

Российский университет дружбы народов
Медицинский институт
Кафедра Общей фармацевтической и биомедицинской технологии

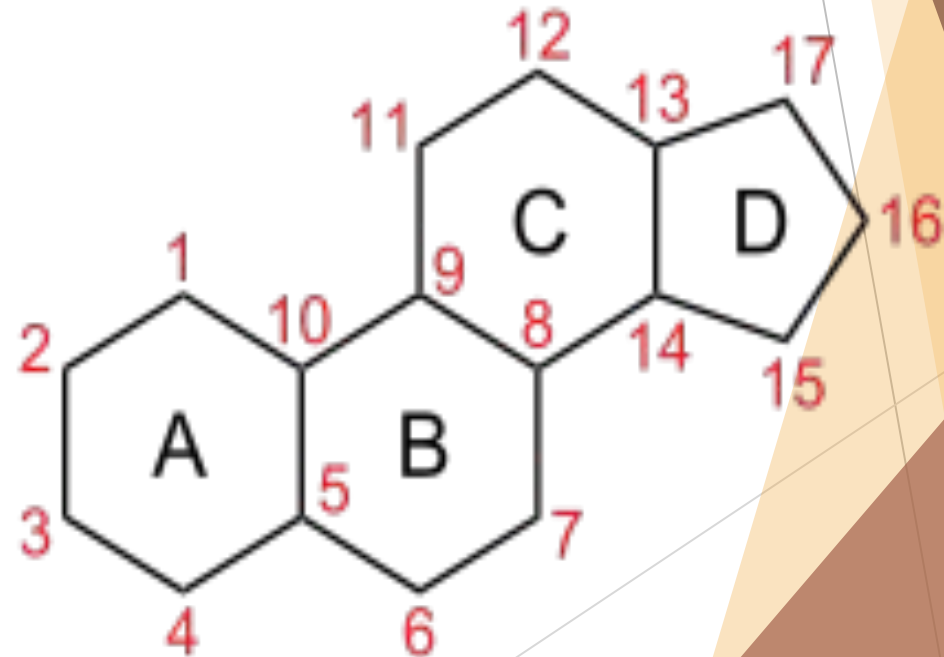
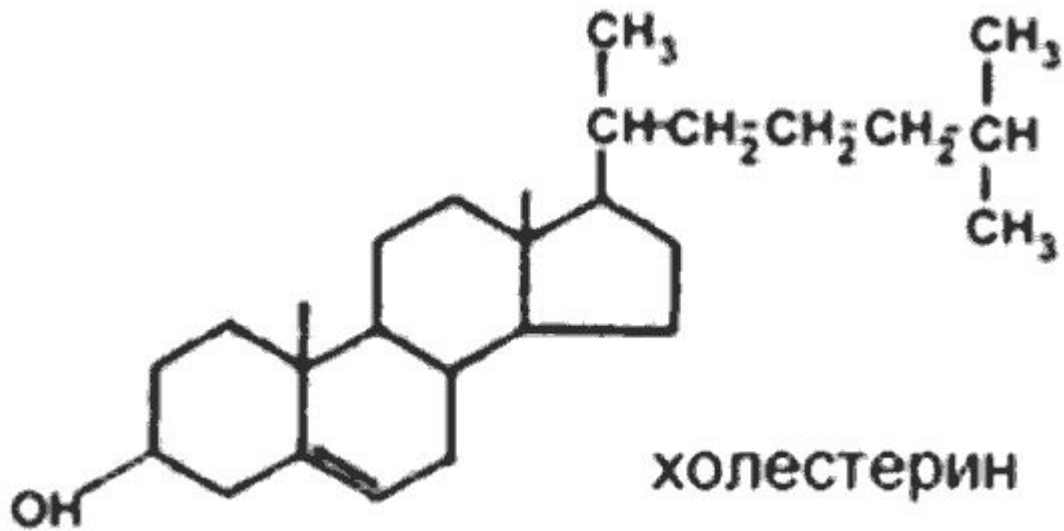
Биотехнология стероидов и витаминов

Ассистент: Крецу Анна Юрьевна
Москва 2014

Стероиды

К стеринам (стеролам) относятся стероиды, несущие в положении С-3 гидроксильную группу.

▶ Циклопентанпергидрофенантрен



Гормоны - это БАВ, выделяемые железами внутренней секреции и являющиеся регуляторами обмена веществ.

► По химической природе:

1. Полипептидные (белковые):
поджелудочная железа,
гипофиз, паращитовидные
железы
2. Аминокислотные: щитовидная
железа
3. **Стероиды** - производные
холестерина

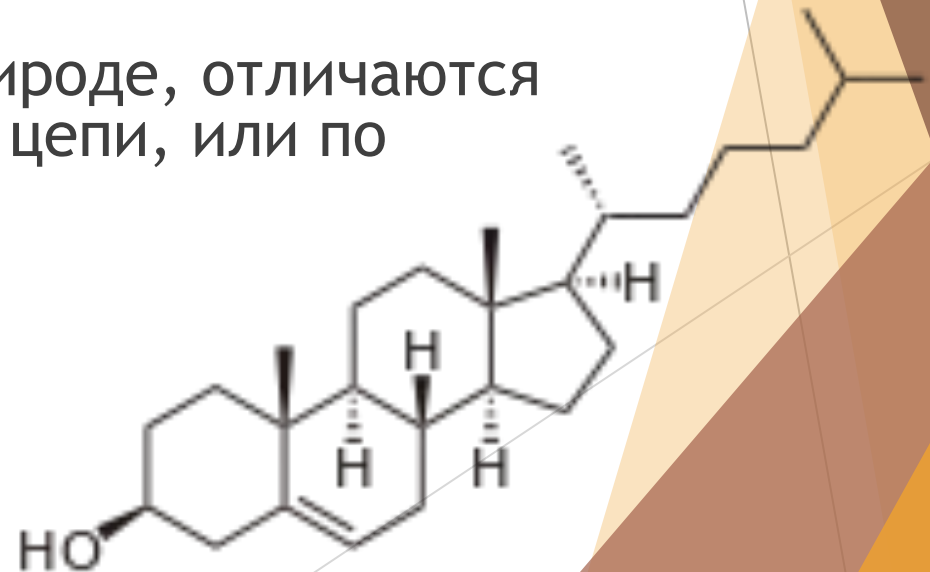
- По способу получения:

1. Рекомбинантные (генно-инженерные)
2. Химически синтезированные
3. Микробиологическая трансформация

Действие:

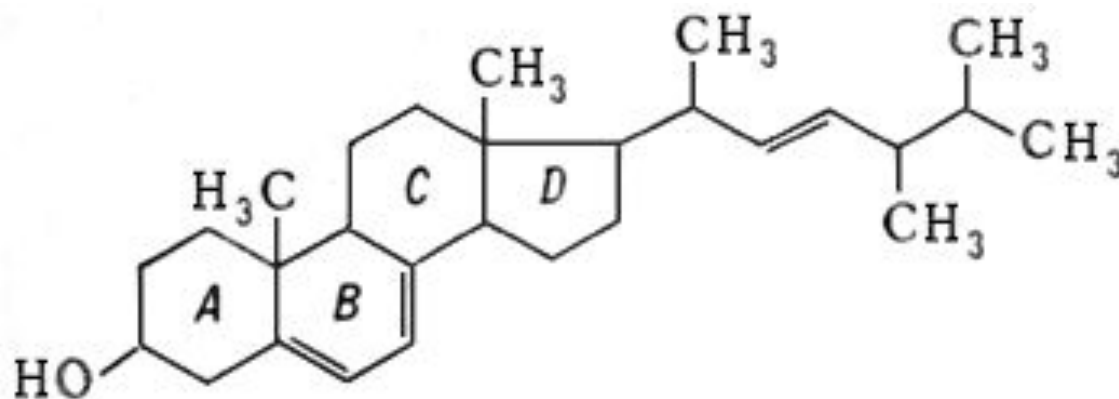
Противовоспалительное,
анаболическое, диуретическое,
контрацептивное (КОК),
противоопухолевое,
противошоковое

- ▶ **Холестерин** (класс зоостеринов), $C_{27}H_{46}O$. Обнаруживается почти во всех органах и тканях животных и человека. Желчные камни человека на 99% состоят из холестерина, богаты этим соединением надпочечники и другие органы. Спинной мозг и мозг рогатого скота представляет собой наилучший материал для промышленного получения холестерина. Он считался специфическим животным стеринном до тех пор, пока он не был обнаружен в некоторых растениях и в морских красных водорослях. Структурная формула была установлена в 1932 г., хотя впервые он был выделен из желчных камней в 1782 г.
- ▶ Другие стерины, встречающиеся в природе, отличаются от холестерина или по длине боковой цепи, или по степени насыщенности.

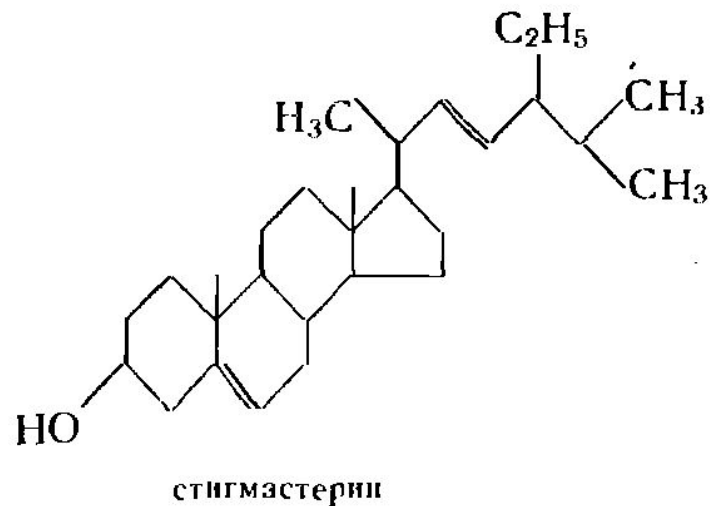


Стерины растений (фитостерины)

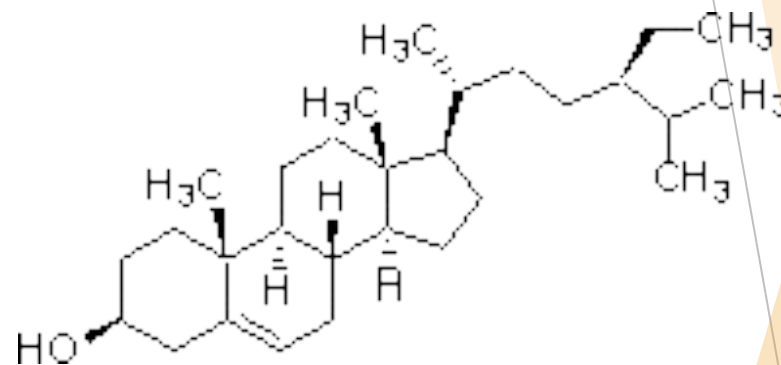
- ▶ Эргостерин по структуре отличается от холестерина дополнительной метильной группой в боковой цепи при C-24, а также имеет две дополнительные двойные связи: одна из них при C-7, другая в боковой цепи при 22- и 23-углеродных атомах. Эргостерин является провитамином витамина D. Строение эргостерина было установлено в 1934 г.
- ▶ Пекарские дрожжи, содержание эргостерина в них колеблется в зависимости от расы, питательной среды и культивирования от 0,2 до 15% на сухую массу.



- Стигмастерин $C_{29}H_{48}O$ содержится в большом количестве в соевом масле и сахарном тростнике. По структуре стигмастерин отличается от холестерина наличием двойной связи между 22 и 23-углеродными атомами и наличием этильной группы в положении 24.



- ▶ Ситостерин $C_{29}H_{50}O$. В хлопковом и соевом маслах, в зародышах пшеницы и натуральном каучуке, в сахарном тростнике и другом растительном материале. Коммерческим источником ситостерина чаще всего являются тростник и хлопковое масло. Ситостерин и стигмастерин - наиболее перспективные и дешевые исходные продукты для получения стероидных гормонов.



- ▶ Стерины необходимы для осуществления физиологических и биохимических функций живого организма. Предполагается, что стерины требуются для образования мембранных систем, клеточных оболочек и других структурных образований клетки. Есть данные о том, что стерины являются защитным фактором против токсического действия многих природных соединений.

- ▶ В основе истории синтеза стероидных гормонов лежат методы биотрансформации, результатом применения которых является превращение метаболитов в структурно родственные соединения под влиянием микроорганизмов или микробных клеток. В этом процессе весьма существенно, что микроорганизмы могут влиять только на отдельные (единичные) стадии довольно сложных и длительных процессов химического синтеза.

- ▶ Применение микроорганизмов в качестве носителей активных полиферментных систем, способных переводить экзогенные органические соединения в разнообразные полезные продукты и физиологически активные вещества основано на том, что они могут осуществлять в одну стадию важнейшие превращения, требующие при синтезе 20 химических стадий. Кроме того, удастся легко проводить реакции, трудно или пока совсем не осуществимые методами чисто химического синтеза.

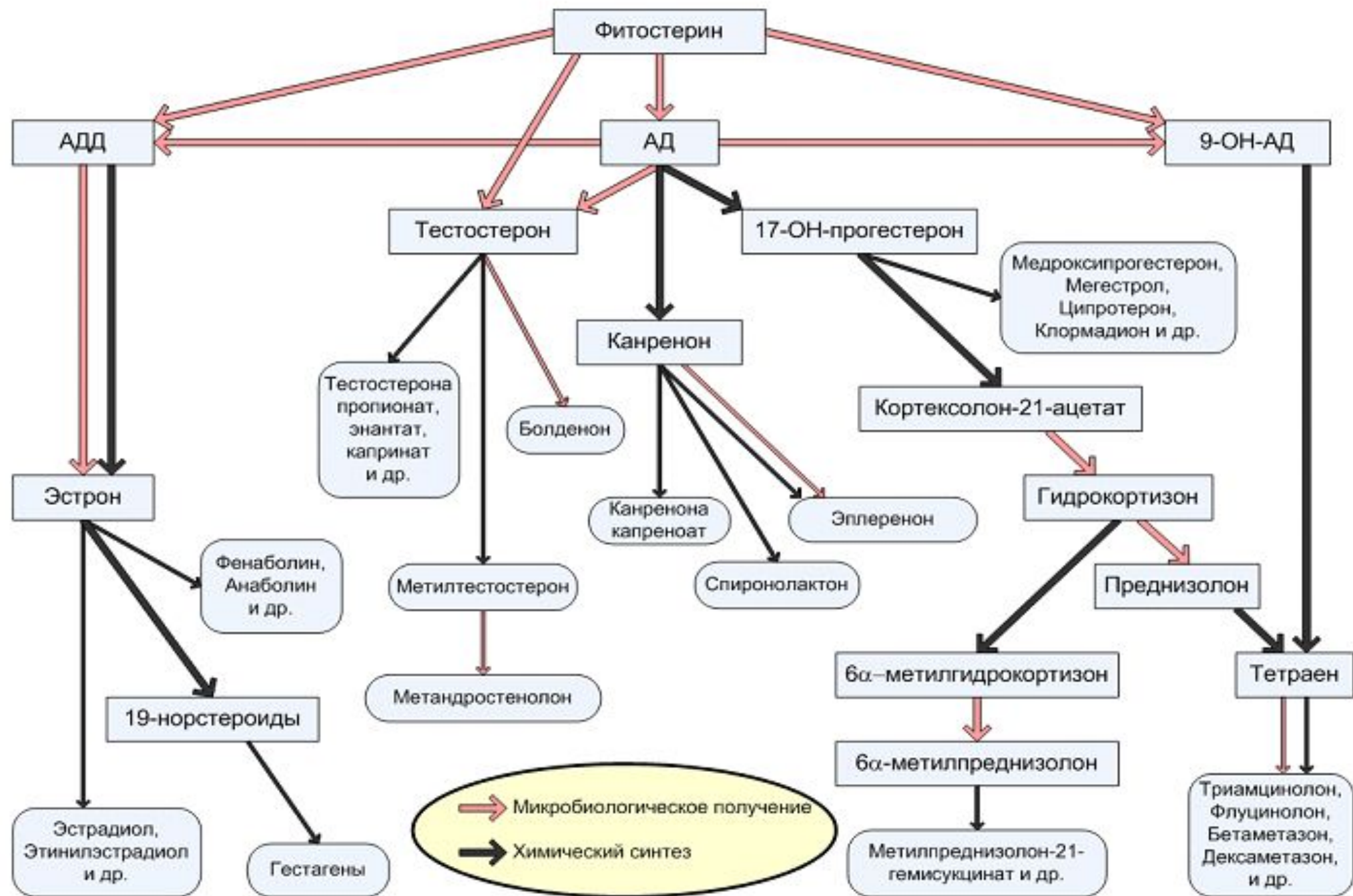
- **Микробиологическая трансформация** – использование ферментативной активности жизнеспособных клеток микроорганизмов, результатом чего является некоторое изменение молекулярной структуры трансформируемого субстрата. В области превращений стероидных соединений достоинства биологических катализаторов проявляются наиболее ярко. Долгое время микробиологическая трансформация считалась специфическим методом химии стероидов.

- ▶ Еще в конце XIX в. было известно, что бактериальная флора кишечника млекопитающих превращает холестерин в копростерин, а холевую кислоту - в дезоксихолевую. К 1913 г. относится открытие полного расщепления холестерина микобактериями. И лишь в 30-х годах, когда была установлена структура основных стероидных гормонов, известных к тому времени, начались попытки применять трансформирующую способность микроорганизмов для препаративного получения этих соединений. В 1948 г. впервые осуществлено введение гидроксильной группы в молекулу стероида микробиологическим путем. Но только после получения 11-гидроксипрогестерона из прогестерона при ферментации последнего с культурой *Rhizopus nigricans* микробиологические трансформации стероидов привлекли широкое внимание.

В настоящее время принята классификация микробиологических трансформаций по типу возникновения и отщепления функциональных групп.

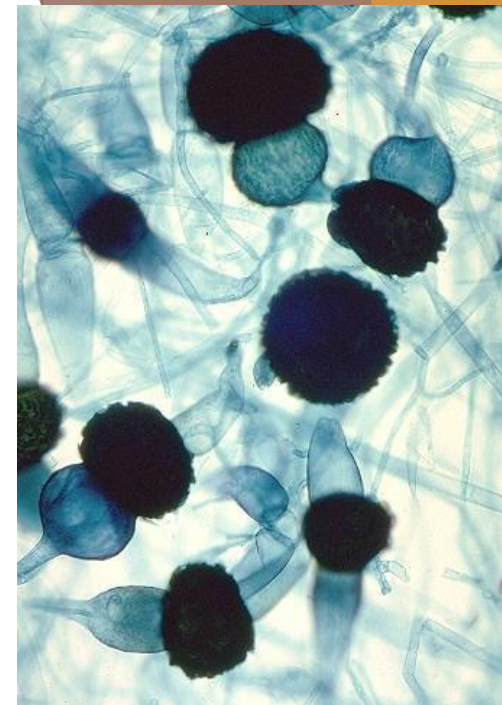
- окисление,
- восстановление,
- декарбоксилирование,
- дезаминирование,
- образование гликозидов,
- гидролиз,
- метилирование,
- этерификация,
- дегидрирование,
- диспропорционирование,

- аминирование,
- конденсация,
- ацетилирование,
- амидирование,
- деметоксилирование,
- нуклеотидация,
- галогенирование,
- деметилирование,
- ассиметризация,
- рацемизация,
- изомеризация

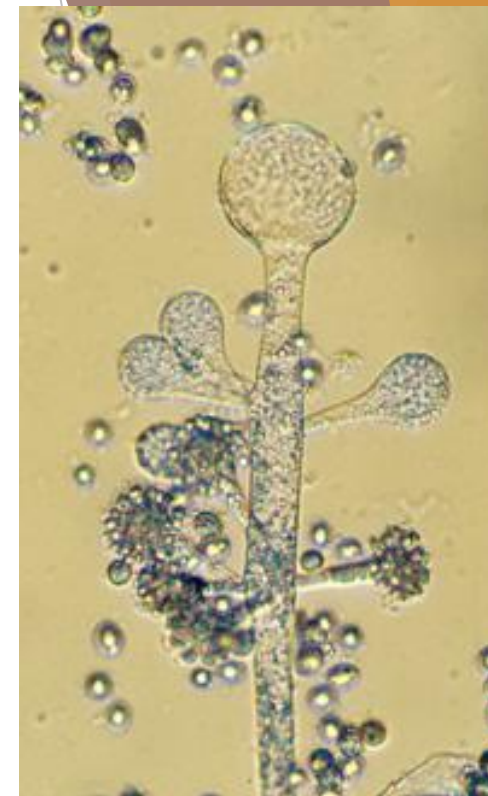


Микробиологическое гидроксилирование

- ▶ Наличие гидроксильных групп в 3, 11, 16, 17 положениях молекулы стероида, как правило, обуславливает физиологическую активность большинства гормональных стероидных препаратов.
- ▶ Гидроксилирование стероидов осуществляется очень многими микроорганизмами, чаще всего грибами, даже конидии некоторых грибов обладают гидроксилирующей активностью. Гидроксилирование стероидов при помощи гриба *Rh. Nigricans* - яркий пример сочетания, специфичности и разнообразия действия микроорганизмов.
- ▶ 11-Гидроксилирование как один из важнейших путей получения кортизона изучено наиболее детально и давно применяется в промышленности, выходы продуктов трансформации очень высоки. Многие микроорганизмы образуют смесь 11- и 11-эпимеров, соотношение которых существенно зависит от фазы развития культуры.



- ▶ Наличие в молекуле стероидов 11-гидроксильной группы обуславливает физиологическую активность гидрокортизона (кортизола) и преднизолона. Гидроксилированию подвергаются субстраты от производных эстрана до сложных молекул стерина, сапонинов. Причина этого - очень широкая субстратная специфичность гидроксилаз, которую демонстрируют многие микроорганизмы. Например, штамм *Cunninghamella blakesleeana*, который вводит оксигруппу в 11-положение обширного набора стероидов - различных производных эстрана, тестостерона, кортексолона, прогестерона и т.д.
- ▶ Получение 14-гидроксипрогестерона при помощи *Bacillus cereus* является одним из немногих примеров гидроксилирования при помощи бактерий. 15-гидроксилирование осуществляется также многими микроорганизмами, основное место среди которых занимают *Fusarium* и *Penicillium*.

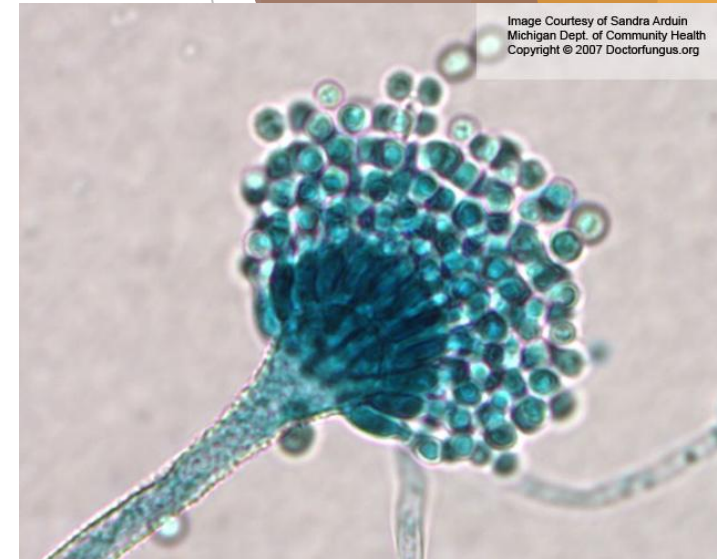


Дегидрогенизация стероидов

- ▶ Преднизолон из кортизона и гидрокортизона, дианабол из метилтестостерона.
- ▶ Чаще всего микроорганизмы дегидрируют положения 1,2 и 4,5, но описано и введение двойной связи в положения 7,8; 8,9; 9,11; 16,17; 17,20. Реакции дегидрогенизации осуществляют бактерии и актиномицеты, особенно часто это микоформы *Arthrobacter*, *Corynebacterium*, *Nocardia*. Широкая субстратная специфичность дегидрогеназ показана на большом экспериментальном материале; она позволяет использовать в качестве субстратов ацетаты стероидов, которые являются полупродуктами во многих технологических схемах получения стероидов. Например, *Mycobacterium globiforme* 193, дегидрирующая 1,2 - связь в кортизоне, так же эффективно превращает и кортизонацетат в преднизонацетат с выходом 86%. Для этой культуры характерна максимальная удельная трансформирующая активность в период снижения удельной скорости роста.

Микробиологическое восстановление

- ▶ Этот процесс используется в меньшей степени, чем дегидрирование. Он осуществляется главным образом дрожжами и анаэробными бактериями, представителями микрофлоры кишечника млекопитающих, осуществляющими превращение холестерина в копростерин.
- ▶ Описаны процессы насыщения двойных связей также и аэробными культурами, широко известными как окислители - актиномицетами, микоформами и даже грибами. Например, культура *Aspergillus flavus* восстанавливает ароматическое кольцо некоторых стероидов.

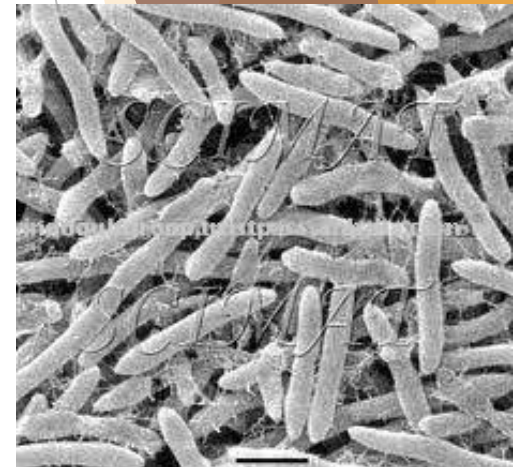


Окисление гидроксильной группы в кетогруппу

Одна из наиболее частых реакций, осуществляемых микроорганизмами (бактериями, актиномицетами, грибами). Наибольший практический интерес представляют окислительные превращения гидроксильных групп у 3, 17 и 20-го атомов стероидной молекулы. Окисление гидроксила в третьем положении легко осуществляется у соединений с ненасыщенным кольцом А, а также при наличии двойной связи в положении 4. К этому же типу окислительных превращений относят введение кетогруппы в молекулу стероида.

Гидролиз эфиров стероидов

- ▶ Открыт в 1938 г. Практическая ценность этой реакции определяется тем, что ацилированные стероиды являются обычными промежуточными продуктами химического синтеза, в котором используется ацильная защита функциональных групп. Хотя гидролиз ацильной группы легко осуществим химическим путем, он часто приводит к побочным нежелательным продуктам.
- ▶ Микробиологическое расщепление эфирной связи осуществляется представителями различных таксономических групп, в частности флавобактериями. Культура *Bac. Megaterium* обладает специфической активностью по отношению к 21-ацетатам стероидов с диоксиацетоновой цепочкой.



- ▶ Дезацилирующая способность часто встречается среди микоформ, муковых и несовершенных грибов, актиномицетов. Особенность приведенной реакции состоит в том, что она проводится обычно одновременно с другими процессами - гидроксилированием, дегидрогенизацией и др. Ценность представляют как культуры, избирательно отщепляющие ацильную группу, так и микроорганизмы, способные наряду с гидролизом эфирной связи осуществлять еще какую-либо практически важную реакцию.
- ▶ Культуры, гидролизующие эфирные связи без побочных реакций, обнаружены в разных таксономических группах. Очень интенсивно проводят реакцию деацетилирования представители видов *Actinomucor corymbosus*, *Mucor lamprosporus*, *Actinomyces flavis*, *A. pheochromogenes*, *Nocardia* sp. и *Arthrobacter simplex*. Выход реакций достигает 95%.

Отщепление боковых цепей стероидов

Проблема расщепления боковой цепи стероидов с сохранением стероидного скелета может быть решена следующими способами:

- 1) синтезом модифицированных стероидов, заместители в кольце А или В которых не позволяют микроорганизмам осуществлять 1,2 - дегидрирование или 9-гидроксилирование;
- 2) инкубацией стероидов в присутствии соединений, ингибирующих действие ферментов 9-гидроксилазы или 1,2 - дегидрогеназы;
- 3) получением мутантных штаммов, не способных осуществлять определенные стадии расщепления самого стероидного ядра.

- ▶ Технологические особенности получения стероидных гормонов
- ▶ Преимущества иммобилизации
- ▶ Особенности подачи субстрата
- ▶ Получение целевого продукта
- ▶ Основные пути усовершенствования процессов трансформации стероидов

Получение гидрокортизона (кортизола) из вещества S

- ▶ 1. Выращивание трансформирующей культуры (I стадия) производят путем трех последовательных генераций на питательной среде, содержащей сахарозу, дрожжевой автолизат и сложный набор неорганических солей:
- ▶ Крышку инокулятора перед засевом обрабатывают водным раствором формалина, аппарат и все помещение облучают бактерицидной лампой и весь процесс выращивания трансформирующей культуры проводят в стерильных условиях. Далее полученная трансформирующая культура поступает в сепаратор, откуда отделенный мицелий в виде водной суспензии передается в ферментер для проведения основной реакции трансформации вещества S.

2. Трансформация вещества S

- ▶ также начинается со стерилизации ферментера и воздушного фильтра водным раствором формалина. Размол steroids на микромельнице и получению суспензии его в стерильной воде с содержанием steroids 1 г/л. Для предотвращения развития посторонней микрофлоры используется добавка антибиотика. Перемешивание и аэрация осуществляются, как и на предыдущей стадии, так же используются и пеногасители.

3. Выделение гидрокортизона.

- ▶ Культуральная жидкость вместе с мицелием поступает на сепарацию. Отделенный мицелий промывается, промывные воды присоединяются к основной культуральной жидкости. Далее - экстракция продукта трансформации из водной среды органическим растворителем. Осветленный активированным углем экстракт подвергается многократному упариванию с различными растворителями, осветлению, снова упариванию досуха и промывке подходящим растворителем.

Витамины

Жизненно важные низкомолекулярные органические соединения, необходимые для человека в ничтожных количествах, но имеющие огромное значение. Они являются естественными компонентами ферментативных систем и катализируют широкий круг биохимических реакций, обеспечивающих жизнедеятельность организма.

■ Где искать витамины?

Витамин А:		говяжья печень, яйца, творог, рыба, молоко, шпинат, морковь, петрушка
Витамин В1:		яйца, молоко, говяжья печень, горох, фасоль, дрожжи, ростки пшеницы
Витамин В2:		творог, яйца, овсяные хлопья, свинина, рыба, молоко, соевое масло
Витамин С:		цитрусовые, красные фрукты, цветная капуста, зеленый горошек, фасоль, редька.
Витамин Д:		растительное масло, говяжья печень, рыба, яичный желток, говядина
Витамин Е:		молоко, салат, ростки пшеницы, растительное масло
Витамин F:		рыбий жир, оливковое масло, сухофрукты
Витамин Н:		говяжья печень, грибы, овсяные хлопья, шоколад, яичный желток, орехи, молоко
Витамин К:		морская капуста, зеленый чай, шпинат, репчатый лук, чечевица

История открытия

- ▶ В сентябре 1880 г. при защите своей докторской диссертации Лунин утверждал, что для сохранения жизни животного, помимо белков, жиров, углеводов, солей и воды, необходимы ещё и другие, дополнительные вещества. Придавая им большое значение, Н. И. Лунин писал: «Обнаружить эти вещества и изучить их значение в питании было бы исследованием, представляющим большой интерес». Вывод Лунина был принят в штыки научным сообществом, так как другие ученые не смогли воспроизвести его результаты. Одна из причин была в том, что Лунин в своих опытах использовал тростниковый сахар, в то время как другие исследователи использовали молочный — плохо очищенный и содержащий некоторое количество витамина В.
- ▶ В 1895 г. В. В. Пашутин пришел к выводу, что цинга является одной из форм голодания и развивается от недостатка в пище какого-то органического вещества, создаваемого растениями, но не синтезируемого организмом человека. Автор отметил, что это вещество не является источником энергии, но необходимо организму и что при его отсутствии нарушаются ферментативные процессы, что приводит к развитию цинги. Тем самым В. В. Пашутин предсказал некоторые основные свойства витамина С.

- ▶ В 1906 году Фредерик Хопкинс предположил, что помимо белков, жиров, углеводов и т. д., пища содержит ещё какие-то вещества, необходимые для человеческого организма, которые он назвал «accessory food factors». Последний шаг был сделан в 1911 году польским учёным Казимиром Функом, работавшим в Лондоне. Он выделил кристаллический препарат, небольшое количество которого излечивало бери-бери. Препарат был назван «Витамайн».
- ▶ В 1929 году Хопкинс и Эйкман за открытие витаминов получили Нобелевскую премию, а Лунин и Функ — не получили. Лунин стал педиатром, и его роль в открытии витаминов была надолго забыта. В 1934 году в Ленинграде состоялась Первая всесоюзная конференция по витаминам, на которую Лунин (ленинградец) не был приглашён.
- ▶ В 1910-х, 1920-х и 1930-х годах были открыты и другие витамины. В 1940-х годах была расшифрована химическая структура витаминов.
- ▶ В 1970 году Лайнус Полинг, дважды лауреат Нобелевской премии, потряс медицинский мир своей первой книгой «Витамин С, обычная простуда и грипп».

Функции и свойства ВИТАМИНОВ:

- 1. Биостимуляция ферментативных процессов
- 2. Составная часть коферментов (не всегда)
- 3. Антимутагенная
- 4. Поступают в организм алиментарно
- 5. Малотоксичны
- 6. Отсутствие приводит к различным заболеваниям
- 7. Не включаются в структуру тканей
- 8. Не используются организмом в качестве источника энергии.

Преимущества биотехнологических методов получения ВИТАМИНОВ:

1. Доступное и дешёвое сырьё
2. Относительно простое оборудование
3. Отсутствие вредных выбросов в окружающую среду
4. Возможность получения витаминов и коферментов в течение одной технологической стадии.

- ▶ Поскольку бактерии для своего роста и размножения нуждаются в присутствии многих витаминов для синтеза коферментов, введение в организм структурных аналогов витаминов - антивитаминов - приводит к гибели микроорганизмов. **Антивитамины** обычно блокируют активные центры ферментов, вытесняя из них соответствующее производное витаминов (кофермент), и вызывают конкурентное ингибирование ферментов. К антивитаминам относят вещества, способные вызывать после введения в организм животных классическую картину гипо- и авитаминоза.
- ▶ **Гиповитаминоз** - болезненное состояние, возникающее при нарушении соответствия между расходом витаминов и поступлением их в организм; то же, что витаминная недостаточность. Может быть обусловлено как недостаточным поступлением витаминов извне, так и неполным их усвоением.
- ▶ **Авитаминоз** - болезнь, вызванная полным отсутствием в пище какого-либо витамина или полным нарушением его усвоения.

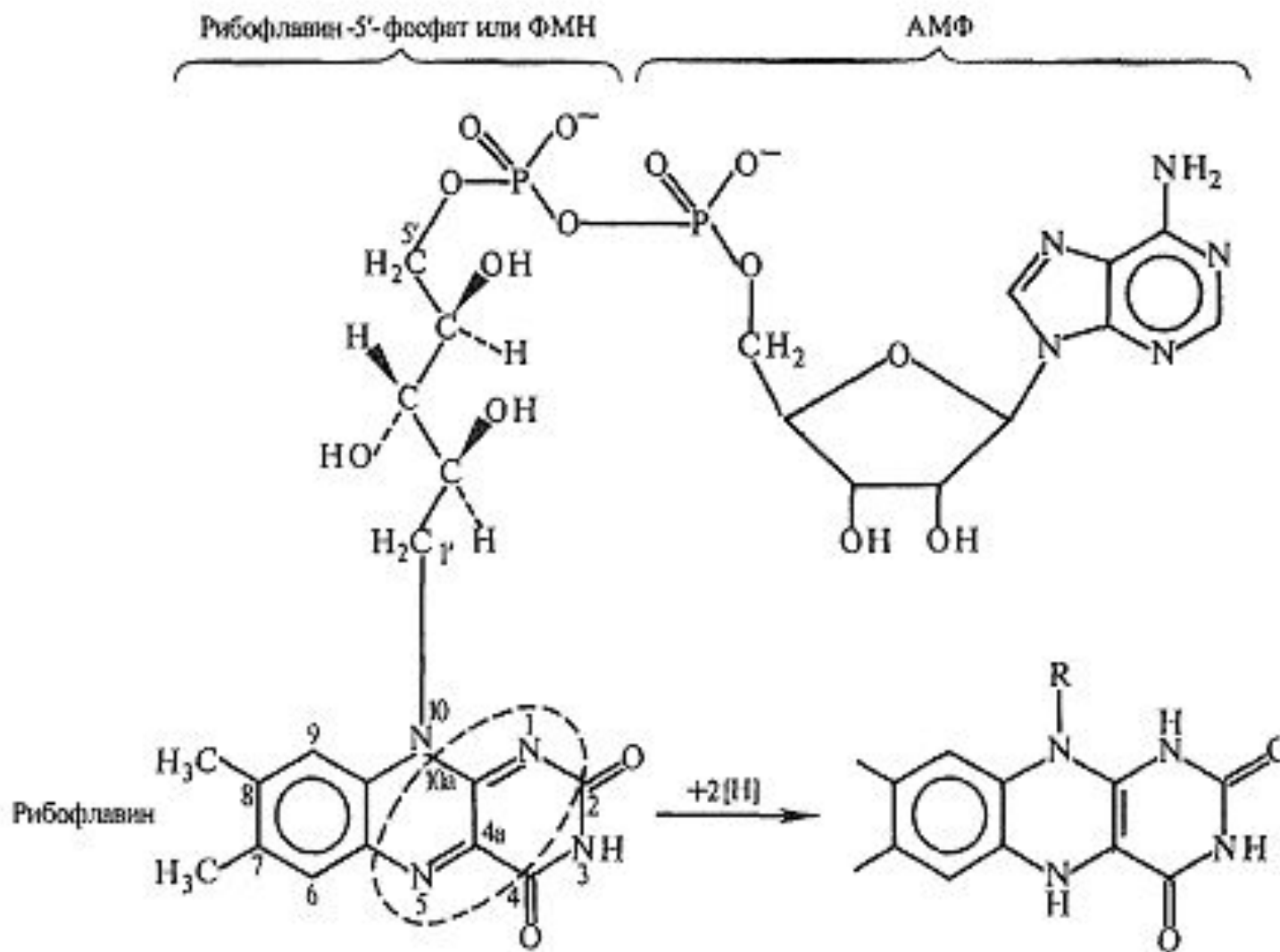
Получение витамина В₂ (рибофлавина)

Для рибофлавина характерно функционирование в коэнзимных формах:

- -флавиномононуклеотид (ФМН)
- -флавинадениндинуклеотид (ФАД).

К источникам рибофлавина относятся

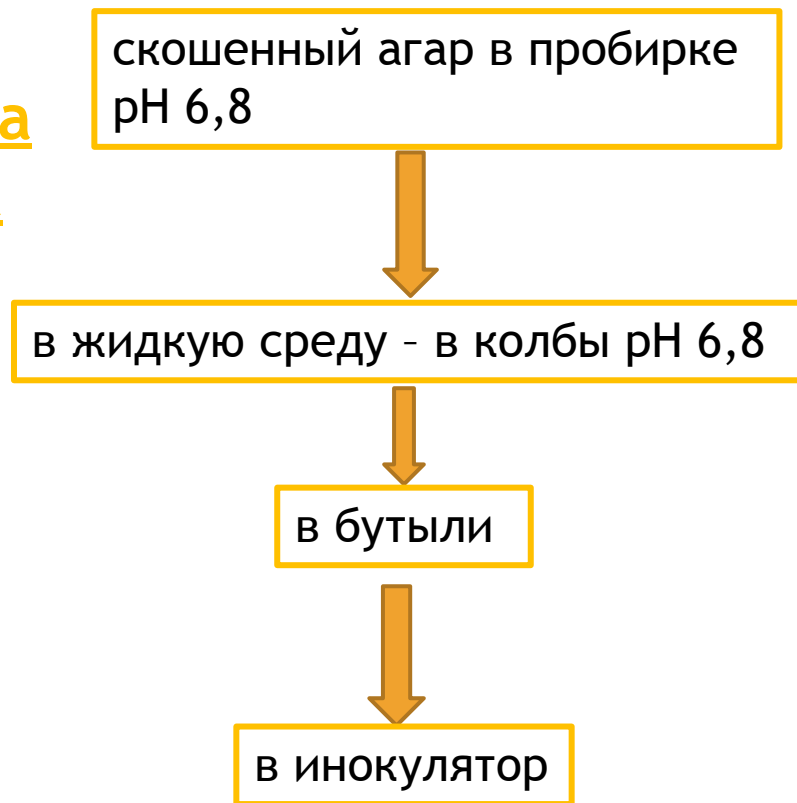
- -высшие растения
- -дрожжи
- -мицелиальные грибы.



- ▶ Активным продуцентом рибофлавина являются культуры дрожжеподобных грибов *Eremothecium ashbyii* и *Ashbya gossypii*, синтезирующих до 3,8 и 6,4 г/л рибофлавина соответственно. Недостатком этих культур является их нестабильность при хранении на твёрдых средах независимо от температурного режима. Чтобы обойти эту проблему и сохранить активность штамма, требуется систематически в течение 8 - 10 мес. пересевать культуру на твёрдую среду, отбирая колонии с высокой продуктивностью по интенсивности оранжевой окраски.



подготовка инокулята



а) Соевая мука, агар и свекловичный сахар;
б) дрожжевой экстракт, пептон, глюкоза, агар. Время выращивания 5 - 7 сут.

а) Соевая мука и свекловичный сахар; б) пептон, свекловичный сахар, кукурузный экстракт, KH_2PO_4 , MgSO_4 , подсолнечное масло. Время выращивания - 48 ч.

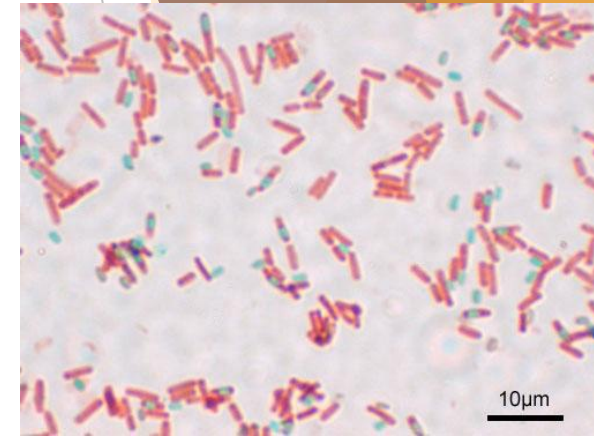
Свекловичный сахар, кукурузный экстракт, KH_2PO_4 , технический жир

После выращивания в инокуляторе в течение 21 - 26 часов культуру переводят в ферментёр с питательной средой, содержащей: кукурузную муку, соевую муку, свекловичный сахар, кукурузный экстракт, KH_2PO_4 CaCO_3 , NaCl и технический жир. Среду стерилизуют при 120 - 122 °С в течение 1 часа. Культивирование в ферментёре ведут до начала лизиса клеток и появления спор (определяют микроскопически) при $t = 28 - 30$ °С.

- ▶ Именно на примере выделения рибофлавина в культуральную жидкость было открыто явление сверхсинтеза. Сверхсинтез рибофлавина можно получить, если действовать на дикие штаммы мутагенами, нарушающими механизм ретроингибирования синтеза витамина B2, флавиновыми нуклеотидами, а также изменением состава культуральной среды.
- ▶ Перед подачей в ферментер среду стерилизуют с помощью антибиотиков и антисептиков во избежание ее инфицирования. По завершении процесса ферментации культуральную жидкость концентрируют, высушивают.

Bacillus subtilis

- ▶ В 1983 году в институте генетики был сконструирован рекомбинантный штамм продуцента *Bacillus subtilis*, способный синтезировать в три раза больше по сравнению с *Eremothecium ashbyii* и этот продуцент более устойчив к экзогенной контаминации. Ещё одно достоинство этого продуцента - устойчивость к наиболее сильному антиметаболиту рибофлавина - его аминоксиду розеофлавинолу и обладает способностью к сверхсинтезу витамина B2. 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.



Меласса (чёрная патока, фр. *Mélasse*)

Кормовая патока, побочный продукт сахарного производства; сиропобразная жидкость тёмно-бурого цвета со специфическим запахом.



- В США и Канаде меласса используется в кулинарии как сироп и довольно популярна в этом качестве. Это один из немногих подсластителей, богатых микроэлементами и витаминами. Веганы ценят чёрную тростниковую патоку (blackstrap) как растительный источник кальция.
- В Европе и России используется в кормлении сельскохозяйственных животных. Меласса — углеводистый корм. Содержит 20-25 % воды, около 9 % азотистых соединений, преимущественно амидов, 58-60 % углеводов, главным образом сахара, и 7-10 % золы. При гранулировании кормов её используют как связывающий ингредиент.
- Является ценным сырьём для биотехнологических производств, из мелассы путём её сбраживания получают: при анаэробном брожении — этиловый спирт, молочную, масляную, пропионовую и другие кислоты; при аэробном брожении — глюконовую, лимонную, фумаровую, щавелевую и уксусную кислоты.
- Меласса используется для производства низкокачественного самогона (малясовка, «паточный» самогон) и наряду с рисом является сырьём для изготовления «тайского виски»

Розеофлавин

- 8-диметиламино(нор)-рибофлавин - антибиотик, образуемый *Streptomyces davawensis*. Показано, что розеофлавин ингибирует синтез 6,7-диметил-8-рибитиллюмазина и рибофлавинсинтетазу *Bacillus subtilis*. Выделены мутанты, устойчивые к розеофлавинолу и синтезирующие высокие количества рибофлавина.

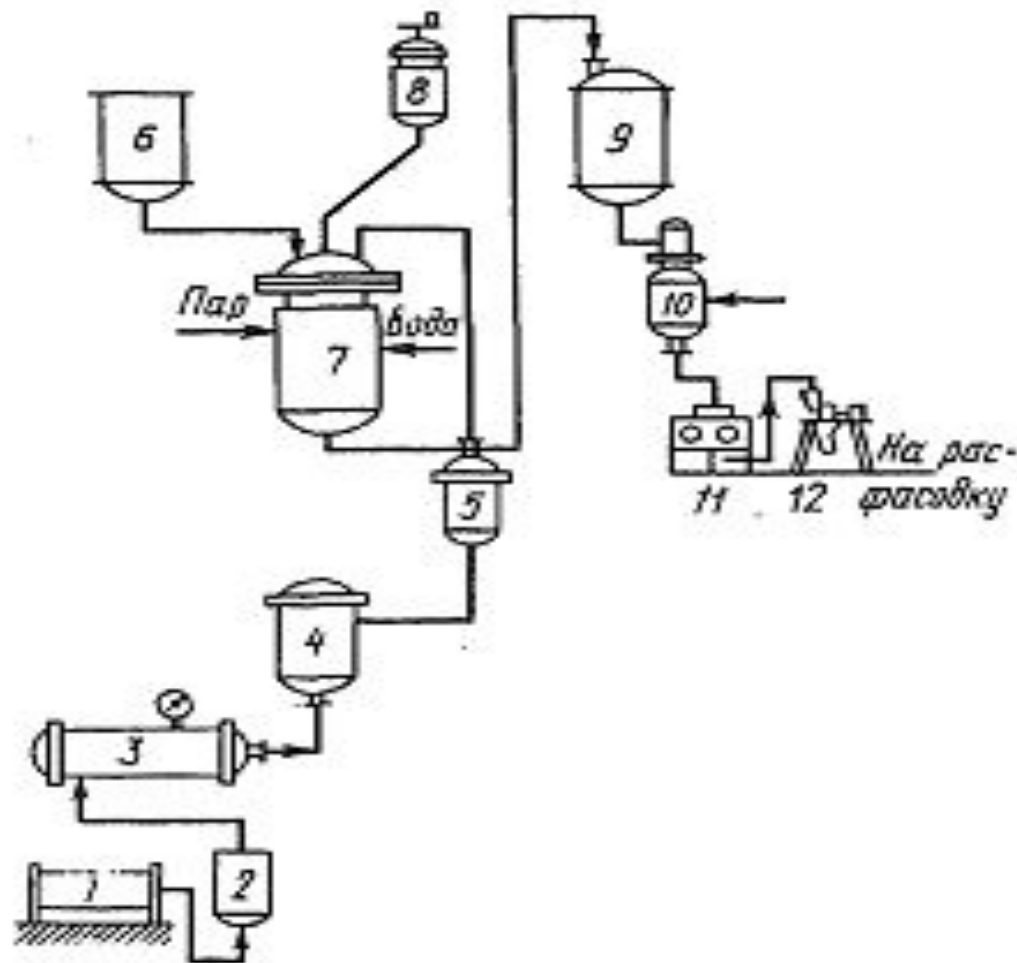


Рис. 12.4. Технологическая схема получения кормового концентрата рибофлавина с помощью *Ermothecium ashbyii*:

1 — компрессор воздуха, 2 — маслоотделитель, 3 — насос, 4 — фильтр головной, 5 — инокулятор, 6 — смеситель, 7 — ферментер, 8 — инокулятор, 9 — сборник культуральной жидкости, 10 — выпарной аппарат, 11 — распылительная сушилка, 12 — дробилка

Т а б л и ц а 12.2. Микроорганизмы, образующие значительные количества рибофлавина и влияние железа на выход витамина*

Микроорганизм	Выход рибофлавина, мг/л	Оптимальная концентрация железа, мг/л
<i>Clostridium acetobutylicum</i>	97	1—3
<i>Mycobacterium smegmatis</i>	58	Не существенна
<i>Mycocandida riboflavina</i>	200	» »
<i>Candida flaveri</i>	567	0,04—0,06
<i>Eremothecium ashbyii</i>	2480	Не существенна
<i>Ashbyii gossypii</i>	6420	» »

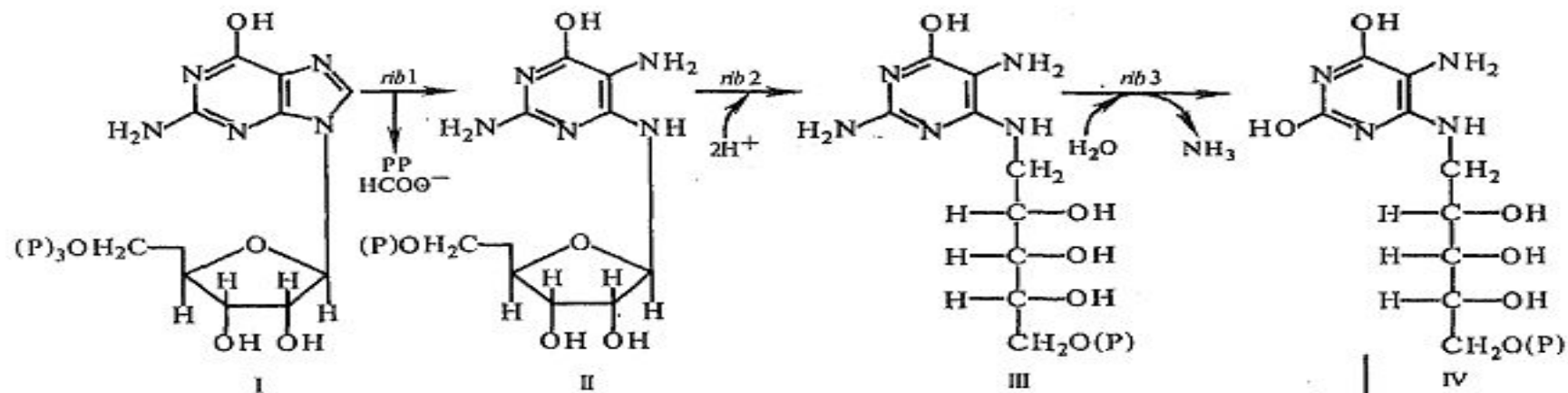
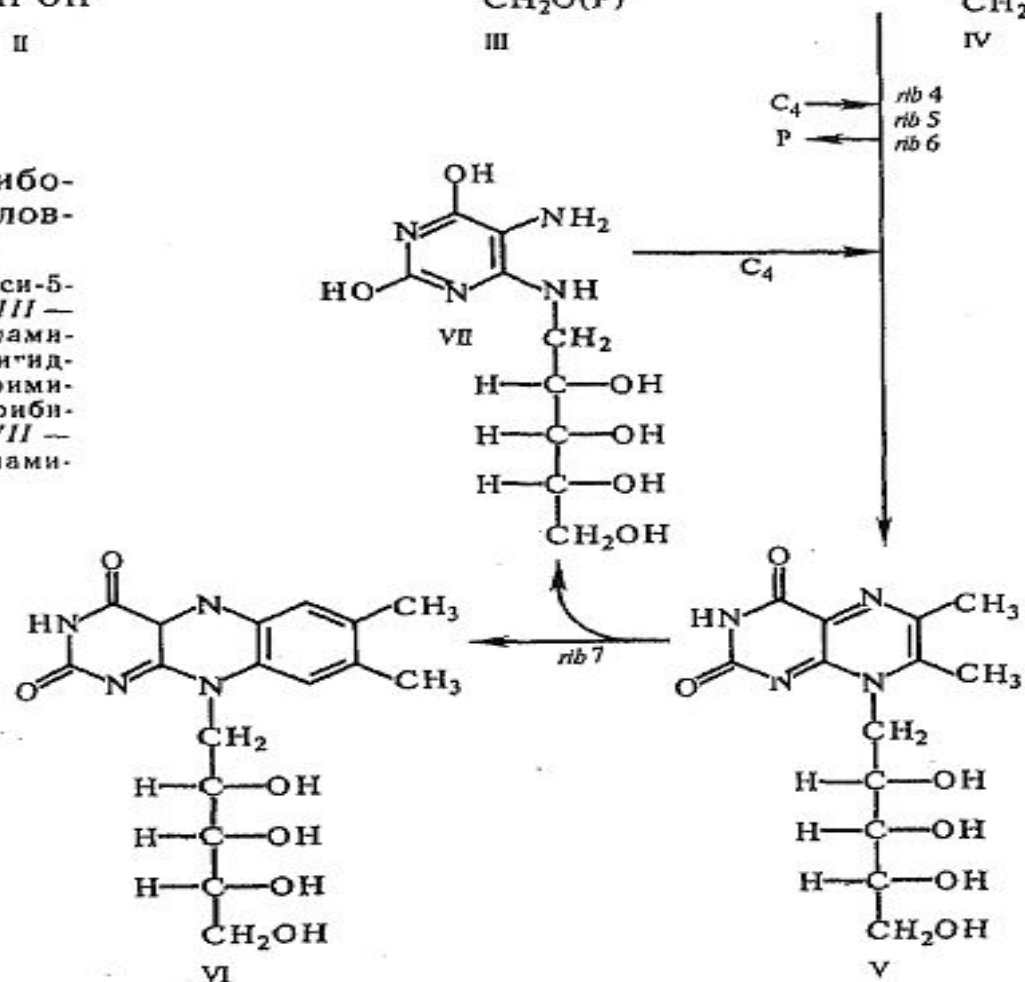


Рис. 12.3. Путь биосинтеза рибофлавина у дрожжей (Шавловский, Логвиненко, 1985):

I — ГТФ; II — 2,5-диамино-4-гидрокси-5-рибозил-аминопиримидин-5'-фосфат; III — 2,5-диамино-4-гидрокси-6-рибигиламинопиримидин-5'-фосфат; IV — 2,4-дигидрокси-5-амино-6-рибитиламинопиримидин-5'-фосфат; V — 6,7-диметил-8-рибитиллюмазин; VI — рибофлавин; VII — 2,4-дигидрокси-5-амино-6-рибитиламинопиримидин



Наиболее богатым источником ФАД служит гриб *E. ashbyii*. В Японии запатентован способ, позволяющий получить более 600 мг/л ФАД из его биомассы.

Участие флавинов в многообразных биохимических реакциях позволяет понять важную роль этих соединений в обмене веществ высших и низших организмов.

Потребность человека в витамине В₂ 2—2,5 мг/сут. Витамин В₂ поступает в организм с пищей (рибофлавином богато молоко, яичный желток, печень, дрожжи) и в результате жизнедеятельности кишечной микрофлоры.

ФМН и ФАД (флавинат) применяют при лечении дистрофии сетчатки глаза, а также при заболеваниях печени и поджелудочной железы.

В качестве препаратов пролонгированного действия используют сложные эфиры РФ. Они имеют стимулирующее влияние на углеводный и липидный обмен.

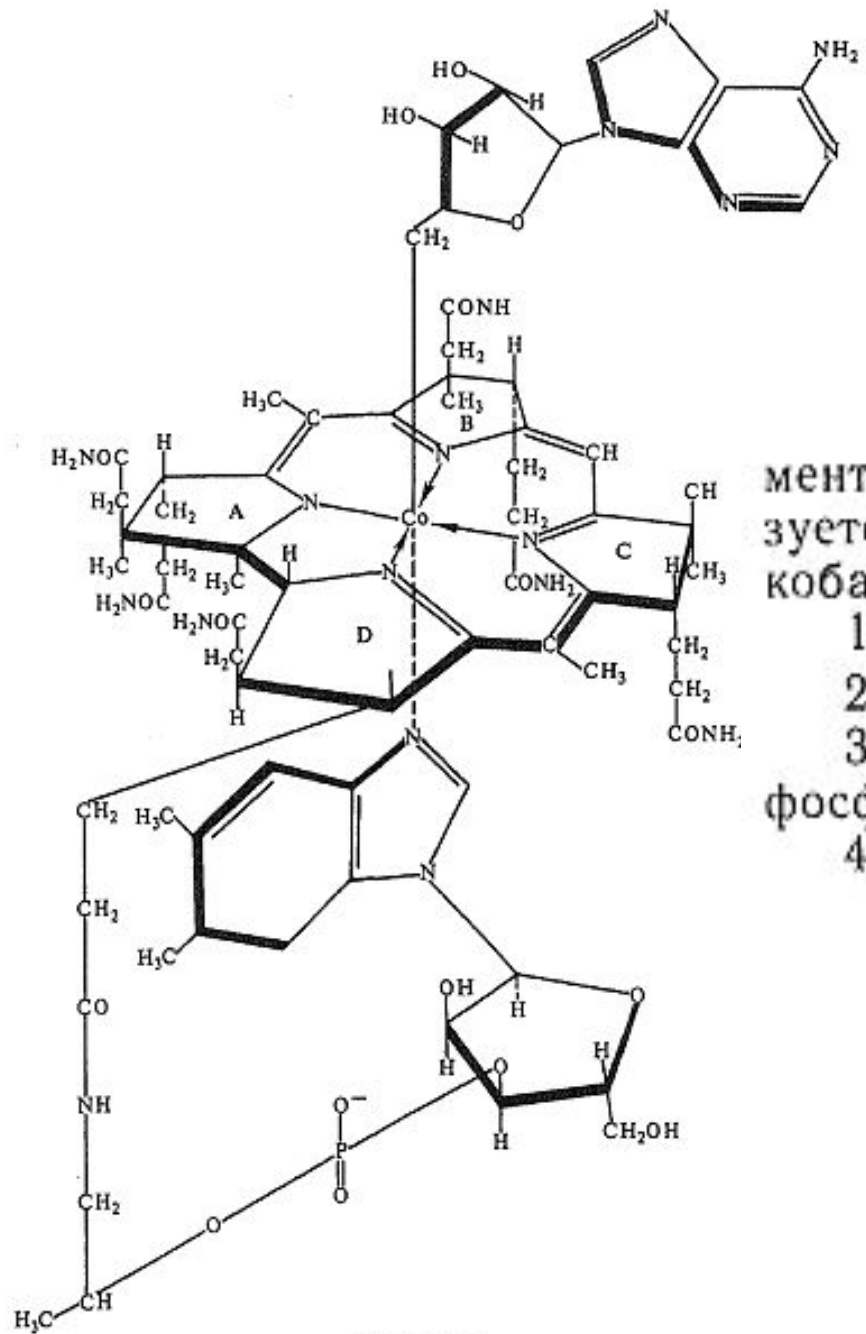
Витамином В₂ витаминизируют некоторые сорта белого хлеба. Его используют также для окраски в оранжево-желтый цвет пищевых продуктов. Среди производных изоаллоксазинов имеются соединения, обладающие противоопухолевым и противовоспалительным действием.

Получение витамина B12

- ▶ Этот витамин был открыт одновременно в США и в Англии. В 1972 г. В Гарвардском университете был осуществлен химический синтез витамина B12, включающий 37 стадий его получения, что лишало возможности организовать промышленное производство этого витамина.
- ▶ Он регулирует углеводный и липидный обмен, участвует в метаболизме незаменимых аминокислот, пуриновых и пиримидиновых оснований, стимулирует образование гемоглобина, применяется для лечения злокачественной анемии, лучевой болезни, заболеваний печени и в других случаях.
- ▶ Обнаружение витамина B12 как побочного продукта при производстве антибиотиков стимулировало поиск продуцентов этого витамина.

- ▶ Продуцентом витамина B12 являются пропионовокислые бактерии из рода *Propionibacterium*. Продуктивность - более 50 мг на 1 л среды. Применение мутантов и добавление в среду предшественника витамина B12 - 5,6 диметилбензимидазола (5,6 ДМБ) резко повышает продуктивность продуцента - до 200 мг. Этому способствует также добавление в питательные среды кукурузного и мясного экстракта, соевой муки, рыбной муки. Выращивание пропионовых бактерий производится периодическим методом в анаэробных условиях на среде с кукурузным экстрактом, глюкозой, солями кобальта и сульфатом аммония. Образующиеся кислоты нейтрализуются щелочью. Через 72 часа после начала ферментации вносят предшественники - 5,6 ДМБ. Длительность ферментации - 3 - 6 суток по разным данным.

- ▶ По окончании ферментации витамин остаётся в клетках, поэтому полученную массу сепарируют, стабилизируют нитритом натрия, охлаждают, нейтрализуют, коагулируют белки и фильтруют. Очищают на ионообменной смоле, кристаллизуют и проводят химическую очистку продукта. Далее следует получение различных лекарственных форм поливитаминных препаратов. Для увеличения производства витамина B12 перспективным является применение генной инженерии при получении гибридных штаммов и использовании методов иммобилизации на полимерах.
- ▶ Создан перспективный штамм *P. ari*, способный выделять синтезированный витамин в среду. Для предотвращения образования коферментной формы добавляют в качестве стабилизатора нитрит натрия.



ментативном дефосфорилировании кобаламин-5'-фосфата образуется кобаламин. Последовательность реакций при синтезе кобаламина из кобинамида выглядит следующим образом:

- 1) кобинамид + АТФ → кобинамид-Ф + АДФ;
- 2) кобинамид-Ф + ГТФ → ГДФ-кобинамид + ФФ_н;
- 3) кобинамид-ГДФ + α-рибазол-5'-фосфат → кобаламин-5'-фосфат + ГМФ;
- 4) кобаламин-5'-фосфат → кобаламин + Ф_н.

Т а б л и ц а 12.1. Ферментативные реакции, катализируемые аденозилкобаламином

Ферменты	Реакции	Переносимая группа
Глутаматмутаза	L-трео-β-метиласпарат ↔ L-глутамат	—CH(NH ₂)COOH
Метилмалонил-КоА-мутаза	сукцинил КоА ↔ L _R -метилмалонил-КоА	—COS-КоА
2-Метиленглутаратмутаза	метилитаконат ↔ 2-Метиленглутарат	—C(=CH ₂)COOH
L-β-Лизинмутаза	3,5-диаминогексаноат ↔ L-β-лизин	—NH ₂
D-α-Лизинмутаза	2,5-диаминогексаноат ↔ D-α-лизин	—NH ₂
D-α-Орнитинмутаза	2,4-диаминогексаноат ↔ D-α орнитин	—NH ₂
L-α-Лейцинмутаза	3-аминоизокапронат ↔ L-α лейцин	—NH ₂
1,2-Диолдегидратаза	этиленгликоль → ацетальдегид + H ₂ O	—OH
	1,2-пропандиол → пропионовый альдегид + H ₂ O	—OH
Глицериндегидрогеназа	Глицерин → 3-оксипропионовый альдегид + H ₂ O	—OH
	Этиленгликоль → ацетальдегид + H ₂ O	—OH
	1,2-Пропандиол → пропионовый альдегид + H ₂ O	—OH
Этаноламиндезаминаза	Этаноламин → ацетальдегид + NH ₄	—NH ₂
	2-аминопропанол ↔ пропионовый альдегид + NH ₄	—NH ₂
Рибонуклеотидредуктаза	D-рибонуклеотид → D-2-дезоксирибонуклеотид + H ₂ O	Нет

Витамин С

Одним из классических примеров промышленного использования микроорганизмов в получении витамина С является превращение D-сорбита в L-сорбозу бактериями *Gluconobacter oxydans*.

L-сорбоза является промежуточным продуктом синтеза аскорбиновой кислоты по методу Рейхштейна. Процесс получения L-сорбозы биотехнологическим способом основан на способности различных штаммов бактерий к селективному окислению сорбита.

В отличие от химического процесса, где в результате окисления сорбита получается смесь продуктов, окислительная трансформация с помощью бактерий характеризуется предельно точным воздействием на определённые функциональные группы в молекулах этих веществ.

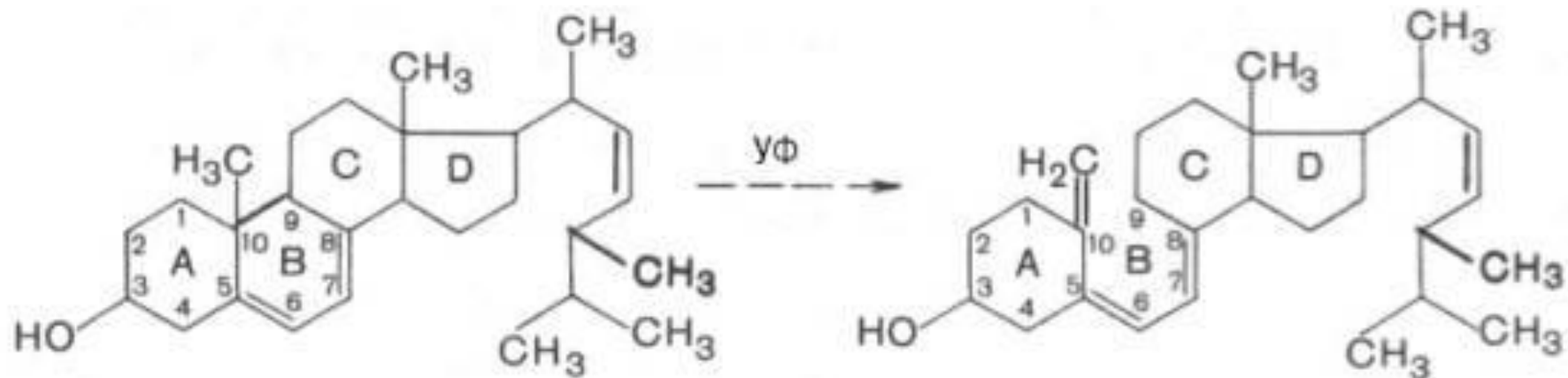
Эти бактерии превращают многоатомные спирты в сахара, дегидрируя вторичную спиртовую группу полиола в соответствии с правилом Бертрана-Хадсона:

«Из двух вторичных спиртовых групп, находящихся в цис-положении, дегидрируется та, которая примыкает к первичной спиртовой группе».

- ▶ Наиболее сильной окислительной способностью обладают штаммы *Acetobacter melanogenum* и *Gluconobacter oxydans*.
- ▶ Для получения сорбозы *Gluconobacter oxydans* выращивают в питательных средах, содержащих высокие концентрации сорбита и дрожжевой или кукурузный экстракт, которые служат источниками азота, витаминов и других веществ, обеспечивающих рост бактерий.
- ▶ Для роста продуцента и окисления сорбита в сорбозу необходимо постоянное поступление кислорода в культуральную жидкость.
- ▶ При высоких концентрациях сорбита лишь небольшая его часть затрачивается на наращивание биомассы бактерий.
- ▶ Основное количество трансформируется в сорбозу со степенью конверсии 96 – 98%.



Эргокальциферол



Эргостерин

Витамин D₂ (эргокальциферол)

СПАСИБО ЗА ВНИМАНИЕ!