

## Лекция 16

### Селекция продуцентов нуклеотидов, витаминов.

Использование нуклеотидов и их производных, полученных микробиологическим способом. Характеристика микробных продуцентов нуклеотидов. Получение АТФ, НАД и инозиновой кислоты.

Селекция продуцентов витаминов. Характеристика микробных витаминов. Использование бактерий, грибов и дрожжей для создания продуцентов витаминов. Микробиологический синтез витаминов и конструирование штаммов-продуцентов методами генетической инженерии. Витамин В<sub>2</sub> (рибофлавин). Основные продуценты. Схема биосинтеза и пути интенсификации процесса. Микроорганизмы прокариоты - продуценты витамина В<sub>12</sub> (пропионовокислые бактерии и др.). Биотехнологическое производство аскорбиновой кислоты (витамина С). Различные схемы биосинтеза в промышленных условиях.

## 16.1 СЕЛЕКЦИЯ ПРОДУЦЕНТОВ ВИТАМИНОВ

### 16.1. Классификация витаминов

Буквенное обозначение	Химическое название	Активная форма витамина	Лечебный эффект
<i>Водорастворимые витамины</i>			
В <sub>1</sub>	Тиамин	Тиаминпирофосфат (ТПФ), кокарбоксилаза, тиаминтрифосфат (ТТФ)	Антиневритный
В <sub>2</sub>	Рибофлавин	ФМН.ФАД	Витамин роста
Витамин В <sub>3</sub>	Пантотеновая кислота	КоА-SH, дефосфоКоА, 4-фосфопантетеин	Антидерматитный
В <sub>5</sub> (РР)	Ниацин	НАД* и НАДФ*	Антипеллагрический
В <sub>6</sub>	Пиридоксин	Пиридоксальфосфат, пиридоксаминфосфат	Антидерматитный
Витамин В <sub>12</sub>	Кобаламин	Метилкобаламин, дезоксиаденозинкобаламин	Антианемический
С	Аскорбиновая кислота	Аскорбиновая и дегидроаскорбиновая кислоты	Регулятор метаболических процессов, иммуностимулятор
<i>Жирорастворимые витамины</i>			
А	Ретинол	Ретинол/ретиноль	Антиксерофтальмический
Д	Кальциферол	Эргокальциферол	Антирахитический
Е	Токоферол	α-, γ-, δ-, β-токоферолы, токотриснолы	Антиоксидантный
К	Филлохинон	Дифарнезилнафтохинон	Антигеморрагический

**Витамины** - низкомолекулярные органические вещества, обладающие биологической активностью. В природе источником витаминов являются растения и микроорганизмы. В промышленности витамины получают в основном химическим синтезом. Однако микробиологическое производство этих соединений также имеет место. Так, например, менахиноны (**Менахинон** — общее название производных витамина К<sub>2</sub>. Существует с короткой и длинной цепью углеродных звеньев боковой цепи радикала) и кобаламины - продукт исключительно микробный.

**Микробиологическим путем получают всего несколько витаминов:** В<sub>12</sub> (цианокобаламин), В<sub>2</sub> (рибофлавин), витамин С и эргостерин.

Довольно перспективно микробиологическое получение биотина, используемого в животноводстве как кормовая добавка. В настоящее время биотин получают путем химического синтеза, хотя в результате образуется рацемическая смесь, а биологической активностью обладает лишь D-форма витамина, которую синтезируют микроорганизмы.

Научные исследования последних лет показали не только высокую биологическую активность витаминов, но и то, что, как правило, этой активностью обладают не сами витамины, а их производные — коферменты, которые нашли широкое применение в медицинской практике.

Если говорить о производстве основной части витаминной продукции, то ведущее положение здесь занимают химические методы, но в ряде производств в качестве их полноправного конкурента как в нашей стране, так и за рубежом, выступают биотехнологические методы, использование которых более предпочтительно в связи с ужесточением экологических требований к фармацевтическому производству. Кроме того, при применении биотехнологических методов появляются возможности сокращения части стадий химического синтеза за счет использования высокоактивных штаммов микроорганизмов-продуцентов. Например, производство витаминов В<sub>12</sub>, В<sub>2</sub>, В<sub>3</sub> и D (эргостерина) осуществляется в одну стадию. Также микроорганизмы нашли свое применение и в синтезе витамина С, убихинонов, каротиноидов.

### 16.1.2. Селекция продуцентов витамина В<sub>12</sub> (кобаламин)

Мировая продукция витамина В<sub>12</sub> составляет 9-11 тыс. кг в год. Из них около половины используется на медицинские цели, остальное количество - в животноводстве как кормовые добавки.

Природные продуценты витамина В<sub>12</sub> обнаружены среди пропионовокислых бактерий р. *Propionibacterium*, которые синтезируют от 1 до 8 мг/л этого витамина. С помощью селекционно-генетических методов получен мутант *P. shermanii* М-82, который дает до 60 мг/л продукта. Продуцент *B. rettgerii* также используется для микробиологического синтеза В<sub>12</sub>.

Как активные продуценты витамина В<sub>12</sub> используются также актино- мицеты и родственные микроорганизмы: путем мутаций и ступенчатого отбора получен штамм *Nocardia rugosa*, накапливающий до 18 мг/л В<sub>12</sub>. Активные продуценты В<sub>12</sub> обнаружены среди представителей *Micromonospora*.

Высокой природной продуктивностью обладают представители метанотрофов *Methanosarcina*, *Methanococcus*, среди которых выделен штамм *Methanococcus halophilus*, обладающий самым высоким среди природных штаммов уровнем продукции - 16 мг на 1 г биомассы. В значительных количествах В<sub>12</sub> синтезируют анаэробные бактерии р. *Clostridium*, что особенно эффективно для технологии.

Известны активные продуценты В<sub>12</sub> среди *Pseudomonas*. У *P. denitrificans* получен мутант, дающий на оптимизированной среде до 59 мг/л. Штамм запатентован фирмой «Merck» для промышленного получения В<sub>12</sub>.

Интерес представляют термофильные бациллы *B. circulans* и *B. stearothermophilus*, которые дают выход 2-6 мг/л В<sub>12</sub>.

В России наиболее широкое применение имеют *Propionibacterium freudenreichii*. Их культивируют на кукурузном экстракте и глюкозе в анаэробных условиях 72 ч для роста культуры. Во 2-й фазе синтеза в ферментер вносят предшественник - специфическое азотистое основание и проводят ферментацию еще 72 ч. Затем экстрагируют В<sub>12</sub> из биомассы бактерий и очищают его химическим способом. Такой витамин применяют в медицинских целях.

Для нужд животноводства  $V_{12}$  получают с использованием смешанной культуры, содержащей бактерии *Methanosarcina barkeri*, *Methanobacterium formicum*. Содержание  $V_{12}$  в культуре достигает 6,5 мг/г сухой биомассы.

В настоящее время витамин  $V_{12}$  получают чисто биотехнологическими методами. Витамин выявляется производным внутреннего кобальтового комплекса нуклеотида бензимидазола и макроциклической корриновой системы. Способность синтезировать соединения корриноидной природы широко распространена среди прокариотических микроорганизмов. Так, некоторые мутантные штаммы пропионовых бактерий из рода *Propionibacterium* способны продуцировать свыше 50 мг витамина  $V_{12}$  на 1 л среды, а в присутствии его предшественника 5,6-диметилбензимидазола (5,6-ДМБ) накапливать до 200 мг на 1 л культуральной жидкости. Культивируют продуценты витамина  $V_{12}$  на средах, приготовленных из пищевого сырья (кукурузный и мясной экстракты, соевая и рыбная мука). В настоящее время успешно ведется поиск активных продуцентов, образующих достаточное количество витамина на средах, из непищевого сырья, когда в качестве источника углерода и энергии используются изопропиловый спирт, метанол и др. Пропионовые бактерии выращивают периодическим методом в анаэробных условиях на среде, содержащей кроме пищевого сырья глюкозу, соли кобальта и сульфат аммония.

В процессе ферментации образуются кислоты, которые затем нейтрализуют, непрерывно подавая в ферментер раствор щелочи. Через 72 ч после начала ферментации в питательную среду вносят предшественник (5,6-ДМБ), так как без добавления последнего вместо витамина  $V_{12}$  синтезируются фактор В (кобинамид) и не обладающий терапевтическим эффектом псевдовитамин  $V_{12}$ , у которого азотистым основанием служит аденин. Общее время ферментации — 6 сут. По ее окончании витамин  $V_{12}$  остается в клетках бактерий, т.е. в биомассе, которую далее сепарируют, а целевой продукт экстрагируют подкисленной водой.

Необходимо отметить, что в качестве новых перспективных разработок создан высокопродуктивный штамм *Propionibacterium argi*, способный в отличие от ранее известных продуцентов выделять витамин В<sub>12</sub> в культуральную среду. Для предотвращения образования коферментной формы витамина В<sub>12</sub> в качестве стабилизатора добавляют нитрит натрия. Далее следуют стандартные стадии выделения и очистки, поэтому подробно на них останавливаться не будем. Полученный продукт используется для изготовления разных лекарственных форм препарата и в производстве поливитаминных препаратов.

### ***16.1.3. Селекция продуцентов рибофлавина***

Рибофлавин (витамин В<sub>2</sub>) в природе продуцируется растениями, дрожжами, мицелиальными грибами, а также некоторыми бактериями. Среди прокариот известными продуцентами флавинов являются микобактерии и ацетобутиловые бактерии. Из актиномицетов - *Nocardia eritropolis*. Среди мицелиальных грибов - *Aspergillus niger* и *Eremothecium ashbyi*.

Благодаря именно микробному биосинтезу рибофлавина в желудочно-кишечном тракте жвачные животные не нуждаются в этом витамине. У человека синтезирующихся флавинов недостаточно для предупреждения гиповитаминоза.

Витамин В<sub>2</sub> хорошо растворим в воде, устойчив в кислой среде, но легко разрушается в нейтральной и щелочной средах, а также под действием УФ-облучения. Для этого витамина характерно функционирование в коэнзимных формах: флавиномононуклеотид (ФМН) и флавиноадениндинуклеотид (ФАД). Именно на примере выделения рибофлавина в культуральную жидкость было открыто явление сверхсинтеза. При промышленном получении рибофлавина используют культуры дрожжеподобных грибов *Eremothecium ashbyii* и *Ashbya gossypii*, синтезирующих до 3,8 и 6,4 г/л рибофлавина соответственно.

Однако серьезным недостатком этих культур является их нестабильность при хранении на твердых средах во всем диапазоне температур — от комнатной до температуры лиофилизации, в результате чего они теряют способность к сверхсинтезу рибофлавина. Поэтому для сохранения активности штамма приходится систематически проводить рассев на твердые среды, отбирая колонии с высокой активностью.

Сейчас вместе с вышеуказанными культурами при промышленном получении рибофлавина в помощь методов используется мутантный штамм продуцент *Bacillus subtilis* с нарушенной регуляцией синтеза витамина В<sub>2</sub>. Этот штамм устойчив к наиболее сильному антиметаболиту рибофлавина — его аминоксиму розеофлавинолу и обладает способностью к сверхсинтезу витамина В<sub>2</sub>. При культивировании его на среде с мелассой и дрожжевым экстрактом в культуральной жидкости накапливается 3,5 — 4,5 г/л рибофлавина. При этом время ферментации сократилось в 3 раза. Рибофлавин получают и химическим методом, используя в качестве биокатализатора сухие клетки брeвибактерий. Причем, если биосинтез с нативными клетками занимает несколько суток, то при биосинтезе с суспензией сухих клеток время синтеза ФАД составляет всего 15 — 17 ч.

Рибофлавин микробиологического производства используется исключительно как кормовая добавка в животноводстве. Основным продуцентом кормового рибофлавина является *Eremothecium ashbyi*, который культивируют на кукурузной или соевой муке с минеральными добавками. Культивирование ведут до появления спор. Его лучшие продуценты, полученные с помощью мутаций и ступенчатого отбора продуцируют до 600 мг/л продукта. Затем культуральную жидкость выпаривают и используют в виде порошковой добавки к кормам в животноводстве.

#### **16.1.4. Витамин В<sub>3</sub> (пантотеновая кислота)**

В основном в условиях промышленного производства пантотеновую кислоту получают методом химического синтеза. Наиболее важной коферментной формой витамина В<sub>3</sub> является кофермент ацетилирования (КоА). Способностью продуцировать в значительных количествах КоА обладают многие микроорганизмы, в частности актиномицеты. Активно внедряются в промышленное производство способы получения пантотеновой кислоты и ее структурных компонентов из *p*-аланина и пантотеата калия с помощью иммобилизованных клеток бактерий, а также достигнуты существенные успехи при получении КоА с использованием мутантных штаммов *Brevibacterium ammoniagenes*, которые позволяют получать КоА в количестве до 3 г на литр.

#### **16.1.5. Витамин РР (никотиновая кислота)**

Одним из наиболее распространенных биотехнологических способов получения коферментной формы никотиновой кислоты — никотинамидадениндинуклеотида (НАД) является выделение (экстракция) его из микроорганизмов, как правило, из пекарских дрожжей. Для повышения содержания НАД в дрожжевых клетках культивирование проводят на средах с предшественниками синтеза никотиновой кислоты. Так, при добавлении в среды культивирования аденина или самой никотиновой кислоты получают до 12 мг НАД на 1 г клеток (по сухой массе). Использование мутантных штаммов *Brevibacterium ammoniagenes* с одновременным изменением проницаемости мембраны клеток микроорганизмов (коферменты через биомембраны не проникают) с помощью поверхностно-активных соединений (цетилсульфата натрия, цетилпиридина хлорида) позволяет получать НАД до 6 г/л.

### 16.1.6. Аскорбиновая кислота (витамин С)

Аскорбиновая кислота в мировом промышленном производстве витаминной продукции в целом занимает наибольшую долю — около 40 тыс. т в год. Ее синтез был разработан швейцарскими учеными А. Грюсснером и С. Рейхштейном в 1934 г. и используется до настоящего времени. Синтез аскорбиновой кислоты является многостадийным химическим процессом, в котором только одна стадия представлена биотрансформацией. Эта стадия трансформации d-сорбита в L-сорбозу при участии ацетатных бактерий. Для получения сорбозы используют глубинную ферментацию, когда культуру продуцента *Glucanobacter oxydans* выращивают в ферментерах периодического режима с мешалкой и барботером для усиления аэрации и массообмена в течение 20 — 40 ч с результатом по выходу сорбозы до 98% исходного количества сорбита в среде. Обычно для достижения такого высокого выхода целевого продукта в питательную среду вносят кукурузный или дрожжевой экстракт в количестве около 20%. По окончании ферментации сорбозу выделяют из культуральной жидкости. Помимо оптимизации среды можно совершенствовать и технологическую аппаратуру. Например, переход от периодического культивирования продуцента *Glucanobacter oxydans* к непрерывному в аппарате колоночного типа увеличивает скорость образования сорбозы в 1,7 раз.

В настоящее время широкое использование биотехнологических процессов позволяет совершенствовать синтез аскорбиновой кислоты, сокращая многостадийные и дорогие химические стадии. Например, синтез витамина С осуществляют енолизацией его важнейшего промежуточного продукта — 2-кето-бета-гулоновой кислоты, которую, в свою очередь, получают методом двухстадийного микробиологического синтеза, состоящего из окисления d-глюкозы в 2,5-дикето-глюконовую кислоту (2,5-ДКДГК) и биотрансформации последней в 2-кето-L-гулоновую кислоту (2-КГК).

Основными продуктивными микроорганизмами, обеспечивающими процессы окисления d-глюкозы в 2,5-ДКДГК и восстановление последней до 2-КГК, являются мутантные штаммы *Erwinia punctata* и *Corynebacterium* sp., при использовании которых выход целевого продукта составляет около 90 % количества глюкозы.

Однако данная технология имеет существенные недостатки, так как при совместном культивировании продуцентов происходит ингибирование синтеза 2-КГК. Поэтому культуральную жидкость после выращивания продуцента 2,5-ДКДГК стерилизуют, применяя поверхностно-активные вещества (ПАВ), что позволяет значительно сократить потери при получении гулоновой кислоты.

Существует и другой биотехнологический способ получения гулоновой кислоты, основанный на синтезе этого продукта штаммом микроорганизмов рода *Glucanobacter* из сорбозы.

#### ***16.1.7. Убихиноны (коферменты Q)***

Убихиноны в последнее время вызывают интерес как перспективные лечебные препараты. С одной стороны, они синтезируются в организме животных и человека, делая необязательным их поступление с пищевыми продуктами, что отличает их от группы витаминов.

С другой стороны, недостаток убихинонов ведет к нарушениям в обменных процессах, характерных для проявлений недостаточности витаминов групп В и К. Убихиноны являются регуляторами тканевого дыхания, окислительного фосфорилирования в цепи транспорта электронов и за счет высокой специфичности проявляют свой регуляторный эффект.

С практической стороны наибольший интерес вызывают высшие гомологи: убихинон-9 ( $\text{KoQ}_9$ ) и убихинон-10 ( $\text{KoQ}_{10}$ ). Убихинон-10 является коферментом организма человека, вследствие чего на его основе создан лекарственный препарат *Ubichynon compositum*, проявляющий общетонизирующее, антиоксидантное и иммуностимулирующее действие.

В производстве убихинонов применяются биотехнологические методы, в основе которых лежит экстракция КоQ из биологического материала. В промышленном производстве убихинонов в качестве субстрата используются как растительные ткани (каллус риса или опухолевые ткани *Carthamus tinctorius*), так и микроорганизмы с высоким содержанием убихинонов, например дрожжи *Cryptococcus curvatus* и грибы *Candida maltosa*.

В настоящее время используется биотехнология получения убихинона-9 и эргостерина из микробных липидов, являющихся побочным продуктом крупного производства белково-витаминного концентрата при выращивании грибов *Candida maltosa*.

Установлено, что биомасса уксуснокислых бактерий (*Gluconobacter oxydans*), которые используются в производстве аскорбиновой кислоты на этапе окисления d-сорбита в L-сорбозу, содержит значительное количество КоQ<sub>10</sub> без примеси его гомологов. Причем, с одной стороны, эта биомасса является отходом производства аскорбиновой кислоты, с другой стороны, штаммы *Gluconobacter oxydans* в биомассе характеризуются наибольшей окислительной активностью по сорбиту. Этот уникальный факт позволил разработать и внедрить совместную технологию получения L-сорбозы и экстракции убихинона-10 из отсепарированной биомассы с последующей очисткой и с выходом целевого продукта до 85 %.

### ***Селекция продуцентов эргостерина***

Эргостерин - исходный продукт производства жирорастворимого витамина D<sub>2</sub>. Эргостерин является также основным стеринном дрожжей, поэтому данные микроорганизмы - основной источник для селекционных работ. Так, *Saccharomyces carlbergensis* дает до 4,3 мг/л, *S. ellipsoideus* - мг/л, *Rhodotorula glutinis* - 1 мг/л, *Candida utilis* - 0,5 мг/л продукта.

Наиболее широко в производстве используют дрожжи *Saccharomyces carlbergensis*, а также *S. cerevisiae*.

В последние годы появились сообщения о промышленном производстве витамина С. Сообщается о конструировании генно-инженерными методами продуцента: гены *Corynebacterium* перенесли в *Erw. herbicola*. В рекомбинантном штамме объединены способность эрвиний превращать глюкозу в глюконовую кислоту со способностью коринебактерий превращать последнюю в гулоновую кислоту, которую химическим способом превращают в аскорбиновую кислоту.

Убихиноны - витаминоподобные соединения. Продуценты - *Rhodopseudomonas gelatinosa* (1510-2450 мкг/г сухого вещества).

## 16.2. СЕЛЕКЦИЯ ПРОДУЦЕНТОВ НУКЛЕОТИДОВ

Нуклеотиды и их производные имеют широкий спектр применения:

- 1) как вкусовые добавки (пищевая промышленность);
- 2) как лекарственные средства;
- 3) в исследовательских целях.

Микробиологический синтез нуклеотидов пока не находит широкого применения и имеет довольно ограниченные масштабы. Однако имеются сведения о разработках в этом направлении. Так, бактерии *Br. ammoniagenes* и пекарские дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* способны продуцировать на средах с адениозином значительные количества АТФ и АДФ за счет ферментативного фосфорилирования. В случае внесения аденина как субстрата реакции по типу аэробной ферментации *Br. ammoniagenes* продуцируют высокоактивную АМФ. Микробиологический синтез НАД осуществляют культивированием *Br. ammoniagenes* с внесением предшественника реакции. За 48 ч культивирования выход продукта составляет 2 мг/мл продукта. Синтез инозиновой кислоты - предшественника важнейших пуринов - осуществляют из микроорганизмов родов *Flavobacterium*, *Serratia*, *Pseudomonas*. Синтез гуанозинов - на основе *Br. ammoniagenes* и *Streptomyces adepospholyticus*.

Характерной особенностью микробного синтеза нуклеотидов является внесение метаболического предшественника в среду для культивирования продуцента.

Получение АТФ и АДФ осуществляют 2-мя путями. Первый основан на использовании в качестве продуцента *Br. ammoniagenes*, который осуществляет реакцию фосфорилирования АМФ или аденозина. Штамм культивируют на среде с высокой концентрацией глюкозы, мочевины, дрожжевого экстракта и минеральных добавок. В процессе культивирования вносят аденозин, который подвергается ферментативному фосфорилированию с образованием АМФ. При аналогичных условиях и внесении в среду гуанозина можно получить ГМФ.

Примером микробного синтеза АДФ может служить работа продуцента *S. cerevisiae*, которые осуществляют фосфорилирование АМФ с последовательным синтезом АДФ, а затем по мере истощения глюкозы в среде - АТФ. На выход продукта существенное влияние оказывает концентрация фосфатов.

Коринебактерии используют для синтеза АТФ аденин в реакции N-рибозидации. Процесс протекает с добавлением предшественника как обычная аэробная ферментация. На 1-м этапе происходит синтез АМФ из аденина при участии ФРПФ. На 2-м и 3-м этапах – АДФ и АТФ при участии P-5-Ф.

Продуцентом НАД является *Br. ammoniagenes*. Микробный синтез на его основе осуществляется в присутствии никотиновой кислоты или никотинамида – на средах, содержащих глюкозу, мочевины, дрожжевой экстракт и минеральные добавки. Штамм культивируют и на вторые сутки вносят предшественник. На пятые сутки культура накапливает НАД и вступает в стационарную фазу роста.

Для получения НАДФ используют штамм *Proteus mirabilis*. На его основе получают ферментный препарат из клеточного экстракта, вносят НАД, никотинамид, ацетатный буфер, цинк, проводя ферментативную реакцию.

Инозиновая кислота является метаболическим предшественником синтеза пуринов. Поэтому для ее микробиологического получения используют продуценты, несущие мутации, блокирующие ее дальнейшие превращения. Реакцию так же, как и в предыдущем случае, проводят наполовину микробиологическим, наполовину химическим синтезом: субстратом служит инозин, источником фермента клеозидфосфаттрансферазы, который фосфорилирует инозин – штаммы *Flavobacterium*, *Serratia*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*.

Наиболее продуктивен штамм *Pseudomonas trifolii*. Культуру предварительно выращивают на глюкозе и в качестве ферментного препарата используют живые или лиофилизированные клетки. Реакцию проводят в ацетатном буфере (рН 4,0) в присутствии ионов цинка или меди. Наиболее важным фактором, определяющим активность реакции, является концентрация донора (фосфор) и акцептора (инозин), а также количество клеток культуры. При оптимальном соотношении культура способна фосфорилировать до 90 % инозина в реакционной смеси.