. Далее отделяют биомассу *Bl. trispora* и после промывки водой до значения рН 7,0 продувают сжатым воздухом и высушивают под вакуумом. Для выделения ликопина из биомассы используют подсолнечное масло.

К недостаткам данного метода можно отнести довольно длительное время ферментации (110 ч), неэффективный способ экстракции ликопина и необходимость добавлять в среду ингибиторы цикла.

Наиболее эффективным стимулятором биосинтеза ликопина у *Bl. trispora* в данном случае является 6-метил-2-аминопиридин. Результаты исследований с циклогексимином и актиномицином D показывают, что данный стимулятор ликопинообразования действует как репрессор гена, регулирующего биосинтез специфических ферментов *de novo*. Действие 6-метил-4-аминопиридина на состав каротиноидов *Bl. trispora* позволяет предположить, что он ингибирует циклазы и некоторые дегидрогеназы и является стимулятором биосинтеза каротиноидных пигментов и их предшественников. Интересно отметить, что некоторые производные пиридина, в частности цикоцел-(2-хлорэтил)-триметиламмоний хлорид, стимулируют также биосинтез ликопина у растений, а никотин значительно интенсифицирует образование данного каротиноида и у *Mycobacterium marinum*. Однако до настоящего времени получение ликопина микробиологическим способом не получило широкого практического применения в крупномасштабных производствах из-за возможного токсического эффекта гетероциклических соединений, используемых в качестве стимуляторов.

Поскольку описанный выше способ микробиологического получения ликопина с помощью штаммов гриба *Bl. trispora* А-732-3(+) и А-732-3(-) или 8А(+) и 8А(-) на кукурузно-соевой среде с добавлением в качестве ингибиторов циклаз соединений класса аминотетрапиридинов или табачной крошки имеет существенные недостатки (недостаточно высокий выход ликопина, токсический эффект гетероциклических соединений), то поиск новых штаммов микроорганизмов-продуцентов ликопина, разработка более эффективного способа получения ликопина, удешевление процесса, а также исключение из среды химических стимуляторов ликопинообразования – производных пиридина, является актуальной задачей.

Разработанная российскими специалистами технология получения ликопина принципиально отличается от существующих в настоящее время тем, что для получения ликопина впервые получена и использована новая пара штаммов гриба *Bl. trispora* ВСБ-129(-) и ВСБ – 130(4-), которая синтезирует ликопин в качестве основного конечного продукта каротиногенеза. Это исключает необходимость добавления в питательную среду химических стимуляторов ликопинообразования.

Выделение β -каротина, ликопина и других жирорастворимых компонентов липидного комплекса *Bl. trispora*

Разработанные способы выделения изопреноидных соединений из биомассы микроорганизмов, как правило, включают следующие технологические стадии: экстракцию, кристаллизацию или осаждение, омыление биомассы или липидов раствором щелочи.

Существует несколько различных методов получения кристаллического β -каротина и ликопина из биомассы микроорганизмов. Первоначально способ получения данных каротиноидов из биомассы продуцента, предусматривал проведение следующих технологических операций:

- ✓ сушку биомассы этиловым спиртом;
- ✓ многоступенчатую экстракцию каротиноидов из неизмельченной биомассы с использованием неполярных органических растворителей – алканов и их хлорпроизводных;
- ✓ отгонку растворителя;
- ✓ охлаждение экстракта и кристаллизацию каротиноидов;
- ✓ разбавление полученной суспензии кристаллов растворителем (ацетоном, метанолом, этанолом), играющим роль высаливающего агента, отделение кристаллов и их промывку, и сушку под вакуумом.

Известно, что каротиноиды в силу своей уникальной химической структуры легко подвержены окислению и изомеризации под действием кислорода воздуха и света. В этой связи, технологический процесс их получения необходимо проводить в мягких условиях и под атмосферой инертного газа, например, азота.

К недостаткам данного метода относятся:

- экстракция каротиноидов из неизмельченной биомассы, и, как следствие, относительно низкая степень извлечения каротиноидов из биомассы в экстракт;
- высокое соотношение растворитель: биомасса, применяющееся на стадии экстракции, что приводит к значительному расходу экстрагента. Высокое соотношение биомасса: экстрагент вызвано тем, что растворимость каротиноидов (β -каротина, ликопина) в большинстве органических растворителей очень низкая, более того при наличии в экстракционной смеси даже небольшого количества воды, растворимость каротиноидов в еще большей степени снижается;
- кристаллизация каротина при пониженной температуре с одновременным высаливанием без дополнительного прогрева перед фильтрацией способствует осаждению примесей липидов биомассы одновременно с целевым продуктом, и, как следствие, значительно снижает качество получаемых кристаллов каротиноидов;
- использование растворителей (хлоралканы, метанол), недопустимых в пищевых продуктах, а также необходимость создания дистилляционного хозяйства для их регенерации.

Известен способ получения кристаллического ликопина из биомассы *Phycomyces biakesleeani* NRRL 1555 (-) и NRRL 1556 (-+), который предусматривает, экстракцию липидов смесью растворителей метанол: гексан (1:1), разделение экстракта водой, выделение примесей и продуктов жизнедеятельности гриба-продуцента в водном слое и выделение кристаллов ликопина фильтрацией и остатка, полученного после упаривания гексанового слоя.

Российскими специалистами предложен способ получения ликопина из биомассы гриб *Bl. trispora*. Разработанный способ включает в себя получение биомассы глубинным культивированием, полученный мицелий гриба расти-

рают, добавляют ацетон, пропускают через фильтр, отделяют разрушенную биомассу и получают раствор ацетона ярко-оранжевого цвета с последующим извлечением из него н-гексаном (более неполярным растворителем) ликопина. Затем полученный экстракт, выпаривают и получают насыщенный раствор, который подвергают дальнейшей очистке.

Недостаток данного способа заключается в низком выходе кристаллического ликопина, использовании смеси растворителей и, как следствие, относительно высокой стоимости конечного продукта.

Данные методы основаны на использовании в процессе экстракции различных органических растворителей, однако, они обладают теми же недостатками, основными из которых является невысокий выход целевого продукта из биомассы.

β -каротин и ликопин имеют наиболее высокие коэффициенты растворимости в неполярных органических растворителях. Вода, содержащаяся в биомассе микроорганизмов, препятствует проникновению неполярного органического растворителя внутрь клеток. В этой связи, с целью достижения более высокой эффективности, в систему вводят полярный растворитель, например, спирт, ацетон или тетрагидрофуран, который сольватирует молекулы воды и способствует образованию гомогенной системы; неполярный экстрагент – вода. Такое технологическое решение имеет и свои недостатки, так как в этом случае в результате процесса экстракции образуется обводненная смесь растворителей, регенерация которой требует дополнительных затрат и специального оборудования.

Значительное увеличение выхода кристаллов ликопина, в сравнении с выше описанным методом, возможно при использовании метода предложенного специалистами ОАО «Уралбиофарм». Высокий выход и качество целевого продукта обеспечивают за счет использования предварительно подсушенной биомассы с влажностью не более 20%. Использование в предложенном способе подсушенной биомассы позволяет экстрагировать ликопин одним неполярным растворителем. Это, во-первых, облегчает процесс экстракции, во-вторых, позволяет исключить стадию регенерации этилового спирта, ацетона или другого полярного растворителя из водного раствора, что в итоге приводит к значительному снижению удельного расхода биомассы, растворителей и энергоресурсов.

Экстракцию ликопина из биомассы проводят неполярным органическим растворителем, например, хладоном-11 при температуре от 20 до 26 °С, этилацетатом – от 45 до 65 °С или подсолнечным маслом – от 80 до 95°С. Кристаллизацию и очистку кристаллов ликопина проводят в среде более полярных органических растворителей, например, ацетоном или этанолом. Применение на разных стадиях технологического процесса растворителей с различной полярностью, позволяет не использовать смеси растворителей на одной технологической операции, и, кроме того, избежать использования стадии хроматографической очистки кристаллов, так как использование растворителей с различной полярностью позволяют получать кристаллы ликопина с содержанием основного вещества 90–95%.

В настоящее время известен способ получения кристаллического β-каротина. Согласно изобретению, описанному в патенте РФ № 2112808, экстракцию β-каротина из биомассы гриба *Bl. trispora* осуществляют растительным маслом. Экстракцию начинают в реакторе в соотношении биомасса: растворитель – 1:3 – 1:15 (масс.) в течение 15–60 мин. и завершают на фильтре тем же растворителем, нагретым до температуры 60–90 °С, затем насыщенные экстракты промывают в этиловом спирте в соотношении 10:1 – 3:1 (об.) при температуре 40–55 °С, кристаллизацию реализуют при 10–20 °С в течение 1–3 суток. После этого полученную суспензию нагревают до температуры 40–60 °С, кристаллы фильтруют, промывают их этиловым спиртом в соотношении 1:3 – 1:2,5 (масс.) при 50–55 °С. Выход β-каротина составляет 25–27%, массовая доля р-каротина 90%. К недостаткам данного способа относятся длительность процессов экстракции и кристаллизации, а также значительный расход растворителя на стадии кристаллизации и не высокий выход кристаллов каротина.

Кроме того, известны способы получения β-каротина, где на стадии экстракции используют полярные растворителя (спирты, кетоны, некоторые неорганические соединения). В этом случае экстракцию липидов из биомассы проводят органическими растворителями или их смесями.

На следующей стадии выделения отфильтрованную мисцеллу подвергают такому воздействию, при котором диэлектрическая проницаемость раствора повышается. В этих условиях по всему объему мисцеллы происходит образование эмульсии, обусловленное выходом из раствора триглицеридного компонента липидного комплекса. Эмульсия представляет собой диспергированные в объеме мисцеллы мельчайшие капли триглицеридов. Растворимость каротина в триглицеридах выше, в сравнении с растворимостью его в мисцелле, вследствие чего он диффундирует из последней в капельки триглицеридов. Данный способ обеспечивает возможность получения препарата с высоким содержанием триглицеридов и каротина с низким содержанием примесей. Однако способ не предусматривает получения очищенных кристаллов каротина, и более того полученный в предлагаемом способе триглицеридный раствор каротина трудно подвергнуть стандартизации по другим компонентам липидного комплекса гриба *Bl. trispora* (стерины, моно- и диглицериды, жирные кислоты), которые также входят в состав «триглицеридного» раствора каротина.

Данные недостатки устраняются в недавнем патенте, полученном специалистами екатеринбургского завода «Уралбиофарм», в котором предложено для обеспечения строгой стандартизации масляного раствора каротина сначала проводить выделение и очистку кристаллов, а на следующей стадии проводить растворение кристаллов в растительном масле. Однако этот способ не предусматривает возможность получения, наряду с кристаллами β-каротина, других биологически активных веществ, входящих в состав биомассы гриба *Bl. trispora*.

В этой связи, необходимо отметить, что существуют технологии, которые позволяют получать из биомассы микроорганизмов как один, так и не-

сколько целевых продуктов. Последние имеют несомненное преимущество, но применимы только к тем продуцентам, которые способны накапливать в своем составе не один, а несколько ценных биологически активных компонентов.

Следует отметить, что все описанные выше способы получения каротиноидов из биомассы гриба *Bl. trispora* предусматривают получение в качестве целевого продукта только β -каротина или ликопина. Однако биомасса данного продуцента и биолипидный комплекс гриба имеют уникальный состав биологически активных компонентов, которые имеют собственные области применения в пищевом производстве, медицине и других отраслях хозяйственной деятельности человека.

Как показали результаты исследований, направленных на изучение липидов данного продуцента, биолипидный комплекс гриба *Bl. trispora* богат целым рядом жирорастворимых физиологически активных компонентов, в котором, кроме β -каротина и ликопина, в большом количестве обнаружены и другие ценные БАВ: широкий спектр фосфолипидов и жирных кислот нормального строения, эргостерин, убихиноны.

Следует отметить, что в составе фракций жирных кислот преобладают наиболее ценные, имеющие важное физиологическое значение, ненасыщенные жирные кислоты:

- олеиновая (30,1%)*;
- линолевая (49,7%)*;
- линоленовая (0,5%)*.

(* Содержание указано от суммы свободных жирных кислот).

Фосфолипиды, содержащиеся в большом количестве в составе биолипидного комплекса гриба *Bl. trispora*, имеют важнейшее физиологическое активное значение. Они, являясь высокоспециализированными липидами, имеют фундаментальное значение, как компоненты клеточных мембран и мембран структурных элементов клеток, например, таких, как митохондрии, и могут быть названы «эссенциальными» (незаменимыми) для роста, развития и надлежащего функционирования всех соматических клеток. Структура и функция клеточных мембран имеют очень важное значение для здоровья человека. Путем введения фосфолипидов возможно влиять на мембранные функции, связанные с мембранными белками, и их исправлять, по крайней мере, в некоторой степени, а иногда – полностью корректировать нарушенную функцию.

Важное физиологическое значение в организме человека имеют убихиноны. Убихиноны играют существенную роль в важнейших физиологических процессах (транспорт электронов, окислительное фосфорилирование), поэтому считают, что они по своей биохимической значимости сравнимы с АТФ, НАД и цитохромами, которые принимают участие в процессах биосинтеза АТФ в клетке и электронном транспорте.

Учитывая такой богатый состав биоллипидного комплекса гриба *Bl. trispora*, российскими специалистами была разработана технологическая схема, позволяющая комплексно перерабатывать липиды гриба и расширить перечень БАВ, которые возможно получить из биомассы данного продуцента. Такое техническое решение обеспечивает, кроме получения дополнительных ценных продуктов, сокращение расхода реагентов на всех стадиях процесса на единицу конечного продукта. Данная технология позволяет получать в едином технологическом процессе несколько ценных целевых продуктов липидной природы: ликопин, β -каротин, убихиноны, эргостерин, фосфолипиды, полиненасыщенные жирные кислоты, а также очищенного от липидов биошрота, как ценной белково-витаминной кормовой добавки в корм сельскохозяйственных животных. При этом достигается более полное использование сырья, что делает данную технологию наиболее конкурентоспособной, за счет снижения себестоимости каждого из получаемых компонентов в отдельности.

Преимуществом разработанной технологической схемы переработки биомассы является то, что в процессе используется только три органических растворителя: ацетон, гексан, этанол. Причем в данной схеме не предусмотрено использование больших количеств смесей растворителей, что значительно облегчает их регенерацию.

Установленные режимы проведения отдельных стадий технологического процесса позволяют максимально извлекать целевые продукты из биомассы продуцента, с наименьшими затратами растворителей, времени и энергоносителей.

Аппаратурная схема процесса включает в основном стандартное химическое оборудование: аппараты с перемешивающими устройствами, роторно-пленочные испарители, емкости для сбор промежуточных продуктов и отстаивания эмульсий, емкостные фильтры для отделения осадка центробежные шестеренчатые и плунжерные насосы. Нестандартное оборудование составляет небольшую часть от общего числа технологического оборудования и включает адсорбционные колонки, дистилляторы жирных кислот и гидрозатворы.