

# МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ ТРАНСФОРМАЦИЯ

- неполное превращение органических соединений под действием одного или нескольких ферментов микроорганизмов, сопровождающееся накоплением в среде продуктов этого превращения;
- использование ферментативной активности клеток микроорганизмов, результатом которого является изменение молекулярной структуры трансформируемого субстрата

## ОТЛИЧИЯ ОТ БИОСИНТЕЗА И ФЕРМЕНТАЦИИ

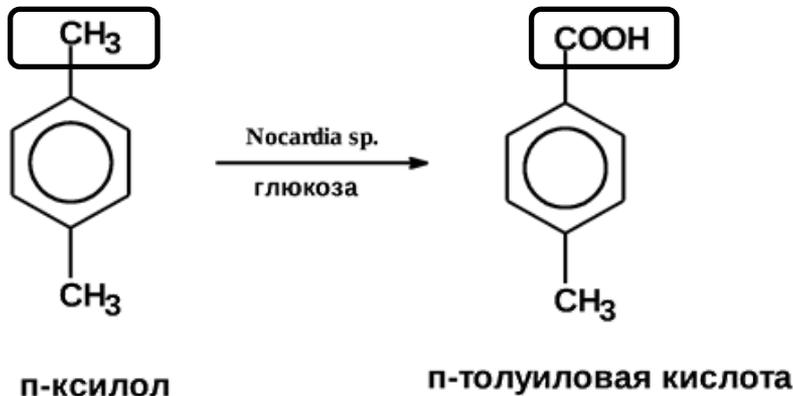
- одно- (редко двух-) стадийный процесс;
- осуществляется одним (редко несколькими) ферментом(ами);
- приводит к незначительному изменению структуры субстрата;
- не происходит синтеза вещества *de novo*



# МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ ТРАНСФОРМАЦИЯ

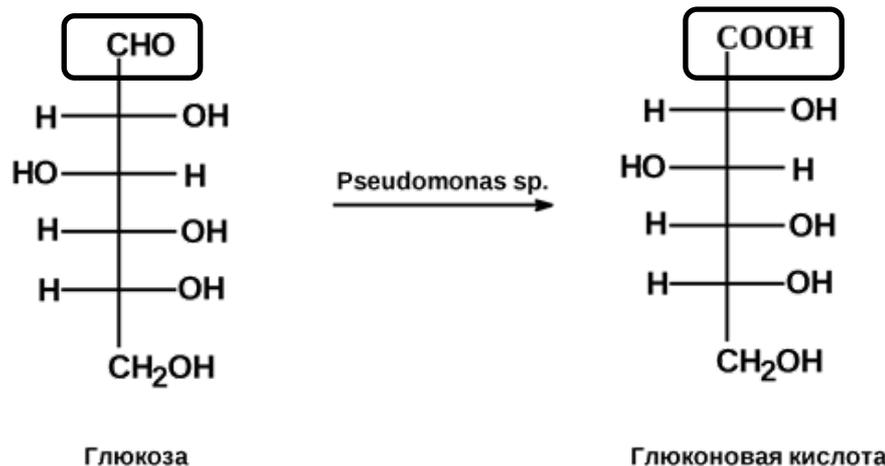
– *естественное свойство* микроорганизмов, широко распространенное в природе и используемое человеком для получения ценных продуктов

## 1. Образование соединений, которые далее не используются микроорганизмом



Окисление п-ксилола в п-толуиловую кислоту некоторыми штаммами бактерий рода *Nocardia* при выращивании в синтетической среде с глюкозой и ксилолом

## 2. Временное накопление промежуточных продуктов в процессе использования органических соединений в качестве ростовых субстратов



Окисление глюкозы в глюконовую (альдоновую) кислоту некоторыми штаммами бактерий рода *Pseudomonas* при выращивании на среде с глюкозой. После значительного накопления в среде глюконовая кислота используется как источник углерода

# МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ ТРАНСФОРМАЦИЯ И ХИМИЧЕСКИЙ СИНТЕЗ

**ПРЕИМУЩЕСТВА** микробиологической трансформации:

- **высокая специфичность** действия микробных ферментов позволяет осуществлять **тонкие перестройки** молекул разной химической структуры с использованием простых технологических схем, в то время как аналогичные химические превращения многостадийны, трудоемки или невозможны;
- **«мягкие» условия** протекания реакций (микробные ферменты действуют в водных, неагрессивных средах при температуре не выше 100 °С);
- **экологическая безопасность**, обусловленная образованием небольшого количества вредных для биосферы отходов и побочных продуктов.

**НЕДОСТАТКИ** микробиологической трансформации:

- **низкий выход целевого продукта**, поскольку ферменты в большинстве случаев функционируют в водной среде, а многие субстраты плохо растворимы в воде, и приходится использовать растворы с низкой концентрацией трансформируемого вещества;
- **высокие энергетические затраты**, обусловленные необходимостью соблюдения асептических условий, интенсивного массообмена, обработки больших количеств микробной биомассы или культуральной среды, загрязнением целевого продукта биотрансформации питательными веществами и продуктами микробного метаболизма.

# МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ ТРАНСФОРМАЦИЯ И ХИМИЧЕСКИЙ СИНТЕЗ

## Критерии выбора:

- рентабельность;
- особенности технологии;
- безопасность для здоровья человека и окружающей среды

Использование микробиологической трансформации **рентабельно:**

- при необходимости тонкой перестройки достаточно сложных молекул (углеводы, стерины, стероиды, алкалоиды, нуклеотиды, др.);
- при производстве средних масштабов (не более сотен или тысяч тонн в год).

Методы микробиологической трансформации экологически безопасны и являются **«мягкими технологиями»** в отличие от химических методов, которые по технологическим условиям и действию на биосферу являются **«жесткими»**

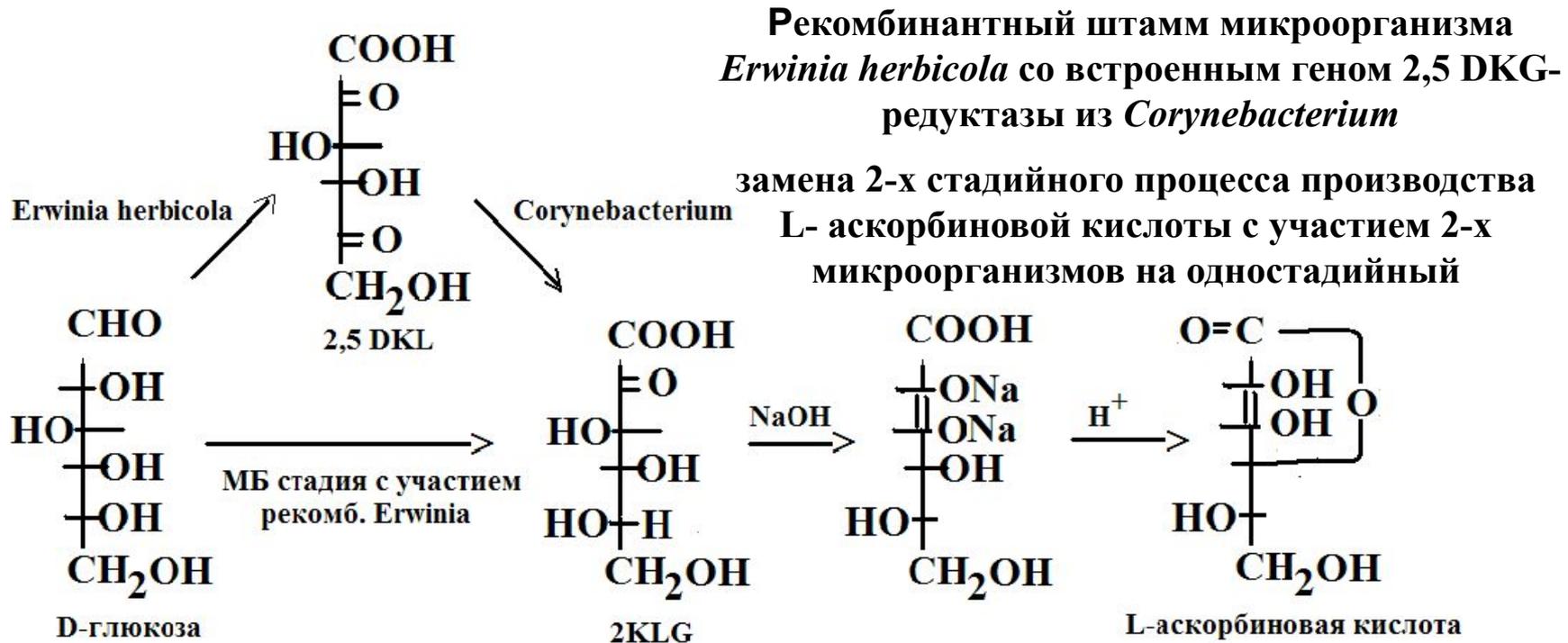
## Промышленные микробиологические трансформации:

- получение молочной кислоты;
- получение уксуса из этанола;
- производство глюконовой кислоты из глюкозы;
- получение ксилита из ксилозы;
- получение стероидных гормонов.



# МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ ТРАНСФОРМАЦИЯ

В практической деятельности человека используются не только процессы трансформации, осуществляемые микроорганизмами в природе или стандартных условиях культивирования, но и различные генетические, биохимические и технологические приемы воздействия на метаболизм микробной клетки, позволяющие препаративно получать продукты неполного превращения органических соединений, используя микроорганизмы, для которых в обычных условиях способность осуществлять данную трансформацию не выражена.



**Трансформация D-глюкозы в 2-кето-L-гулоновую кислоту под действием ферментов микроорганизмов – ключевой этап синтеза L-аскорбиновой кислоты**

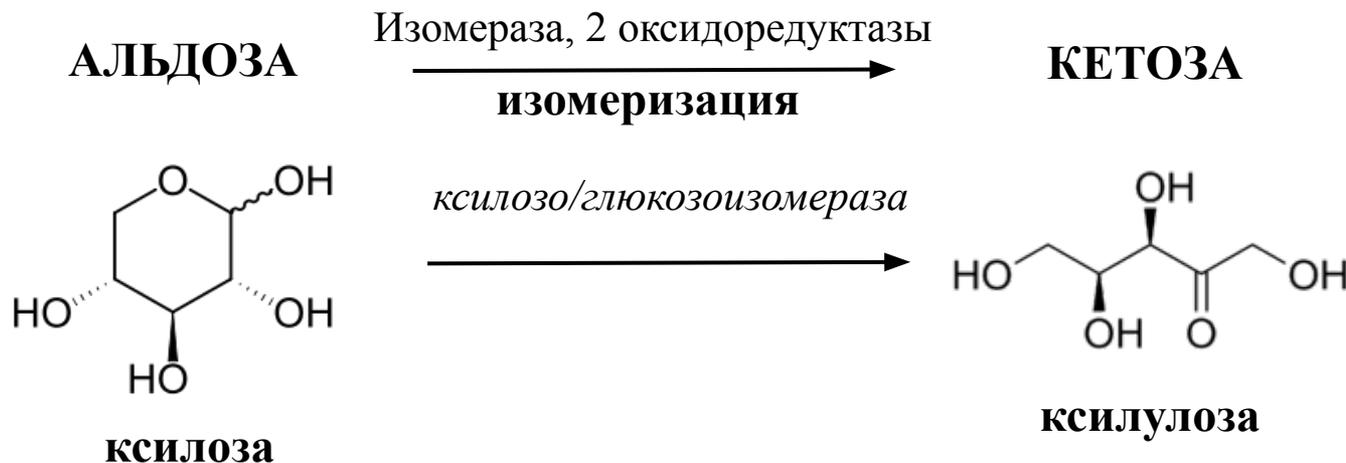
# МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ ТРАНСФОРМАЦИЯ

## Процессы микробиологической трансформации разнообразны по:

- природе исходных субстратов (стероиды, углеводы, нуклеотиды, др.);
- использованным микроорганизмам;
- типу и количеству участвующих ферментов;
- характеру превращения органических соединений.

## Классификация процессов микробиологической трансформации

- на основании химических механизмов реакций;
- на основании номенклатуры участвующих ферментов;
- **по типу химического превращения субстрат-продукт**
  - отражает суммарное превращение исходного соединения, но не механизм процесса;
  - является искусственной, но удобна с практической точки зрения



# ТИПЫ ПРОЦЕССОВ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ

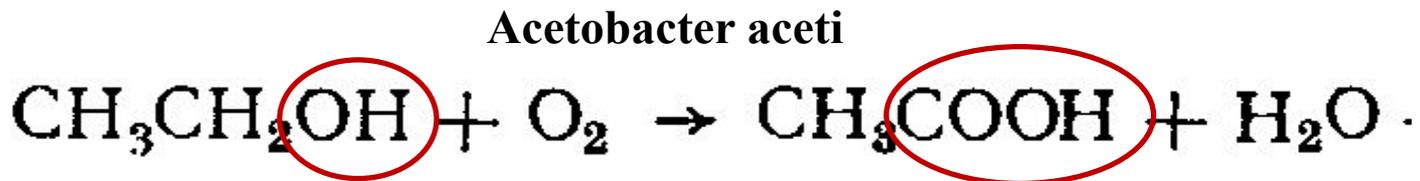
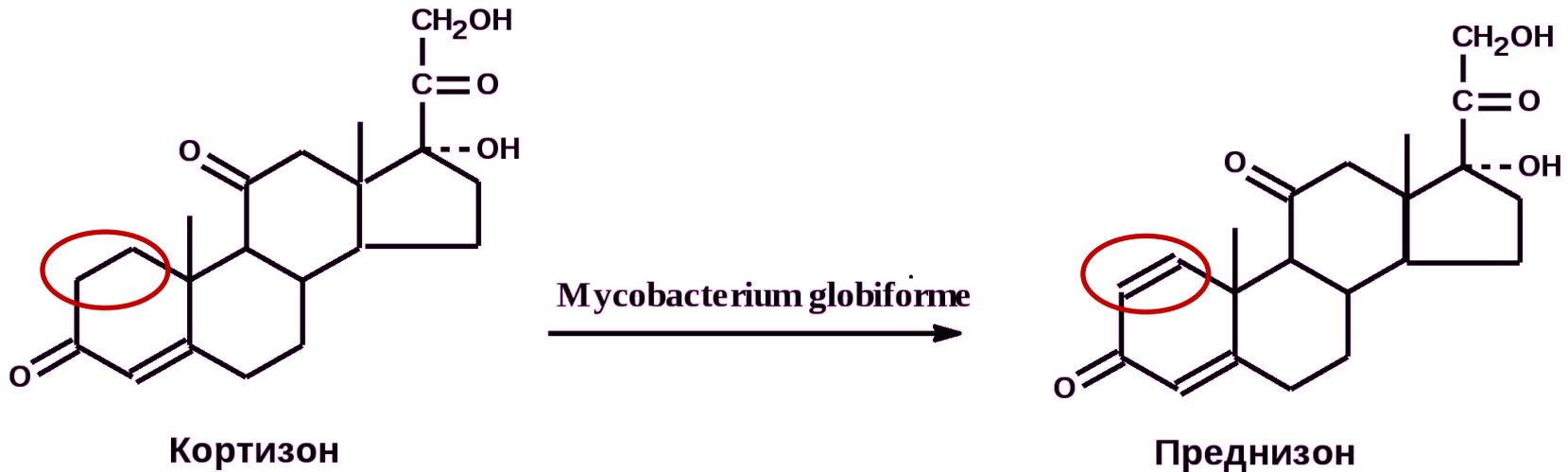
1) окисление, 2) восстановление, 3) декарбоксилирование, 4) дезаминирование, 5) образование гликозидов, 6) гидролиз, 7) метилирование, 8) этерификация, 9) дегидратация, 10) диспропорционирование, 11) конденсация, 12) аминирование, 13) ацетилирование, 14) амидирование, 15) нуклеотидация, 16) галогенирование, 17) деметилирование, 18) асимметризация, 19) рацемизация, 20) изомеризация.



# РЕАКЦИИ ОКИСЛЕНИЯ

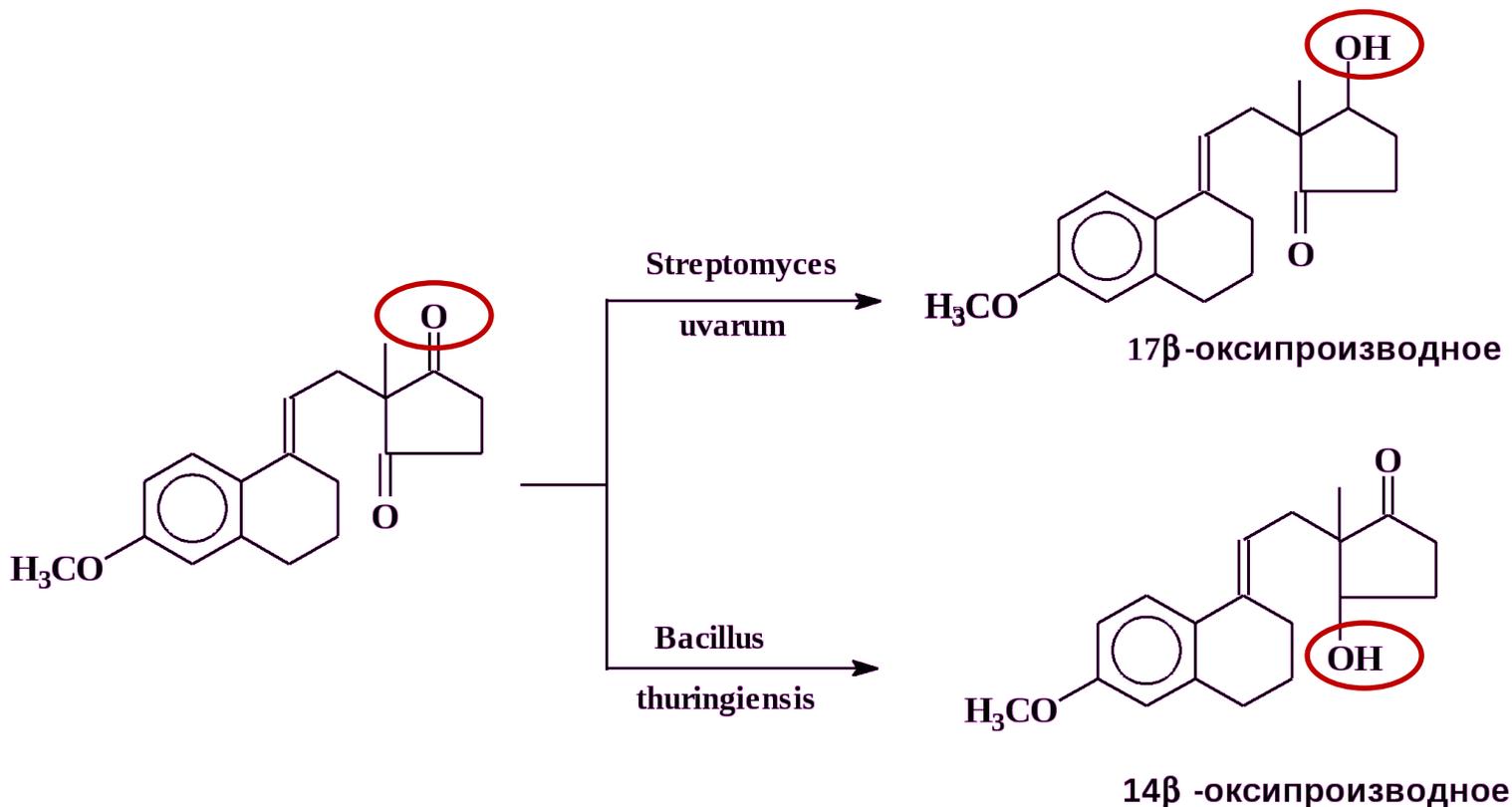
Объединяют **гидроксилирование** (введение группы **ОН**) неактивированного углерода в  $sp^3$ -гибридном состоянии, ароматического кольца; **окисление** непредельных  $C=C$  связей, спиртовой или альдегидной групп,  $\beta$ -окисление жирных кислот; **дегидрирование** и т.д.

*Пример: дегидрирование стероидов с целью получения противовоспалительных стероидных препаратов преднизона, преднизолона и их производных:*



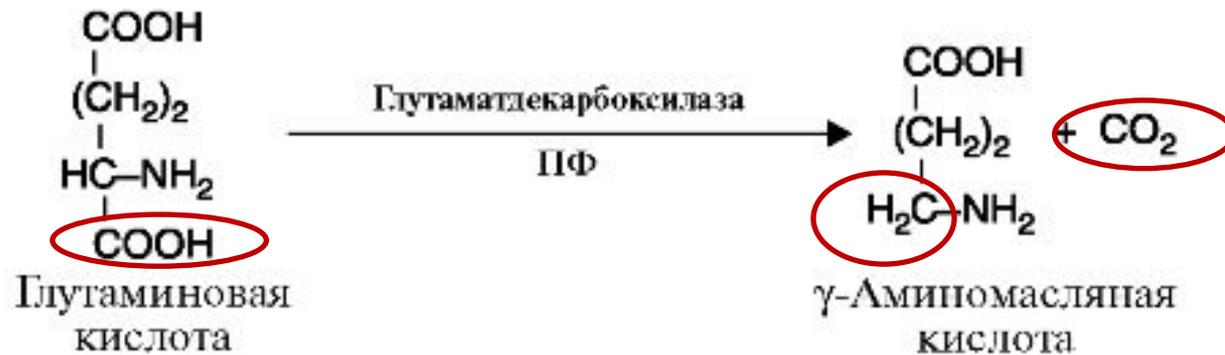
# РЕАКЦИИ ВОССТАНОВЛЕНИЯ

Микробное восстановление имеет преимущества перед многими аналогичными химическими реакциями. Например, высокая селективность действия микробных ферментов позволяет восстановить определенную кетогруппу стероидов (химическим путем это невозможно). В синтезе стероидов эта особенность микроорганизмов используется очень широко, например, для восстановления 14- или 17-кетогрупп секостероидов ряда эстрана



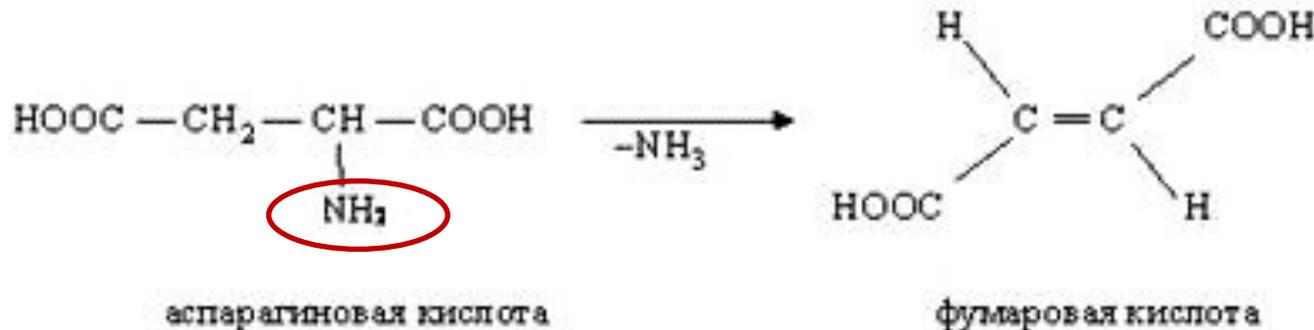
# РЕАКЦИИ ДЕКАРБОКСИЛИРОВАНИЯ

Используется главным образом для декарбоксилирования  $\alpha$ -кетокислот и аминокислот (кетоглутаровой кислоты до янтарной, аспарагиновой кислоты до аланина, глутаминовой кислоты до  $\gamma$ -аминомасляной)



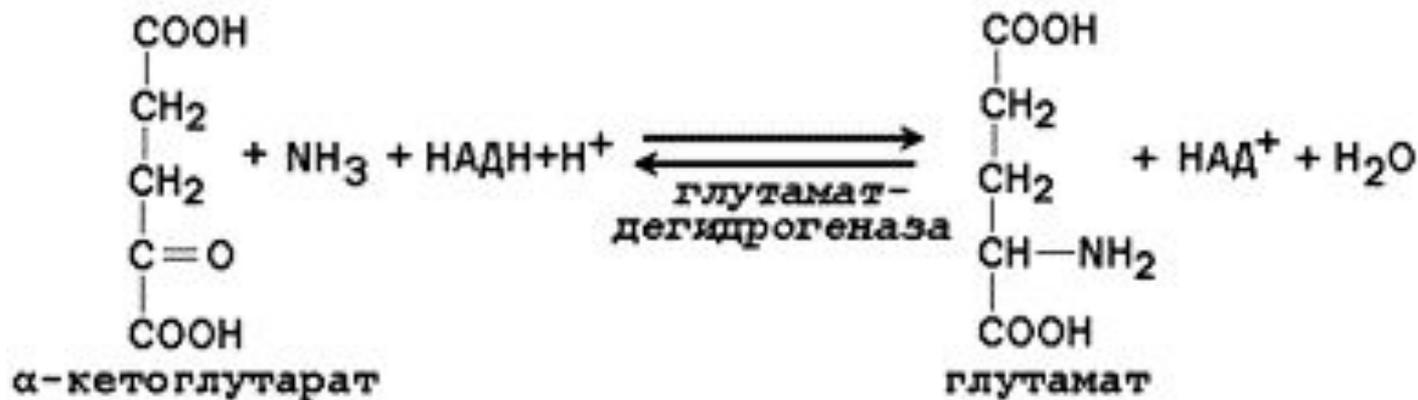
# РЕАКЦИИ ДЕЗАМИНИРОВАНИЯ

Имеют большое значение для превращений аминокислот, пуриновых и пиримидиновых оснований, нуклеотидов.



# РЕАКЦИИ АМИНИРОВАНИЯ

Описаны для многих соединений, имеющих олефиновую двойную связь или кетогруппу (фумаровая кислота – аспарагиновая кислота, кетоглутаровая кислота - глутаминовая кислота), могут происходить путем замещения атома водорода или оксигруппы (например, у гетероциклических оснований)



Реакции аминирования играют ключевую роль в клеточном синтезе аминокислот. Особенно большое значение имеет процесс аминирования фумаровой и  $\alpha$ -кетоглутаровой кислот. Получение аминокислот путем микробной трансформации (биосинтеза) протекает *в «мягких» условиях с хорошим выходом продукта* по сравнению с химическим синтезом.

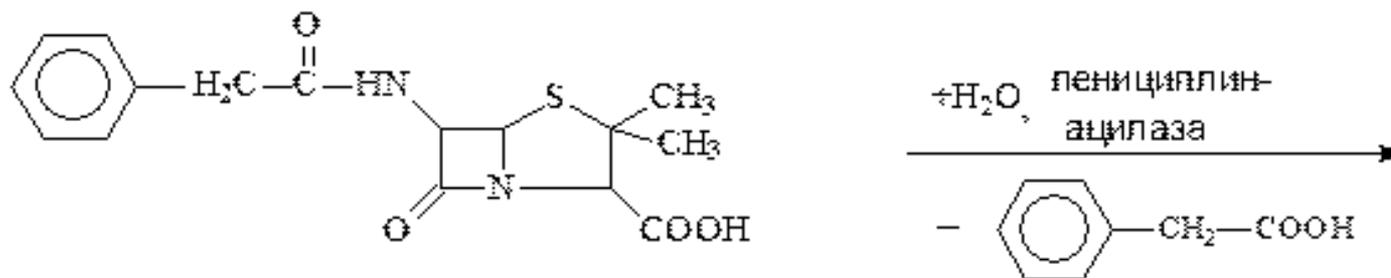
В *промышленном масштабе* микробная трансформация используется для *получения аспарагиновой кислоты* в Японии и США.

# РЕАКЦИИ АМИДИРОВАНИЯ

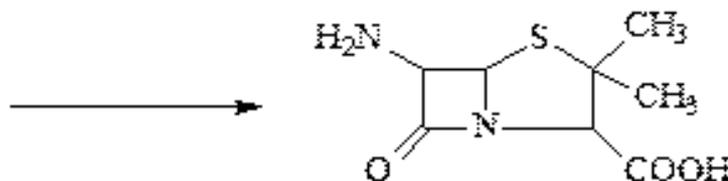
Встречаются редко (например, образование биотинамида из биотина)

# РЕАКЦИИ ГИДРОЛИЗА

Чрезвычайно широко распространены в микробной трансформации. Включают гидролиз эфиров, амидов и других соединений. **Наиболее часто используют при производстве антибиотиков и стероидов.** Современное производство пенициллинов основано на синтезе различных производных 6-аминопенициллановой кислоты (6-АПК), которую получают из бензилпенициллина ферментативным гидролизом.



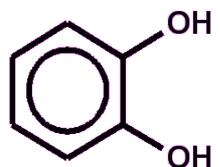
Бензилпенициллин



6 - Аминопенициллановая кислота (6-АПК)

# РЕАКЦИИ КОНДЕНСАЦИИ

- Представляют собой синтез молекул органических веществ из двух или более фрагментов с помощью различных микробных ферментов.
- Широко применяются при **получении антибиотиков** — производных пенициллина и цефалоспорины, которые синтезируют на основе 6-аминопенициллановой и 7-аминоцефалоспорановой кислот.
- Большое практическое значение имеет **синтез аминокислот из предшественников**. Конденсацией пирокатехина и его производных с аланином и серином получают L-диоксифенилаланин (ДОФА) — лекарственный препарат, применяемый при болезни Паркинсона



Пирокатехин

+



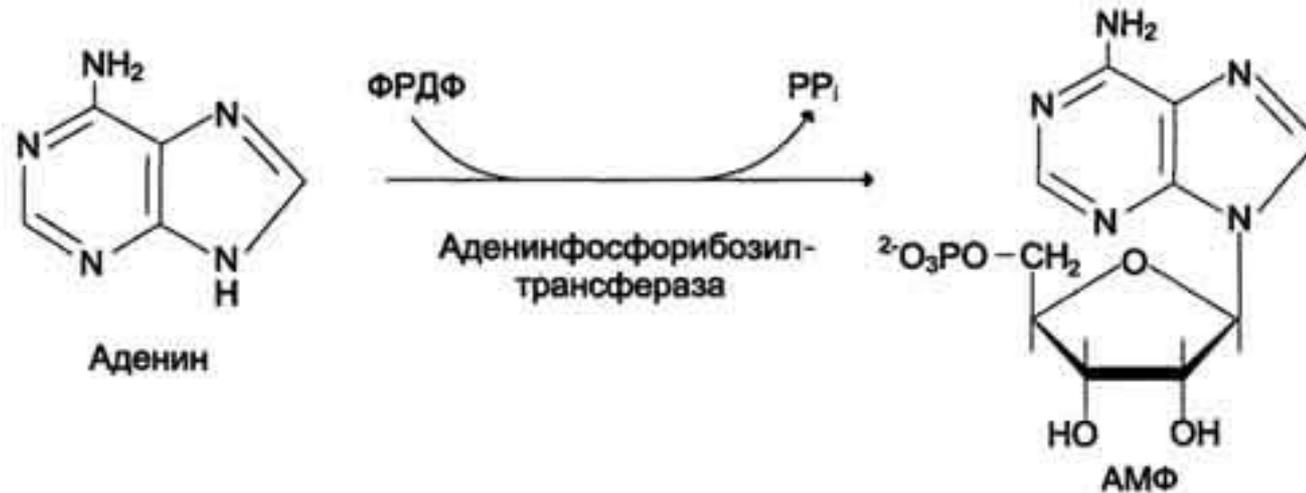
L-аланин



L-диоксифенилаланин (ДОФА)

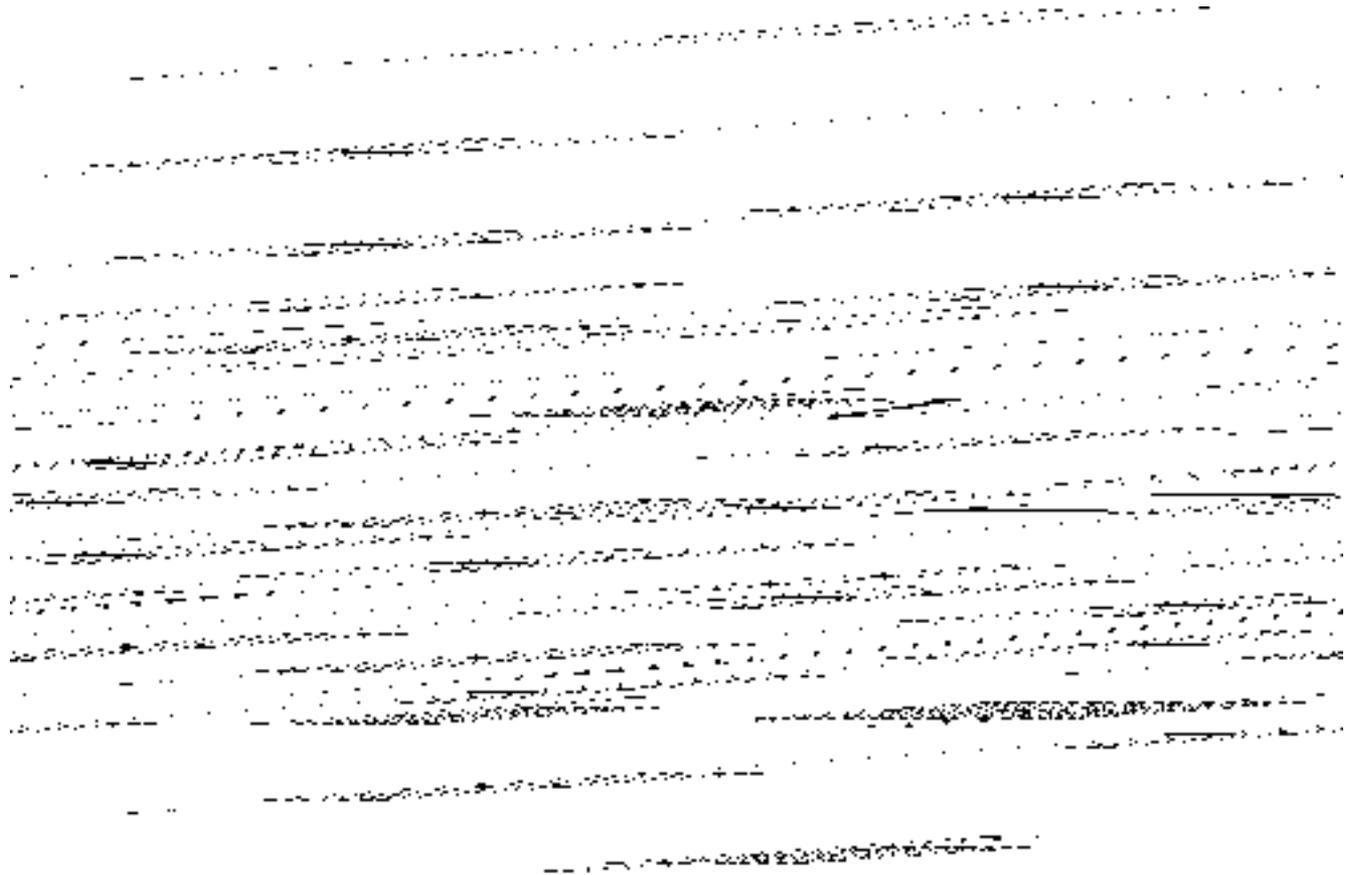
# РЕАКЦИИ НУКЛЕОТИДАЦИИ

- Синтез нуклеотидов из гетероциклических оснований или нуклеозидов. Включают образование рибозидов и их фосфорилирование.
- В зависимости от условий, микроорганизмы могут синтезировать нуклеозиды, их моно-, ди- и трифосфаты



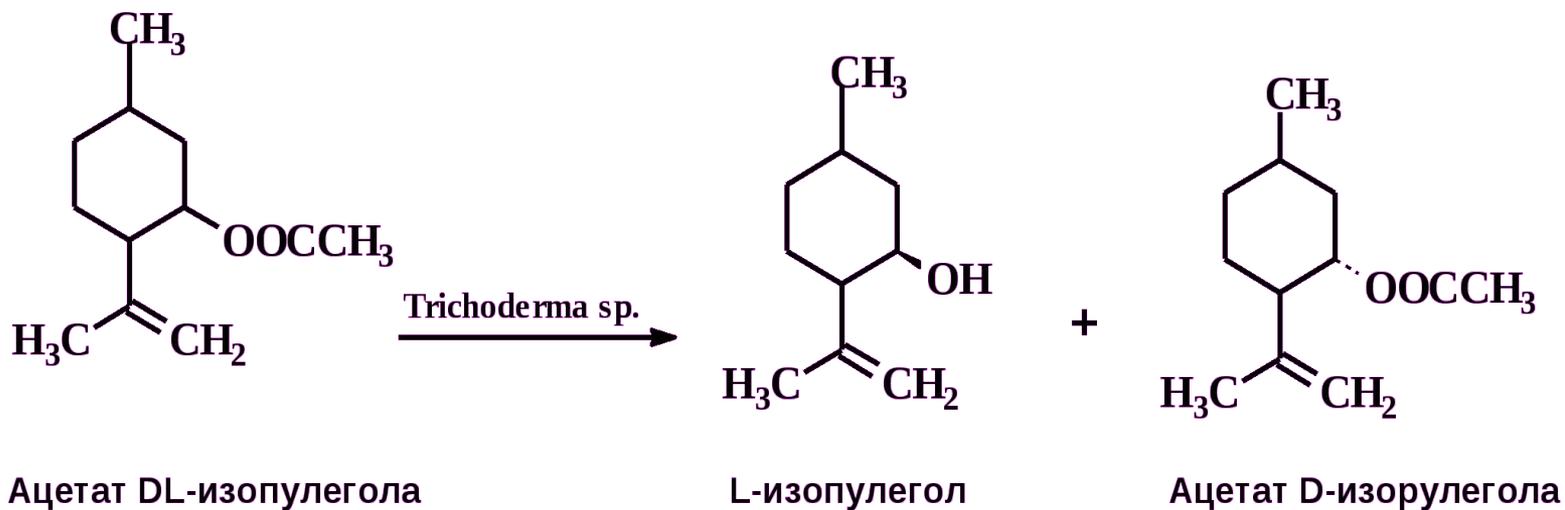
# РЕАКЦИИ ИЗОМЕРИЗАЦИИ

Имеют большое практическое значение. На их использовании основан, например, промышленный процесс получения фруктозы из глюкозы



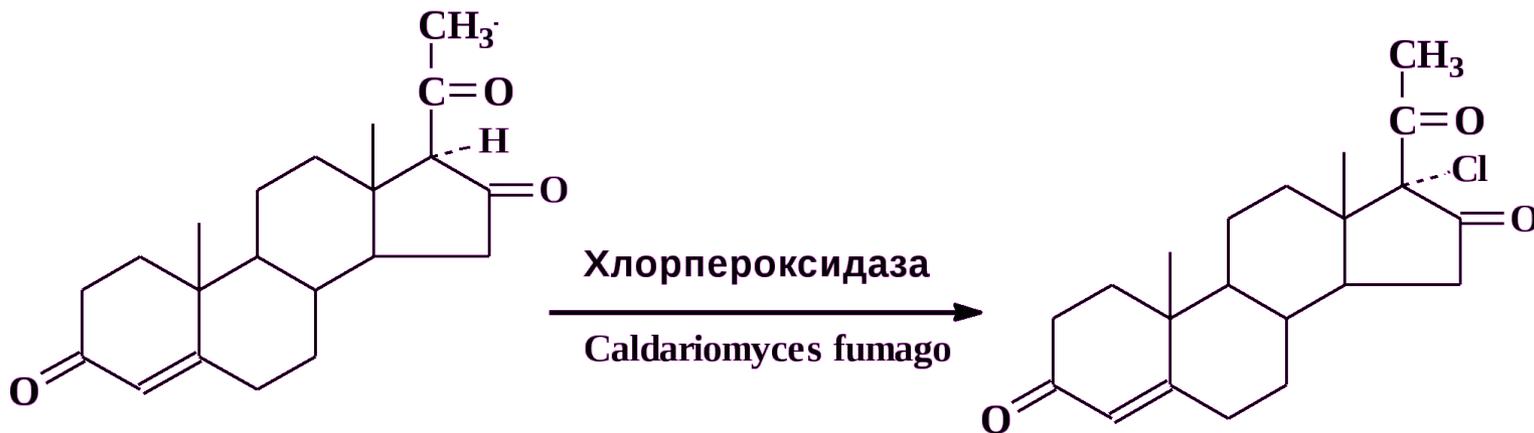
# РЕАКЦИИ РАЦЕМИЗАЦИИ

- Основаны на **стереоспецифичности ферментов**, например ацилаз.
- Расщепление рацемических соединений на оптические антиподы широко используется в промышленности для **получения стереоизомеров**.
- Ацилазы используют для **разделения смесей DL-аминокислот**, которые вначале ацилируют, а ацильные производные подвергают гидролизу, получая L-аминокислоты.
- Аналогичным путем происходит **разделение некоторых терпенов**, например DL-изопулегола:



# РЕАКЦИИ ГАЛОГЕНИРОВАНИЯ

- Редко встречаются в природе, но имеют особое значение, так как селективное галогенирование химическим путем – одна из самых сложных проблем химического синтеза.
- Дают возможность получать **галогенированные производные стероидов и других лекарственных препаратов.**
- Наиболее изучен процесс галогенирования ферментом мицелия гриба *Caldariomyces fumago*, получившим название хлорпероксидазы. Фермент катализирует хлорирование кетокислот, циклических дикетонов, бромирование тиазолов, анизола, стероидов



# ТЕХНОЛОГИЯ МИКРОБНОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ

1. Размножение культуры микроорганизма-трансформатора до количества, равного 5–10 % объема трансформируемого раствора.
2. Приготовление раствора для трансформации:
  - должен содержать максимальное количество трансформируемого вещества (обычно 10–25 %);
  - должен содержать минимальное количество солей, необходимых для роста микроорганизма-трансформатора, в таком виде, чтобы не затруднять химическое выделение целевого соединения;
  - если трансформируемое вещество не растворяется в воде, необходимо предварительно растворить его в нейтральном органическом растворителе, а затем при интенсивном перемешивании смешать с основным раствором.
3. Проведение трансформации в стерильных условиях при оптимальных значениях температуры, рН среды, аэрации, др. в течение 1–2 суток.
4. Химическое выделение вещества из раствора.

**Подбор культур микроорганизмов для микробиологической трансформации определенных соединений по заданному типу реакций осуществляется эмпирическим (экспериментальным) путем**

# Требования к микроорганизмам, трансформирующим органические соединения

Современная методология микробной трансформации позволяет использовать для осуществления того или иного химического превращения *любой микроорганизм, имеющий соответствующие ферменты.*

**Требования,** предъявляемые к микробному штамму для использования в исследовательской и производственной практике, сводятся к следующему:

- 1) микроорганизм должен развиваться на сравнительно простых средах;
- 2) активность фермента или ферментной системы, ответственных за трансформацию, должна быть достаточно высокой;
- 3) накопление продукта трансформации в среде должно быть достигнуто наиболее простыми методами;
- 4) перечисленные выше условия должны обеспечивать экономическую рентабельность процесса.

## Требования к микроорганизмам, трансформирующим органические соединения

Для микробной трансформации органических соединений используются обычно *сапрофитные микроорганизмы*, способные расти на *обычных питательных средах* и отличающиеся *интенсивным обменом веществ*.

Микроорганизмы, применяемые для получения органических веществ методом микробной трансформации, разнообразны. Среди них есть представители грибов (аскомицеты, фикомицеты, базидиомицеты, несовершенные грибы), актинобактерий, бацилл, протеобактерий, и многих других бактерий, а также микроформы водорослей.

Попытки установить видовую и родовую специфичность микроорганизмов, осуществляющих различные трансформации, не всегда успешны. Например, для гидроксирования алкильных заместителей ароматических соединений следует искать активные штаммы в родов *Rhodococcus* и *Nocardia*, для окисления оксигрупп полиолов — среди уксуснокислых бактерий родов *Acetobacter* и *Gluconobacter*, для изомеризации альдоз — среди стрептомицетов, артробактеров, лактобацилл, бацилл и др. Однако в большинстве случаев приходится ориентироваться на более крупные таксоны и более широкий поиск, что усложняет задачу. Потенциальная способность осуществлять различные трансформационные процессы распространена весьма широко среди микроорганизмов, и далеко не всегда можно заранее указать узкую таксономическую группу, в которой следует искать штаммы, осуществляющие определенное превращение.

# **МЕТОДЫ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ**

## **I. Использование ферментативных свойств интактных клеток:**

- 1) трансформация растущей культурой в периодических условиях;
- 2) использование ферментативной активности микробных культур, находящихся в определенных фазах роста;
  - а) трансформация суспензиями неразмножающихся вегетативных клеток;
  - б) трансформация спорами;
  - в) непрерывные процессы;
- 3) кометаболизм.

## **II. Методы, основанные на дезорганизации обменных процессов клетки:**

- 1) применение поврежденных и дезинтегрированных клеток;
- 2) ингибирование определенных участков метаболических путей;
- 3) применение мутантов с блокированным синтезом определенных ферментов.

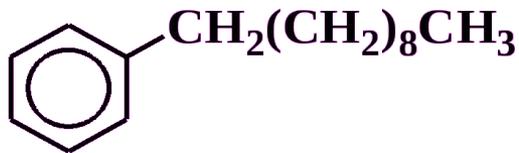
## **III. Конструирование штаммов с повышенной способностью к трансформации органических соединений.**

## **IV. Использование ферментных препаратов, иммобилизованных ферментов и клеток.**

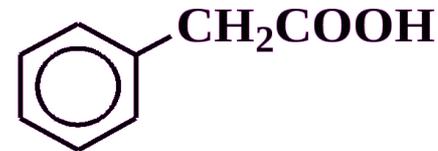
## **V. Политрансформация.**

# Трансформация растущей культурой в периодических условиях

- Наиболее простой метод, применяемый в случаях, когда **продукты трансформации не используются микроорганизмом-трансформатором**.
- Трансформируемый субстрат может вноситься в культуру микроорганизма, растущую, используя другой источник углерода. **Пример:** окисление 3-метилпиридина до никотиновой кислоты бактериями рода *Nocardia*, растущими за счет использования глюкозы.
- Рост микроорганизма-трансформатора может происходить при использовании части молекулы субстрата, который в данном случае является и ростовым, и трансформируемым. **Пример:** окисление децилбензола до фенилуксусной кислоты бактериями родов *Nocardia* и *Pseudomonas*. Ростовой частью в этом случае выступает алкильный заместитель при бензольном кольце, который утилизируется по схеме  $\beta$ -окисления жирных кислот. После прохождения 4 циклов  $\beta$ -окисления остается неусваиваемый остаток – молекула фенилуксусной кислоты, которая и является целевым продуктом.



Децилбензол



Фенилуксусная кислота

## Трансформация суспензиями неразмножающихся клеток

- Метод широко применяется в тех случаях, когда **максимальная активность трансформации приурочена к определенной фазе развития культуры микроорганизма или трансформируемый субстрат может разлагаться культурой до конечных продуктов**, а процесс метаболизма необходимо остановить на определенном этапе.
- Метод сравнительно легко применим в случаях, когда трансформация осуществляется грибными культурами, мицелий которых можно без особых затруднений отделить от питательной среды в нужный момент времени, ресуспендировать в буферном растворе или дистиллированной воде, где и осуществляется реакция трансформации.
- Метод трансформации суспензиями неразмножающихся клеток позволяет использовать культуру определенного физиологического состояния.
- 11-гидроксилирование кортексолона с помощью *Tieghemella orchldis* 233 наиболее интенсивно осуществляется 19-часовым мицелием.
- Трансформация ацетата кортизона в кортизон (гидролиз) бактериями *Actinomyces corymbosus* наиболее активно осуществляется 24-часовой культурой в период ее перехода в стационарную фазу.

# Трансформация спорами грибов и актиномицетов

Трансформация органических веществ спорами имеет ряд особенностей:

- обычно осуществляется в **простых средах** — дистиллированной или водопроводной воде, буферных растворах, иногда требуются добавки органических веществ в небольших концентрациях.
- споры активны после длительного хранения (до трех лет в замороженном состоянии). Если процесс трансформации идет в бедной среде, то споры могут быть отмыты и использованы еще 4-5 раз.
- оптимум рН обычно выражен менее четко, чем у вегетативных клеток. Это позволяет использовать условия, предотвращающие заражение посторонними микроорганизмами.

## Применение трансформации спорами в промышленных масштабах:

- ✓ 11  $\alpha$ -гидроксилирования прогестерона и кортексолона спорами *Aspergillus ochraceus*; 1-дегидрогенизации кортексолона спорами *Septomyxa affinis*; гидролиз феноксиметилпенициллина спорами *Fusarium sp.*
- ✓ Конидии *Aspergillus candidus* NRRL 305 синтезируют манит из глюкозы с 75% выходом.
- ✓ Появились работы по иммобилизации спор в полиакриламидный гель, что дает возможность применения непрерывно действующих колонок. Таким образом, были осуществлены гидролиз сахарозы и многочисленные трансформации стероидов.

## Непрерывные методы культивирования

Преимущество непрерывного культивирования по сравнению с периодическим при получении биомассы клеток стимулировали его применение для синтеза микробных метаболитов. Процессы получения **продуктов, непосредственно связанные с ростом микроорганизмов**, в условиях непрерывного культивирования осуществляются сравнительно легко. Образование микробных **метаболитов, не связанное с ростом**, потребовало больших усилий для реализации процессов непрерывным методом, и хотя многие из них осуществлены в лаборатории, внедрение этого метода в практику сопряжено с рядом затруднений. Одним из недостатков непрерывного метода, имеющим существенное значение, является то, что в периодической культуре легче получить максимальный выход продукта на единицу субстрата, в то время как в проточной культуре часть субстрата обычно не превращается. Однако более детальное и углубленное исследование непрерывной трансформации сорбита в сорбозу культурой *Acetobacter suboxydans*, прогестерона в 11 $\alpha$ -оксипрогестерон культурой *Aspergillus ochraceus*, прегнандиена в прегнатриен с помощью *Septomyxa affinis* и т. д. наглядно продемонстрировали рентабельность и преимущества этого метода. Непрерывные методы микробной трансформации получили интенсивное развитие благодаря разработке метода иммобилизации спор, клеток и ферментов.

# КОМЕТАБОЛИЗМ

**Кометаболизм** — процессы трансформации или полного разложения органических соединений, осуществляемые микроорганизмами сопряженно с метаболизмом других субстратов – **косубстратов**, не являющихся ростовыми.

**Пример:** окисление нокардиями **p-ксилола** или 3-метилпиридина в соответствующие кислоты без косубстратов на питательной среде, содержащей такие соединения, как **глюкоза и ацетат**, происходит **медленно**. В присутствии **ксилозы или глицерина** **активность** трансформации резко **возрастает**. Важно отметить, что глюкоза и ацетат являются оптимальными ростовыми субстратами для культур, осуществляющих описываемые процессы, в то время как ксилоза лишь частично окисляется, но не используется ими в качестве источника углерода, а глицерин поддерживает лишь медленный рост. Таким образом, оптимальные ростовые субстраты - глюкоза и ацетат не стимулируют трансформацию и не являются косубстратами. При использовании метода растущих культур накопление продуктов трансформации на средах с глюкозой и ацетатом, но без косубстратов, происходит лишь в связи со значительным увеличением массы клеток в культуре. В вариантах же с глицерином или ксилозой даже при медленном росте или в его отсутствие удельная активность трансформации значительно выше, что и стимулирует значительное накопление продуктов даже при низкой плотности клеточной культуры.

# КОМЕТАБОЛИЗМ

Возможные пути интенсификация микробной трансформации косубстратом:

- **использовании в процессе трансформации метаболитов**, образующихся во процессе метаболизма косубстрата, и **обеспечивающих первый процесс энергией и (или) кофакторами**

Кометаболизм играет важную роль в случаях:

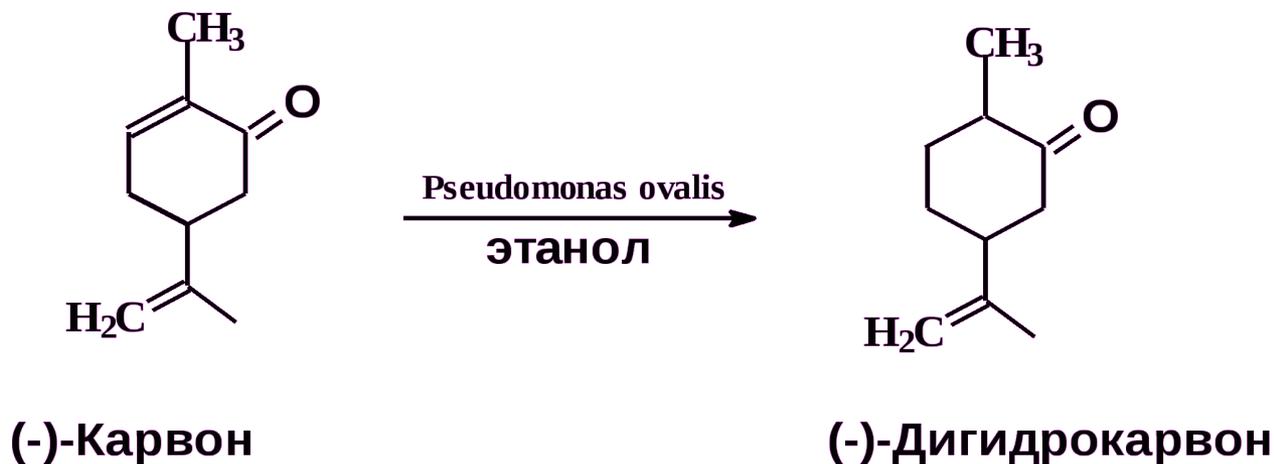
- когда в метаболической системе микроорганизма **отсутствует или недостаточно совершенна координация метаболических путей**;
- для превращения *необычных субстратов*.

**Выбор косубстрата** имеет важнейшее значение, поскольку он играет специфическую и вполне определенную роль в процессе кометаболизма

- когда ферментативный механизм трансформации известен, выбор косубстрата не составляет труда;
- когда механизм процесса неясен, косубстраты подбирают путем проверки разных соединений.

# КОМЕТАБОЛИЗМ

Для интенсификации процесса восстановления карвона в дигидрокарвон культурой *Pseudomonas ovalis* в качестве косубстрата используется этанол потому, что данный микроорганизм имеет активную НАД-зависимую алкогольдегидрогеназу, окисляющую этанол в ацетальдегид; последняя обеспечивает трансформацию карвона восстановительными эквивалентами (НАД×Н)



Окислительные процессы кометаболизма иногда называют **соокислением**, восстановительные — **совосстановлением**.

# Применение поврежденных и дезинтегрированных клеток

**Применение:** получение метаболитов, не накапливающихся в среде в обычных условиях в необходимых количествах.

**Сущность:** «дезорганизация» нормально функционирующих ферментных систем клетки с целью вычленения их отдельных участков.

**Способы получения дезинтегрированных клеток:** от простого высушивания до глубокой дезинтеграции клеточных структур с помощью ультразвуковых и механических дезинтеграторов.

**Пример:**

*препарат сухих дрожжей  
Saccharomyces cerevisiae*

**5'-уридинмонофосфорная кислота → уридиндифосфат-N-ацетилглюкозамин**

*Условия протекания реакции:* фосфатный буферный раствор (pH 7,6) с глюкозамином, фруктозой и  $MgCl_2$ .

*Выход целевого продукта:* 66 % от исходного УМФЧ через 10 ч инкубации

**Пример:**

*ацетоновый порошок или механически  
растертые клетки дрожжей*

**аденозинмонофосфат (АМФ) → аденозинтрифосфат (АТФ)**

*Интактные дрожжи в обоих случаях трансформирующей активностью не обладают*

# Ингибирование определенных участков метаболических путей

**Применение:** если известен фермент, ответственный за микробную трансформацию целевого соединения, есть возможность вычленить реакцию, осуществляемую этим ферментом, специфически ингибируя следующий фермент.

**Пример:** деградация продуктов первичного окисления n-алканов ( $\beta$ -окисление жирных кислот) может быть остановлена с помощью специфического ингибитора – *акриловой кислоты*. В этих условиях углеводороды окисляются в *алкановые кислоты* и *кетоны*.

**Пример:** внесение в растущую культуру *Nocardia* sp. KCN ( $1-10^{-3}$ М) ингибирует катаболизм прогестерона культурой до конечных продуктов. В качестве основного продукта получают *9 $\alpha$ -оксипрогестерон*

# Применение мутантов с заблокированным синтезом определенных ферментов

Метод аналогичен ингибированию определенных участков метаболических путей, только вместо химических ингибиторов применяют генетические методы — получение мутантов с заблокированным синтезом определенных ферментов.

## Пример:

1. Из прородного штамма *Candida cloacae*, окисляющего парафины, был получен мутант М-1, не способный далее ассимилировать дикарбоновые кислоты, и накапливающий при использовании гексадекана в качестве ростового субстрата до 22 г/л **тетрадекановой кислоты**.
2. Затем был получен штамм MR-12, вообще не способный расти на средах с парафинами и нуждающийся в других ростовых субстратах (ацетат). Отмытые клетки этого штамма накапливают до 4,3 г/л тетрадекановой кислоты при росте на среде с гексадеканом, и до 61 г/л тетрадекановой кислоты при росте на среде с гексадеканом и ацетатом.

*Путем получения мутантов удалось вычленить функцию начального этапа катаболизма n-алканов (не более трех ферментов) и использовать их активность для окисления углеводов в дикарбоновые кислоты*

# Конструирование штаммов с повышенной способностью к трансформации

Изучение нехромосомных элементов наследственности, контролирующих катаболизм у микроорганизмов многих органических веществ (плазмиды биодеградаци), навело на мысль об использовании их для создания «улучшенных» штаммов, трансформирующих органические соединения. Принципиальная возможность этого подхода показана на примере окисления нафталина в салициловую кислоту.

**Пример:** Процесс получения салициловой кислоты из нафталина с помощью бактерий рода *Pseudomonas* описан достаточно давно. Недостаток природных штаммов: салициловая кислота после кратковременного накопления в среде потребляется культурой в качестве источника углерода, что значительно снижает производительность процесса.

Штамм *Ps. putida* 41, полученный методом конъюгации в результате переноса плазмиды pNPL-1, контролирующей первичный этап окисления нафталина до салициловой кислоты, от донорного штамма *Ps. putida* 12A к реципиенту *Ps. putida* 4, не обладающему способностью окислять нафталин до салициловой кислоты, накапливал салициловую кислоту без ее дальнейшего потребления и отличался от донорного штамма значительно более высокой производительностью. В присутствии анионообменной смолы Амберлит IR-45, связывающей образующийся салицилат, в ферментационной среде выход продукта, равный 90 %, достигался за 10 ч ферментации.

# Использование иммобилизованных клеток микроорганизмов

Эффективность процессов, осуществляемых иммобилизованными клетками микроорганизмов-продуцентов, зачастую выше эффективности использования интактных клеток. Для иммобилизации микроорганизмов используются почти все методы, применяемые для иммобилизации ферментов, наиболее распространенные – **включение в полиакриламидный (ПААГ) и каррагенановый гели.**

**Пример:** получение аминокислот и органических кислот с использованием клеток, иммобилизованных в полиакриламидный и каррагенановый гели.

Клетки *E. coli*, иммобилизованные в ПААГ, осуществляли превращение **фумаровой кислоты** в **аспарагиновую**. **Активность** иммобилизованных клеток сохраняется при 37°C в присутствии ионов  $Mg^{2+}$  в течение 40 сут. при скорости протока 0,5 мл/ч через колонку размером 10×100 см, выход аспартата достигает 95 %. Ежесуточный выход **аспарагиновой кислоты** при использовании промышленной колонки составил 1900 кг или 57,6 т/месяц, время сохранения активности клеток свыше 120 сут.

Позже был разработан более экономичный способ иммобилизации клеток *E. coli* в каррагенан. Продуктивность иммобилизованных в каррагенан клеток *E. coli*, трансформирующих фумаровую кислоту в аспарагиновую, в 15 раз превышала таковую для иммобилизованных в ПААГ, время сохранения их активности увеличилось до 2 лет.

Преимущества метода перед существовавшим ранее были так велики, что в 1979 г. фирма «Танабе» заменила им промышленное получение L-аспарагиновой кислоты. Такой же процесс был осуществлен в Советском Союзе.

# Использование иммобилизованных клеток микроорганизмов

**Пример:** получение L-яблочной кислоты из фумаровой кислоты с помощью иммобилизованных в каррагенан клеток *Brevibacterium*.

**Пример:** трансформация сорбозы в 2-кето-L-гулоновую кислоту смесью иммобилизованных в ПААГ клеток *Gluconobacter melanogenus* IFO 3293 и *Pseudomonas syringae* NRRL B-865. Первый штамм окисляет сорбозу в сорбозон, а вторая, обладая активной сорбозооксидазой, образует 2-кето-L-гулоновую кислоту.

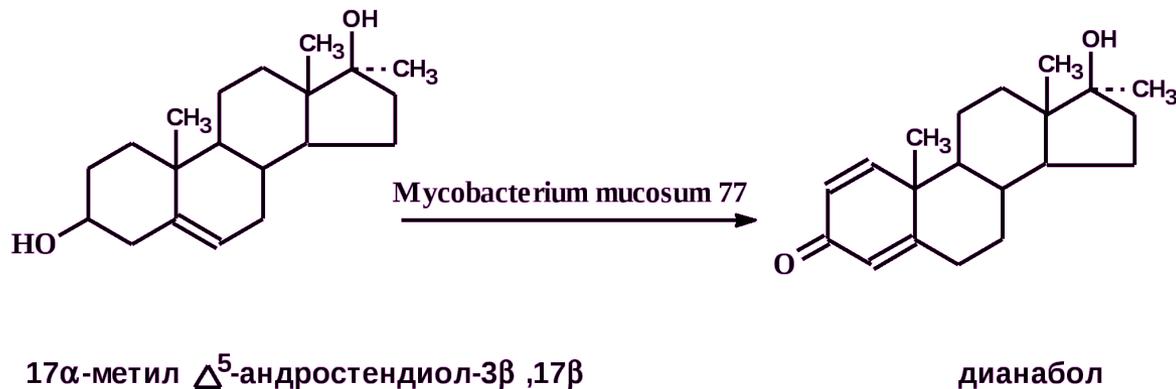
**Пример:** В Советском Союзе разработан опытно-промышленный регламент получения преднизолона из гидрокортизона иммобилизованными в ПААГ клетками *Arthrobacter globiformis*

# Политрансформация

Трансформация сложных органических молекул часто предполагает **более одной ферментативной реакции**. В ряде случаев для получения практически ценных продуктов требуются существенные перестройки молекулы субстрата, которые могут включать различные процессы, например окисление и гидролиз; окисление, восстановление и гидролиз и т. д.

## Подбор штамма, способного осуществлять нужную трансформацию

Штамм *Mycobacterium mucosum* 77 в присутствии ингибитора расщепления кольцевой структуры осуществляет трансформацию 17 $\alpha$ -метил  $\Delta^5$ -андростендиол-3 $\beta$ ,17 $\beta$  в дианабол. Процесс трансформации заключается в окислении гидроксила, изомеризации  $\Delta^5 \rightarrow \Delta^4$  и 1-дегидрогенизации.



# Использование нескольких последовательных микробных трансформаций

**Пример:** трансформация боратного комплекса 16-а-оксикортексолона

Первая стадия – 11-а-гидроксилирование – наиболее эффективно осуществляется мицелием *Aspergillus ochraceus* в неростовых условиях.

Вторая стадия – 1-дегидрогенизация ацетоновым порошком клеток *Arthrobacter simplex* (вносится через 24 ч)

## Использование смешанных культур микроорганизмов

В большинстве случаев применяется для трансформации стероидов, например для 1-дегидрогенизации и дезацетилирования.

Использование смешанных культур микроорганизмов дает возможность получить преднизон из ацетата кортизона в одну стадию.

Смешанные культуры в некоторых случаях более эффективны, чем последовательно использованные монокультуры. Сравнение ферментативных активностей *Arthrobacter globiformis* и *Mycobacterium album* в монокультуре и в смеси показало, что дезацетилирующая активность *M.album* в присутствии *A.globiformis* повышается.